

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA
DE *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) EM FRAGMENTOS
DE MATA ATLÂNTICA**

FÁTIMA BECKER GUEDES

**SÃO CARLOS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA
DE *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) EM FRAGMENTOS
DE MATA ATLÂNTICA**

Fátima Becker Guedes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

**SÃO CARLOS
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G924ad

Guedes, Fátima Becker.

Avaliação da diversidade e estrutura genética de *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) em fragmentos de mata atlântica / Fátima Becker Guedes. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
79 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Genética de populações. 2. Fragmentos florestais. 3. Microssatélite. 4. Conservação da natureza. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Micoureus paraguayanus (Didelphidae) EM FRAGMENTOS DE
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação de Mestrado de Fátima Becker Guedes

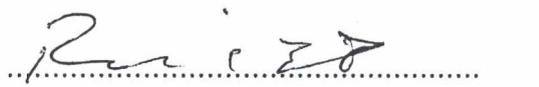
Banca Examinadora

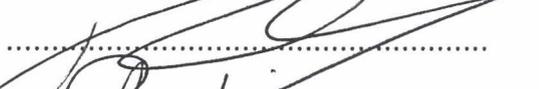
Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama

Prof. Dr. Renato Caparroz

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues


.....

.....

.....

.....

Dedico à minha linda filha Yukie, para que sirva de inspiração para seguir o seu próprio caminho. Ao meu amor, Alan, pela cumplicidade e companheirismo. E ao meu pai por esta ser uma realização nossa.

AGRADECIMENTOS

Ao Reinaldo Alves de Brito, pela orientação e paciência.

Ao Fernando Pacheco, pela amizade e incansável ajuda.

Ao Renato Caparroz, pela disposição em ajudar sempre que precisei.

À Fundação de Amparo a Pesquisa – Fapesp, pela bolsa concedida no início dessa jornada.

Ao Wigold Schaffer, pela compreensão e exemplo de persistência.

Ao meu pai pela disposição em ajudar sem cobranças.

Ao Alan pela dedicação.

À Yukie por me motivar a ser um bom exemplo.

Aos amigos, pelo incentivo.

RESUMO

A fragmentação de habitat é um dos principais resultados das alterações causadas pelos seres humanos na natureza. Entender as consequências biológicas desse processo é essencial para atingir o objetivo de conservar a natureza antropizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética de uma população do marsupial *Micoureus paraguayanus*, em fragmentos remanescentes de Floresta Estacional Semi-Decidual, na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo. Foram avaliados dez locos de microssatélites em 95 indivíduos, amostrados em seis fragmentos de hábitat, incluindo o Parque Estadual Morro do Diabo. A diversidade genética dos grupos de indivíduos da população estudada foi verificada através do número de alelos (média de 6,1) e heterozigotidade (média de 0,488). A heterozigotidade ficou abaixo dos valores descritos na literatura como característicos de populações não endogâmicas e também foram encontrados menos alelos em três dos locos estudados, quando comparados com outra população dessa mesma espécie. Sendo assim, a diversidade genética foi considerada baixa. Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre as distâncias genética e geográficas dos grupos de indivíduos nos fragmentos ($R = 0,087$; $P = 0,003$). Também, o número de imigrantes por geração (Nm) evidenciou um fluxo gênico histórico entre as populações analisadas. No entanto, através da observação dos valores de F_{st} e R_{st} foi evidenciada uma diferenciação genética significativa entre as populações de Santa Teresa, Santa Maria e Ponte Branca. Na análise da estrutura genética dessa população foram usados os programas Tess e Structure, que indicaram haver três agrupamentos nessa amostra populacional de *M. paraguayanus*. A estruturação em três grupos provavelmente deva-se a diferenciação entre os fragmentos de Santa Teresa, Santa Maria e Ponte Branca. Estes são os menores e mais alterados fragmentos avaliados e a sua diferenciação indica que o processo recente de fragmentação – cerca de 60 anos – já pode ter sido o responsável por mudanças na composição genética da população.

Palavras-chave: Fragmentação, microssatélite, *Micoureus paraguayanus*.

ABSTRACT

Habitat fragmentation is one of the main results of human alterations on nature. Understanding the biological consequences of this process is essential to reach the goal of conserving natural resources. The aim of this project was to assess levels of diversity and genetic structure of a population of the marsupial *Micoureus paraguayanus*, in forest remnants of a Semi-Deciduous Estacional Forest in the region of Pontal do Paranapanema, São Paulo. This variation was evaluated in ten microsatellite loci scored in 95 individuals sampled from six habitat fragments, including the Morro do Diabo State Forest. Genetic diversity in each subgroup was estimated by considering the average number of alleles (6,1 overall) and heterozygosity (0,488 when averaging all subpopulations). The latter was lower than values described in the literature for non-inbred populations on average. The number of alleles of three loci were also lower than what was observed for other population from the same species. So, on average, diversity was slightly lower than observed elsewhere. We detected a significant positive correlation ($R = 0,087$; $P = 0,003$) between genetic and geographic distances of populations of the fragments. The high number of migrants per generation (Nm) indicates historic gene flow between the analyzed populations. In spite of that, significant values of F_{st} and R_{st} were detected between some of the populations. A significant genetic differentiation was detected between Santa Teresa, Santa Maria and Ponte Branca. To analyze the genetic structure of this population we used the softwares Tess and Structure, which indicated tree clusters in the population of *M paraguayanus* sampled, which are associated with the three populations previously mentioned. These localities were the smallest and most disturbed fragments evaluated in this study and their differences probably indicate that the recent fragmentation process – about 60 years – could be responsible for promoting changes, by founder effect or bottleneck, in the genetic composition of the studied population.

Key-words: Fragmentation, microsatellite, *Micoureus paraguayanus*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características das áreas amostradas e número de indivíduos amostrados de <i>Micoureus paraguayanus</i> 29
TABELA 2	Relação dos <i>primers</i> testados na espécie <i>Micoureus paraguayanus</i> . Os números da tabela correspondem a: 1 – <i>primer</i> desenvolvido neste trabalho para <i>Micoureus paraguayanus</i> ; 2 – <i>primer</i> desenvolvido por outro pesquisador para <i>M. paraguayanus</i> e que ainda não havia sido testado; 3 – <i>primer</i> desenvolvido para <i>Monodelphis doméstica</i> ; e 4 – <i>primer</i> desenvolvido para <i>M. paraguayanus</i> 35
TABELA 3	Temperatura de anelamento e número de alelos para os <i>primers</i> 43.2, 44.2, 51.2, Mpa06, Mdo4L028, Mdem09, Mdem12 e Mdem15 para <i>Micoureus paraguayanus</i> 36
TABELA 4	Diversidade genética de <i>Micoureus paraguayanus</i> da região do Pontal do Paranapanema, SP, obtida através da análise de 10 locos do tipo microssatélite. É fornecido o número de alelos identificados em cada loco (N_a); o número total de alelos (N_t); o número médio de alelos; a heterozigosidade encontrada em cada loco (H_m); a heterozigosidade total média; o conteúdo de informação polimórfica (PIC); e o PIC médio 37
TABELA 5	Características dos locos de microssatélites de <i>Micoureus paraguayanus</i> , nas seis áreas amostradas no Pontal do Paranapanema, SP. Entre parênteses: indivíduos genotipados na localidade; N° alelos = número de alelos por localidade; H_o e H_e = Heterozigosidades observadas e esperadas; P = valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg; r = estimativa da frequência de alelos nulos de acordo com Brookfield (1996) 38
TABELA 6	Frequência dos alelos encontrados em <i>Micoureus paraguayanus</i> por localidade e por loco. Os alelos estão colocados de acordo com seu tamanho em pares de base. Entre parênteses: número de indivíduos coletados na localidade 41

TABELA 7	Heterozigosidades observada e esperada médias para cada uma das áreas amostradas e significância destes valores quando contrastados com simulações de coalescência e diferentes modelos mutacionais (IAM, TPM e SMM). Para descrição de testes e modelos evolutivos, vide texto. Entre parênteses: indivíduos genotipados na localidade; N_a = número de alelos por localidade; H_{def} – Deficiência de heterozigosidade; H_{exc} – Excesso de heterozigosidade 45	45
TABELA 8	Heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) considerando uma única população 46	46
TABELA 9	Matriz de diferenciação populacional. Área inferior esquerda = valores de F_{st} ; área superior direita = valores de P 48	48
TABELA 10	Matriz de diferenciação populacional. Área inferior esquerda = valores de R_{st} ; área superior direita = valor de P 48	48
TABELA 11	Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos três clusters encontrados pelo programa Structure 53	53
TABELA 12	Matriz com os valores de M ($M=2Nm$) apresentados pelo programa Arlequin para as diferentes populações, para F_{st} e R_{st} . Área inferior esquerda = valores de M derivado de F_{st} ; área superior direita = valor de M derivado de R_{st} 53	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mapa do Brasil indicando a área original do domínio e os remanescentes florestais da Mata Atlântica (Fonte: Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – www.rbma.org.br).....	12
FIGURA 2	Fotos de <i>Micoureus paraguayanus</i> (Fotos: Flávia Rocha).....	23
FIGURA 3	Região do Pontal do Paranapanema e uso do solo (Fonte: Meneguette, 2001)	28
FIGURA 4	Mapa da região do Pontal do Paranapanema mostrando o Parque Estadual Morro do Diabo – PEMD e os fragmentos florestais remanescentes. As áreas amostradas estão enumeradas de 1 a 6	28
FIGURA 5	Eletroferogramas com alguns dos microsatélites encontrados nas seqüências clonadas	34
FIGURA 6	<i>Primers</i> 44.2, Mdo4L028, Mpa06 e 51.2, testados em dois indivíduos, respectivamente nas colunas 1 e 3; 6 e 7; 8 e 9; 11 e 12. Nas colunas 4 e 5 testou-se outro <i>primer</i> que não apresentou produto de amplificação.....	36
FIGURA 7	Histogramas com as representações das frequências alélicas em cada loco dos indivíduos amostrados por fragmento florestal. Os asteriscos (*) junto ao nome da área amostrada indicam a presença de alelos exclusivos	42
FIGURA 8	Histogramas com as médias das heterozigosidades observada e esperada em cada fragmento amostrado.....	46
FIGURA 9	Histogramas com as heterozigosidades observada e esperada nos locos na análise de toda a população	47
FIGURA 10	Matriz de afiliação gerada pelo programa Tess ($K_{max} = 3$; $\log = -1819,7$).....	50
FIGURA 11	Visualização dos três clusters indicados pelo programa Tess para a população de <i>Micoureus paraguayanus</i> do Pontal do Paranapanema, SP ($K_{max} = 3$; $\log = -1819,7$). Cada ponto corresponde a um indivíduo na localidade onde foi capturado	50
FIGURA 12	Matriz de afiliação gerada pelo programa Tess ($K_{max} = 8$; $\log = -1815,7$).....	51

FIGURA 13	Visualização dos três clusters indicados pelo programa Tess para a população de <i>Micoureus paraguayanus</i> do Pontal do Paranapanema, SP ($K_{max} = 8$; $\log = -1815,7$). Cada ponto corresponde a um indivíduo na localidade onde foi capturado	51
FIGURA 14	Histograma, com agrupamentos de acordo com o valor de Q, resultado do programa Structure ($K = 3$; $\log = -1868,7$). Cada barra refere-se a um indivíduo e a sua respectiva probabilidade de pertencer a um dos três cluster apontados.....	52
FIGURA 15	Triângulo gerado pelo programa Structure. Cada ponto representa um indivíduo no qual é indicada a sua origem pela cor e também a sua afiliação aos <i>clusters</i> de acordo com a sua posição ($K = 3$; $\log = -1868,7$). As populações são: 1 = PEMD; 2 = Tucano; 3 = Sta Teresa; 4 = Ponte Branca; 5 = Sta Maria; 6 = Sta Mônica.....	52
FIGURA 16	Matriz de afiliação gerada pelo programa Structure ($K = 3$; $\log = -1868,7$)	52
FIGURA 17	Representação da correlação entre distância genética e geográfica, teste de Mantel	53

SUMÁRIO

RESUMO.....	04
ABSTRACT	05
LISTA DE TABELAS	06
LISTA DE FIGURAS.....	08
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Fragmentação de habitat	12
1.2 Processos evolutivos.....	13
1.2.1 <u>Deriva genética</u>	15
1.2.2 <u>Endocruzamento</u>	16
1.2.3 <u>Fluxo gênico</u>	17
1.2.4 <u>Mutação</u>	18
1.3 Marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais e de conservação.....	19
1.3.1 <u>Marcadores do tipo microssatélite</u>	20
1.4 <i>Micoureus paraguayanus</i>	22
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Área de estudo.....	27
3.2 Obtenção de amostras	27
3.3 Isolamento de marcadores do tipo microssatélite.....	29
3.3.1 <u>Biblioteca genômica</u>	29
3.3.2 <u>Sequenciamento</u>	30
3.3.3 <u>Determinação de primers para amplificação de microssatélite</u>	30
3.4 Síntese dos primers e amplificação das regiões microssatélites isoladas	30
3.5 Utilização de primers (heterólogos e espécie-específicos) desenvolvidos por outros pesquisadores	31
3.6 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Isolamento dos marcadores microssatélites	34
4.2 Avaliação e caracterização dos primers testados	34
4.3 Diversidade genética	36
4.4 Estrutura populacional	47
5 DISCUSSÃO	54
5.1 Busca de marcadores do tipo microssatélite para <i>Micoureus paraguayanus</i>	54
5.2 Diversidade genética.....	55
5.3 Estrutura genética	58
5.4 Implicações da diversidade e estrutura genética encontrados	60
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS	63
ANEXO I.....	73

1 INTRODUÇÃO

O ser humano interfere de maneira desastrosa nos processos naturais ameaçando a persistência de muitas espécies. Muitas espécies já foram extintas devido a ações antrópicas, como por exemplo, a ave conhecida como dodo (*Raphus cucullatus*), extinta no final do século XVII, e, num caso mais recente, o lobo marsupial (*Thylacinus cynocephalus*), considerado extinto em 1930. Por serem nativos de ilhas, esses animais eram mais suscetíveis às alterações em seu ambiente natural (QUAMMEN, 1996). No Brasil, como exemplo, pode-se citar as publicações, pelo Ministério do Meio Ambiente, das Listas de espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção, nesta última, atualizada 16 anos depois da sua última edição, o número de espécies listadas aumentou mais de quatro vezes (BRASIL, 2003, 2008). As conseqüências sociais, ambientais e econômicas desencadeadas pela perda da diversidade biológica têm levado a humanidade a proteger a natureza das suas próprias ações.

Diante deste cenário, cada vez mais busca-se o entendimento da história natural e do estado de conservação das espécies para subsidiar as ações conservacionistas (CULLEN JUNIOR et al, 2003). Dentre os esforços de pesquisa da Biologia da Conservação, as avaliações genéticas têm se mostrado ferramentas com grande potencial para embasar tais ações, ao elucidar muitas questões relacionadas aos processos evolutivos de uma espécie, as relações filogenéticas de diferentes espécies e as propriedades da diversidade genética de populações naturais (SOLÉ-CAVA, 2001).

Estudos genéticos de populações são importantes por possibilitar inferências sobre a diversidade genética, distâncias genéticas, o fluxo gênico, além de permitir a avaliação dos níveis de endogamia. Estes fatores têm sido direta e indiretamente relacionados à extinção de espécies e têm maior importância em populações pequenas e isoladas, nas quais os efeitos da endogamia, da deriva genética e do fluxo gênico restrito são pronunciados (BRITO e FERNANDEZ, 2000).

Nessa perspectiva, o presente trabalho faz uma avaliação da diversidade genética e da estrutura populacional do marsupial *Micoureus paraguayanus*, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, visando contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos da perda e fragmentação de habitat sobre os processos evolutivos pelos quais estão sujeitas as populações naturais.

1.1 Fragmentação de habitat

A conversão dos ambientes naturais é o principal elemento causador da perda de diversidade biológica e o que resta desse tipo de alteração, quando muito, é uma paisagem fragmentada (PRIMACK e RODRIGUES, 2001). No Brasil, entre as formações florestais mais ameaçadas está a Mata Atlântica, com apenas 7,26% da sua área original distribuída entre remanescentes maiores que 1 km² (SOS MATA ATLÂNTICA e INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2008). Originalmente o domínio estendia-se por toda a costa leste do Brasil, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, interiorizando-se até mais de 500 km em certas regiões, extrapolando as fronteiras do país (BRASIL, 2004) (Figura 1). Esta é uma das regiões mais ricas em biodiversidade do planeta, são 261 espécies de mamíferos dos quais 73 endêmicos; 1.711 de vertebrados; e 20.000 de plantas, sendo 8.000 endêmicas (BRASIL, 2002). Atualmente, sobre sua área original de distribuição, que corresponde a 15% do território nacional, vivem cerca de 120 milhões de habitantes, quase 70% da população brasileira, distribuídos em mais de 3.400 municípios, que correspondem a 62% dos existentes no país (BRASIL, 2007).



Figura 1. Mapa do Brasil indicando a área original do domínio e dos remanescentes florestais da Mata Atlântica (Fonte: Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – www.rbma.org.br).

Devido as fortes pressões antrópicas, hoje o que resta da Mata Atlântica são amostras fragmentadas dos ecossistemas originais, o que não significa ser uma amostra fiel da biodiversidade que já existiu. A arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*) e o mutum do nordeste (*Mitu mitu*) são exemplos de aves já consideradas extintas na natureza (OLMOS, 2005). Considerando isso, desde 2006, a Lei da Mata Atlântica protege todos os remanescentes desse domínio, restringindo o seu uso de acordo com o estágio sucessional (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008).

A proteção e restrição de uso não são suficientes para garantir a sobrevivência de muitas das espécies associadas ao domínio, pois habitats fragmentados estão sujeitos a uma série de processos que ameaçam a sobrevivência das espécies. Devido à complexidade dos ecossistemas, a forma como estes processos podem levar as populações naturais à extinção é sutil (TURNER e CORLETT, 1996). O tamanho da área remanescente, o tempo de isolamento e o grau de conectividade entre fragmentos estão entre os principais fatores que influenciam a resposta a longo prazo das espécies à fragmentação (PIRES et al, 2006).

O processo de perda de hábitat implica, quase invariavelmente, na diminuição do tamanho populacional das espécies. As pequenas populações são afetadas diferenciadamente por processos ligados às aleatoriedades ambiental, demográfica e genética além da perda de flexibilidade adaptativa (BRITO e FERNANDEZ, 2000). A aleatoriedade ambiental refere-se às flutuações no ambiente, como secas prolongadas, inundações ou incêndios. A aleatoriedade demográfica refere-se às variações na razão sexual, nas taxas de mortalidade e reprodução, entre outras. A aleatoriedade genética envolve as variações genéticas nas populações através dos processos de deriva genética, mutações, endocruzamento, fluxo gênico, gargalos genéticos e efeito fundador. A perda de flexibilidade evolutiva é a perda de variabilidade genética e conseqüentemente do potencial de uma espécie ou população de responder evolutivamente a possíveis mudanças ambientais.

1.2 Processos evolutivos

Para a compreensão dos fatores que influenciam a persistência de espécies ameaçadas por ações humanas, é fundamental considerar o papel dos processos evolutivos. Se a conservação das espécies focar não apenas o fenótipo atual, mas sim a linhagem filogenética, a meta em biologia da conservação será a preservação dos processos evolutivos

(FRANKLIN, 1980). Ações antrópicas aceleram ou induzem grupos a processos evolutivos e também podem iniciar processos nos quais a única possibilidade de sobrevivência de uma espécie seria a adaptação genética, como no caso de isolamento de populações (NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

Perturbações antrópicas é uma das causas particularmente fortes de seleção, pois aumentam a taxa de evolução contemporânea, ou seja, ocorrência de características herdadas em menos de algumas centenas de gerações (STOCKWELL et al, 2003). O processo de fragmentação de habitat, por exemplo, gera uma série de mudanças que podem acarretar na extinção de espécies se estas não tiverem flexibilidade para adaptação.

Existem duas maneiras de ocorrer mudanças evolutivas: a adaptativa e a neutra. Na evolução adaptativa, a seleção natural opera sobre um caráter quando este tem uma correlação, positiva ou negativa, com o sucesso reprodutivo. Quando essa correlação não existe, a seleção natural desaparece e o que resta é a evolução neutra (STEARNS e HOEKSTRA, 2000).

Variação genética é imprescindível para a ocorrência de processos evolutivos, sejam eles adaptativos ou neutros. Porém, não existe comprovação acerca da importância da variabilidade genética em locos neutros. Lande e Barrowclough (1987) reforçam que caracteres quantitativos certamente são essenciais para a evolução adaptativa, enquanto a importância de genes únicos para a adaptação não é bem conhecida. Contudo, considerando as dificuldades de se alcançar as metas ideais para a manutenção das espécies sob proteção e manejo, a principal meta de conservação do ponto de vista genético seria a manutenção da maior variabilidade genética possível (Clarke e O'Dwyer, 2000). Além do mais, a variação em locos neutros é reflexo dos processos evolutivos pelos quais passou a espécie e a baixa variabilidade genética nesses locos deve significar que os locos adaptativos também têm baixa variação, o que não seria desejável.

A flexibilidade adaptativa refere-se ao potencial de uma população de se adaptar às mudanças do ambiente. Quando ocorrem mudanças no meio, sejam elas catástrofes (enchentes, queimadas, falta de recursos) ou transições graduais, é essencial que a espécie tenha variabilidade suficiente para responder a tais mudanças (AMOS e HOELZEL, 1992). A variabilidade genética é fundamental para possibilitar adaptações através da seleção natural. É importante entender que o processo de seleção natural pode reduzir a variação genética através da fixação de alelos. No entanto, o efeito dessa perda de variação genética e conseqüentemente de potencial evolutivo só é percebido em pequenas populações, as quais podem chegar a um limite de seleção (STEARNS, 1992).

O processo de fragmentação de habitats tem relação direta com a indução ou potencialização de certos processos evolutivos. Os processos evolutivos que contribuem para a diminuição da variabilidade genética são o efeito fundador, os gargalos genéticos e a deriva genética. Além disso, a fragmentação de habitats e redução no tamanho populacional pode favorecer a ocorrência de endocruzamento na população.

1.2.1 Deriva genética

Deriva genética é o processo de flutuações aleatórias nas frequências alélicas de uma população finita que leva a uma diminuição da variabilidade gênica.

É medida pela frequência de variação alélica por geração ou pela taxa de perda de heterozigotidade seletivamente neutra (LANDE e BARROWCLOUGH, 1987). Os efeitos da deriva genética são considerados sobre as frequências de diferentes alelos neutros. É importante perceber que aceitando a teoria neutralista para explicar certos alelos nas populações, não significa que os genes considerados neutros não são funcionais, mas que os vários alelos, de um mesmo loco neutro, são apenas igualmente funcionais (KIMURA, 1980).

A aleatoriedade da deriva provoca mudanças nas frequências alélicas das populações, através da fixação de alelos em detrimento de outros que serão perdidos se atingir a frequência $p=0$. Neste caso, a heterozigotidade diminui na população ao longo do processo de deriva.

Espera-se perder na população uma fração de $1/(2N_e)$ de variação genética por geração, devido à deriva (FUTUYMA, 2002). Portanto o tamanho efetivo populacional (N_e) é importante no processo de deriva genética, assim como o número de gerações em que a população permanece pequena (NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

As conseqüências evolutivas da deriva, importantes para a conservação das espécies, são a perda de variabilidade genética, que poderá ser compensada pela taxa de mutação e pelo fluxo gênico, e a divergência genética entre populações que também é contrabalançada pelo fluxo gênico. O fluxo gênico provoca a convergência das frequências alélicas, enquanto que a mutação, juntamente com a deriva, atua nesse processo no sentido de aumentar a divergência entre populações.

O tamanho das populações varia no decorrer do tempo de forma aleatória. O processo que leva à perda de diversidade gênica decorrente de baixas populacionais é chamado de gargalo genético. A perda de variabilidade genética por este processo ocorre pela

diminuição da variação alélica, porém a heterozigosidade continua relativamente a mesma (ELLSTRAND e ELAM, 1993; FRANKHAM, 1995b).

Quando poucos indivíduos colonizam um novo ambiente, a variabilidade genética na população formada, em termos de diversidade alélica, será determinada pela variabilidade existente nos fundadores. Efeito fundador, portanto, refere-se à baixa variabilidade presente em populações que foram colonizadas por um restrito número de imigrantes e, conseqüentemente, com uma restrita variação genética. Este princípio também pode ser aplicado a qualquer população que passe por um acentuado gargalo genético (FUTUYMA, 2002).

Para o manejo adequado de um pequeno número de indivíduos fundadores de uma população é recomendável que seja igualada a sua representação durante a formação das gerações subseqüentes (FRANKHAM, 1995b).

1.2.2 Endocruzamento

O endocruzamento é o processo de cruzamento entre indivíduos aparentados, que leva a um aumento de genótipos homozigotos. Este processo pode levar à depressão endogâmica, quando alelos recessivos deletérios aparecem com mais freqüência em homozigosidade, o que pode gerar baixa na aptidão individual.

Uma população é chamada de endogâmica se a probabilidade da progênie herdar duas cópias gênicas que são idênticas por descendência for maior do que seria esperado por acasalamento puramente aleatório (FUTUYMA, 2002). O coeficiente de endocruzamento (F) indica a probabilidade de um indivíduo ser autozigoto (homozigoto que possui dois alelos idênticos por ascendência) de um gene qualquer presente em um de seus ancestrais (BEIGUELMAN, 1995). Essa probabilidade pode ser maior não apenas se a formação de casais consangüíneos for preferencial, mas também pela redução no tamanho populacional, pois em populações pequenas aumenta a probabilidade de encontros entre indivíduos aparentados.

Há uma diferença importante entre a perda de diversidade genética provocada por endocruzamento e deriva gênica. No primeiro não há perda de alelos, e apenas as freqüências genotípicas são alteradas, com o aumento da freqüência de indivíduos homozigotos na população e redução dos indivíduos heterozigotos. No segundo caso ocorre

variação na frequência dos alelos das populações que, em última instância, podem levar à perda e diminuição da variabilidade genética.

Interessantemente, se houver depressão por endocruzamento devido a alelos deletérios em homozigose, estes poderão ser eliminados (expurgo da carga genética) e restabelecer a aptidão da população (YOUNG et al, 1996). Segundo Frankham (1995b), a eliminação de alelos deletérios pode amenizar a depressão endogâmica, mas é improvável que a elimine.

Frankham (1995a) argumenta que não há uma relação linear entre endocruzamento e extinção, no entanto, atingindo-se valores intermediários de F há um conseqüente aumento nos níveis de extinção. O insucesso reprodutivo de alguns indivíduos causado pela depressão endogâmica pode estar relacionado com uma outra problemática genética: alelos desejáveis em locos diferentes podem ser eliminados junto com alelos deletérios por estarem muito próximos em um mesmo cromossomo. Esse processo é compreendido pelos locos considerados na população estarem em “desequilíbrio de ligação”, pela proximidade no genoma.

1.2.3 Fluxo gênico

Fluxo gênico refere-se à transferência de genes entre populações através da migração de indivíduos. A troca gênica restringe os efeitos da deriva genética e da seleção natural, compensando a perda de variabilidade genética e homogeneizando as populações (SEOANE et al, 2000). Madsen *et al.* (1995) demonstraram em seu trabalho com serpentes (*Vipera berus*) que a incidência de nascimentos inviáveis numa população, que sofria efeito de depressão por endocruzamento, diminuiu com a introdução de um macho de outra população, ou seja, o aumento no fluxo gênico contribuiu para aumentar a viabilidade da população.

Allendorf (1983 apud ELLSTRAND e ELAM, 1993), destaca que com vistas à conservação das espécies, tem-se que um migrante por geração irá homogeneizar as populações contra os efeitos da deriva. Porém quando houver quebra de complexos gênicos coadaptados, resultante de migração, haverá depressão por exocruzamento (COUVET, 2001). Depressão por exocruzamento é maior quando o status taxonômico da população está em questão e quando há uma forte divergência genética. Devido a maior vagilidade animal com conseqüente menor adaptação local, a depressão por exocruzamento é mais importante em

plantas (FRANKHAM, 1995b). Aumentar a diversidade genética em programas de manejo pode ser desejável, no entanto deve se ter o cuidado de evitar a depressão por exocruzamento, que pode ocorrer quando não há dados suficientes a respeito da variação entre as populações da espécie. Ellstrand e Elam (1993) sugerem que não deve ser transplantado mais do que 1% da população que irá receber os imigrantes, para que seja minimizado o impacto da depressão por exocruzamento e seja suficiente o aumento de diversidade.

1.2.4 Mutação

Mutações são modificações hereditárias na seqüência de DNA, no número, forma ou estrutura cromossômica (STEARNS e HOEKSTRA, 2000). São importantes para Genética da Conservação pelo seu importante papel em pequenas populações, pois é criada, aleatoriamente, maior diversidade.

Taxas de mutações são quantificadas pela freqüência em que um novo mutante aparece na progênie de uma população de indivíduos não mutantes, sendo a taxa de substituição genética por um mutante vantajoso numa população altamente condicionada pelo tamanho populacional e pela vantagem seletiva do gene mutante (KIMURA, 1980). A taxa de mutação (μ) por loco, em uma população grande, provavelmente estará por volta de 10^{-5} ou 10^{-6} por gameta por geração, podendo variar muito entre locos (FUTUYMA, 2002). Caracteres morfológicos de herança quantitativa têm taxas de mutação de até 3 ordens de grandeza maiores que os observados para a maioria dos caracteres moleculares, com exceção dos microssatélites (SOLÉ-CAVA, 2000).

Embora todos os tipos de variação genética sejam igualmente influenciados pela deriva genética (aleatória), as diversas variações genéticas são restabelecidas em diferentes taxas dependendo da mutabilidade da região gênica considerada (LANDE, 1998). Assim, a taxa de mutação em populações finitas se torna importante para restabelecer a perda de variação genética gerada pela deriva genética.

É importante perceber que nem toda mudança na composição genética de populações pode ser atribuída a eventos recentes de fragmentação de habitat, mas pode ser resultado de processos evolutivos históricos (CLARKE e O'DWYER, 2000). Fatores históricos são muito importantes para compreender os padrões de variação genética contemporânea. Espécies nas quais ocorreram mudanças recentes de distribuição, abundância ou aptidão podem ser consideradas mais ameaçadas que espécies historicamente raras

(ELLSTRAND e ELAM, 1993). Isto pode se dar, por exemplo, pelas populações historicamente raras já terem tido alelos recessivos deletérios eliminados, através de processos passados de depressão endogâmica.

1.3 Marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais e de conservação

Informações sobre a variabilidade genética de uma espécie ou população podem ser acessadas através da avaliação de características fenotípicas ou através de estudos sobre uma gama de marcadores moleculares.

As características fenotípicas são geralmente avaliadas através da genética quantitativa, que estuda traços geralmente contínuos e controlados por muitos genes, ou seja, poligênicos. Através dos dados fenotípicos estima-se a herdabilidade, que se refere à porcentagem do fenótipo que corresponde à porção genética herdável, que é diretamente passada à progênie. Como os dados são fenotípicos, é mais fácil a visualização da sua relação com o valor adaptativo e, portanto, podem ser escolhidas características que permitam uma correlação da variabilidade encontrada ou da herdabilidade, com possíveis mudanças no ambiente, inferindo-se a respeito do potencial evolutivo da população. Contudo, métodos como estes exigem uma grande amostra (>30 famílias) e mais de uma geração amostrada (STORFER, 1996). Os resultados são bastante informativos, mas geralmente demandam muito tempo para obtenção.

Métodos moleculares exigem a obtenção de material biológico (sangue, tecido, pêlos e penas ou fezes) que contenha informação genética e geralmente uma pequena amostra (20–30 indivíduos) é suficiente para a obtenção de dados confiáveis. No entanto, amostras pequenas podem ser problemáticas no caso de inferências a respeito do número de alelos, pois alelos raros podem não ser detectados (CLARKE e O'DWYER, 2000). Com o avanço das técnicas para análises do DNA e o desenvolvimento da bioinformática, a aplicação dos dados genéticos visando à conservação das espécies é cada vez mais precisa e, portanto, difundida (ex. GRATIVOL et al, 2001; JONES et al, 2003; MARTINS et al, 2008; MOORE et al, 2008). O principal acontecimento para a ampliação do uso das análises genéticas foi o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR), que consiste na amplificação de uma região do DNA, através de repetidos ciclos de desnaturação e síntese, com o auxílio de primers (oligonucleotídeos de 20 – 30 bases) que se ligam ao DNA complementar e permitem que a DNAPolimerase inicie a síntese de novo

DNA, possibilitando o acesso à informação genética em grande quantidade (SAIKI et al, 1988).

A escolha do método ou do marcador mais adequado deve considerar qual é o modo de herança (transmissão por genoma haplóide ou diplóide, transmissão por um dos pais ou por ambos); se deseja-se dados de um loco específico ou de todo o genoma; se o marcador é dominante ou codominante; qual é o modelo evolutivo de mutação mais provável; qual é a taxa de evolução relativa; e se o marcador sofre pressão seletiva e em que grau (PEREZ-SWEENEY et al, 2003).

Os marcadores ou métodos moleculares podem ser considerados dominantes, quando não diferenciam indivíduos heterozigotos de homozigotos, ou codominantes, quando diferenciam tais indivíduos. O interesse na taxa de evolução relativa varia de acordo com o tipo de estudo. Marcadores que evoluem rapidamente apresentam maior variabilidade individual sendo úteis para o estudo de indivíduos ou populações, enquanto os que evoluem lentamente são melhor aproveitados em estudos ao nível de espécies ou táxons supra-específicos

Em estudos populacionais utilizando-se técnicas moleculares, análises pontuais do genoma, como as baseadas em apenas um loco, têm resultados restritos, pois certos locos podem sofrer diferentes pressões seletivas. Dessa forma, alguns locos devem ser analisados para se obter resultados mais confiáveis sobre a dinâmica populacional da espécie de interesse. No caso do uso de marcadores do tipo microssatélite, é importante obter um número satisfatório de alelos no universo de locos analisados para se atingir bons resultados (KALINOWSKI, 2002).

Escolhido o marcador ou o método molecular, os resultados obtidos podem ser comparados entre diferentes indivíduos ou populações de acordo com as limitações de cada um. Muitas vezes mais de um tipo de marcador pode ser usado de forma complementar (ex. FITZSIMMONS, 1997).

1.3.1 Marcadores do tipo microssatélite

Microssatélites, ou seqüências simples repetidas (simple sequence repeats - SSR), ou ainda pequenas repetições em tandem (short tandem repeat – STR), são regiões do DNA que possuem de 1 a 6 bases nucleotídicas repetidas. São amplamente distribuídos nos genomas de eucariotos e procariotos, porém de maneira desigual entre regiões codificadoras e

não-codificadoras (VAN BELKUM et al, 1998; KATTI et al, 2001). Microssatélites são classificados de acordo com o tipo de seqüência repetida em: perfeito (ex. CACACACACACACA), imperfeito (ex. CACACACATCACACA, interrompido (CACACACAGTGACACACACA), ou composto (ex. CACACACAGTGTGTGTGT).

Entre as características de interesse dos SSRs está a alta taxa de mutação, que em mamíferos varia entre 10^{-3} e 10^{-5} por loco, por geração (DALLAS, 1992; WEBER e WONG, 1993; SCHUG et al, 1997). Os microssatélites são codominantes, ou seja, são locos onde é possível distinguir a presença dos dois alelos em organismos diplóides heterozigotos. Além disso, SSRs tem maior chance de serem polimórficos em virtude dessa alta taxa de mutação, na qual o mecanismo de escorregamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA é apontado como a causa mais provável para a maioria dos casos (STRAND et al, 1993). Também é importante lembrar que a aplicação prática dos SSRs, está diretamente ligada com a possibilidade de amplificação de regiões genômicas através da PCR. Essas características tornam os SSRs importantes marcadores moleculares, que podem ser utilizados para resolver diversas questões, entre elas, análises de parentesco, investigações de processos genéticos, análise da variabilidade genética, entre outras aplicações.

A utilização de microssatélites, no entanto, está condicionada ao pré-estabelecimento de pares de *primers* que identifiquem sua localização no material genético. A busca de microssatélites e determinação dos *primers* que o flanqueiam é considerada relativamente trabalhosa e de alto custo. No entanto, devido à constatação de sítios de microssatélite conservados entre espécies próximas de mamíferos, a amplificação heteróloga tem se mostrado vantajosa, com a disponibilidade desses marcadores já descritos para inúmeras espécies (STALLINGS, 1995; SUN e KIRKPATRICK, 1996). Em geral, o sucesso de amplificação de uma região polimórfica entre espécies é diretamente proporcional ao seu grau de relação filogenética (SELKOE e TOONEN, 2006). Embora tenha sido observado que a maioria dos microssatélites tenha baixa transferibilidade entre espécies (SELKOE e TOONEN, 2006), alguns apresentam amplificação cruzada entre várias delas (SAHA et al, 2006; GAO et al, 2005; ZENGER et al, 2004; RICO et al, 1996).

A identificação de relação entre doenças e o número de repetições em microssatélites e o fato de haver diferenças significativas de sua distribuição dentro e fora das regiões codificadoras, sugere que em alguns casos há alguma pressão de seleção agindo sobre eles. No entanto, de maneira geral, os microssatélites são considerados seletivamente neutros, ou seja, considera-se que não são afetados por pressões seletivas. Nessa perspectiva, modelos teóricos foram sugeridos para determinar os parâmetros genéticos populacionais obtidos com

dados de microsatélites. Entre os mais usados estão a estatística F (F_{st}), desenvolvida por Wright (1931), e baseada no modelo de alelos infinitos (IAM), que supõe que cada mutação cria um novo alelo. Considerando a dinâmica de produção de novos alelos, Slatkin (1995) propõe um modelo estatístico análogo ao modelo de Wright, o R_{st} , em que a cada mutação ocorre o ganho ou a perda de uma repetição, baseado no modelo de mutação por passos (SMM – *Stepwise Mutation Model*).

1.4 *Micoureus paraguayanus*

Micoureus paraguayanus (TATE, 1931) (= *Micoureus travassosi*) (VOSS e JANSA, 2003) é um marsupial sul-americano, conhecido popularmente como cuíca (Figura 2). O gênero *Micoureus* faz parte da família Didelphidae, subfamília Didelphinae e, junto com os gêneros *Marmosa* e *Monodelphis*, constitui o grupo monofilético *Marmosa* (JANSA e VOSS, 2000; VOSS e JANSA, 2003).

As espécies desse gênero são amplamente distribuídas pela América do Sul, ocorrendo da Colômbia ao norte da Argentina, no Paraguai e no Brasil (EMMONS e FEER, 1997). Quatro espécies compõem o gênero *Micoureus*: *M. paraguayanus*, ocorrente na Mata Atlântica e Cerrado, *M. demerarae*, ocorrente na Amazônia e no Cerrado, *M. regina*, ocorrente na Amazônia e *M. constantiae*, ocorrente a leste da cordilheira dos Andes.

No Brasil, *M. paraguayanus* ocorre do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul, tanto no litoral como no interior (PATTON e COSTA, 2003; GARDNER apud ROSSI et al, 2006). Habita preferencialmente formações florestais da Mata Atlântica, mas também já foi detectado em florestas de galeria e cerradão no interior de São Paulo (GARGAGLIONE et al e TALAMONI e DIAS, apud ROSSI et al, 2006).

Apresenta tamanho médio, com comprimento de cabeça e corpo entre 142 e 250 mm e massa corporal de até 130 g (BIANCONI, apud ROSSI et al, 2006), sendo os machos maiores que as fêmeas. É onívoro-insetívoro e os registros de sua dieta indicam que esta é constituída principalmente por artrópodes e frutos (ROSSI et al, 2006). Possui hábito noturno e preferencialmente arborícola, mas eventualmente pode descer ao chão a procura de alimentos (EMMONS e FEER, 1997; ROSSI et al, 2006; GOULART et al, 2006). O período reprodutivo é sazonal, ocorrendo entre os meses de setembro e abril e as fêmeas frequentemente têm duas ninhadas por estação reprodutiva (QUENTAL et al, 2001). O intervalo entre gerações é de aproximadamente um ano e meio (RODRIGUES, 2004).



Figura 2. Fotos de *Micoureus paraguayanus* (Fotos: Flávia Rocha)

Em fragmentos de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro estudados por Quental *et al.* (2001), as densidades populacionais variaram entre 0,83 e 1,75 indivíduos/ha. Já em uma área de Mata Atlântica em Santa Catarina, Graipel *et al.* (2006) detectaram densidades entre 0,50 e 1,87 ind/ha. As estimativas de área de vida têm variado significativamente, aparentemente em função do método de amostragem empregado. Pires e Fernandez (1999), usando o método de captura, marcação e recaptura com armadilhas, estimaram áreas de uso de 0,1 a 2,45 ha para machos e de 0,1 a 1,1 ha para fêmeas. Moraes Junior e Chiarello (2005) registraram movimentos da espécie através de rádio-telemetria e a análise através do método de Kernel (95%) resultou em estimativas da área de vida de 4,0 a 10,9 ha para machos e 1,3 a 5,9 ha para fêmeas. Ambos os estudos foram realizados em áreas de Mata Atlântica no Rio de Janeiro.

Alguns estudos têm indicado que *M. paraguayanus* possui baixa mobilidade em situações de habitats fragmentados, realizando poucos movimentos entre fragmentos. Pires *et al.* (2002), estudando frequência de movimentos de pequenos mamíferos em

fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, observaram que apenas 1,2% das recapturas de *M. paraguayanus* referiram-se a movimentos entre fragmentos, enquanto que para *Didelphis aurita* essa frequência foi de 19,4%. Com este resultado, os autores classificaram as populações da espécie, nessa área estudada, como uma metapopulação. Os fragmentos onde foram detectados tais movimentos distavam entre si de 145 m a 800 m. Este dado, relativo à distância entre fragmentos, pode levar a interpretação de que existiram deslocamentos de 800 m através da paisagem fragmentada, o que parece ter ocorrido com Rossi *et al.* (2006). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que os deslocamentos entre fragmentos mais distantes tenham ocorrido através da passagem, não detectada pela amostragem, por fragmentos intermediários. Essa hipótese parece coerente ao se observar a disposição dos fragmentos na paisagem da área de estudo, onde existem ao menos três fragmentos intermediários entre os dois mais distantes. Desta forma, seria mais cauteloso supor que os deslocamentos pela matriz foram de até 300 m. Em outro estudo com a espécie, em uma área de Floresta Atlântica de planície na Ilha de Santa Catarina, Goulart *et al.* (2006) também detectou baixa frequência de deslocamentos entre fragmentos, sendo estes separados por 300 m de uma matriz de pastagem.

Apesar do seu tamanho e hábito arborícola, estudos indicam que *M. paraguayanus*, em áreas com cobertura florestal contínua, desloca-se por distâncias comparáveis àquelas percorridas por marsupiais de maior porte. Moraes Junior e Chiarello (2005) detectaram deslocamentos de até 1.140 m em uma noite e Pires *et al.* (2002) registraram movimentos de até 860 m em uma noite.

A baixa mobilidade entre fragmentos de habitat implica na limitação do fluxo gênico, que por sua vez pode acarretar em problemas genéticos para populações de fragmentos mais isolados. Já a baixa densidade populacional implica em populações reduzidas quando os fragmentos são pequenos. Estas populações devem ser mais suscetíveis à perda de variação genética devido à ação da deriva genética, à depressão por endocruzamento e à aleatoriedade demográfica como desvios das razões sexuais (Fernandez *et al.* 2003).

Ainda são poucos os trabalhos que abordaram características genéticas desse marsupial. Pinheiro (2003) estudou a divergência genética entre seqüências do gene mitocondrial citocromo b em espécimes de ecossistemas distintos, com a finalidade de testar a Hipótese dos Gradientes Ecológicos. Rodrigues (2004) avaliou a estrutura genética de *M. paraguayanus* em fragmentos florestais em São Paulo através de quatro regiões de microsatélites. Este trabalho, o único, até o momento, a fazer inferências sobre os efeitos da fragmentação sobre as características genéticas da espécie, identificou uma baixa diversidade

genética e ausência de diferenciação genética entre os grupos de indivíduos dos diferentes fragmentos. Sugeriu-se que a utilização de mais marcadores para a avaliação genética dessa população poderia explicar melhor os resultados.

Rodrigues *et al.* (2006) caracterizou cinco locos de microssatélite para *M. paraguayanus* e mais recentemente, no trabalho de Dias *et al.* (2008), foram caracterizados outros oito locos de microssatélite para a espécie, a partir de marcadores de *Micoureus demerarae*.

Características como a ampla distribuição geográfica, o pequeno intervalo entre gerações, a baixa densidade populacional, e a baixa mobilidade entre fragmentos de habitat, tornam *M. paraguayanus* um bom modelo para estudos populacionais (PINHEIRO, 2003; PIRES *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2004; MORAES-JÚNIOR e CHIARELLO, 2005), principalmente quando se busca investigar as conseqüências da fragmentação de ecossistemas. Considerando isto, no presente trabalho foi analisada, do ponto de vista genético, uma população de *M. paraguayanus* que habita os fragmentos florestais da região do Pontal do Paranapanema, no estado de São Paulo. Estes fragmentos constituem-se nos últimos remanescentes de Mata Atlântica de Interior do estado e, por este motivo, possibilitam uma rara oportunidade para o entendimento da dinâmica dos processos biológicos confrontados com os processos de antropização da paisagem natural. Os resultados obtidos são úteis para definir critérios e ações que visem à conservação e à manutenção de espécies e processos naturais nesta e em outras regiões severamente antropizadas.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi caracterizar a estrutura e diversidade genética de uma população fragmentada de *Micoureus paraguayanus*.

Os objetivos específicos foram:

- Descrever novos marcadores microssatélites para a espécie *M. paraguayanus*;
- Testar a amplificação heteróloga de *primers* do tipo microssatélite conhecidos para a espécie *Monodelphis domestica* em *Micoureus paraguayanus*; e
- Avaliar o efeito do processo de fragmentação de habitat na composição genética de uma população natural de *Micoureus paraguayanus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A região conhecida como Pontal do Paranapanema localiza-se na confluência dos rios Paraná e Paranapanema, no extremo oeste do estado de São Paulo (Figura 3). A formação vegetacional característica é a Floresta Estacional Semidecidual, também conhecida como Mata Atlântica de Interior. O clima é classificado pelo sistema de Koppen como Cwa, mesotérmico, de invernos secos e temperaturas médias anuais ligeiramente inferiores a 22° C. A sazonalidade é uma característica importante do clima, sendo que no inverno frio e seco predominam temperaturas entre 15 e 20° C e no verão quente e úmido são registradas temperaturas acima de 35° C. As precipitações anuais estão em torno de 1100 e 1700 mm.

O Pontal do Paranapanema é a região mais recentemente devastada de São Paulo, sendo que este processo iniciou-se por volta de 1942 (FERRARI-LEITE, 1998). Devido ao processo de expansão das atividades agrícolas, atualmente as áreas florestadas restringem-se a cerca de 1,85% da área ocupada originalmente (MARTINS et al, 2008). Ainda assim, nesta região encontra-se uma grande parte dos remanescentes dessa formação vegetacional, dividida entre o Parque Estadual do Morro do Diabo – PEMD, com 371,56 km² (localizado entre as coordenadas 22°16' e 22°40'S e 52°05' e 52°30'W), e diversos fragmentos que juntos somam aproximadamente 210 km² (Figura 3). A matriz que separa os fragmentos florestais da região é composta principalmente por pastagens e agricultura, que representam aproximadamente 58,0 e 18,5 % da paisagem, respectivamente (Meneguette, 2001).

3.2 Obtenção de amostras

Alíquotas de DNA de *Micoureus paraguayanus* obtidas a partir de amostras de tecido de indivíduos coletados nos anos de 2002 e 2003 foram cedidas pelo pesquisador Dr. Fernando Pacheco Rodrigues.

No total foram utilizadas amostras de 95 indivíduos provenientes de 6 áreas, o Parque Estadual Morro do Diabo e outros cinco fragmentos florestais do seu entorno (Figura 4). A Tabela 1 descreve o tamanho, a distância, o tempo de fragmentação e o número de indivíduos coletados em cada fragmento de habitat.

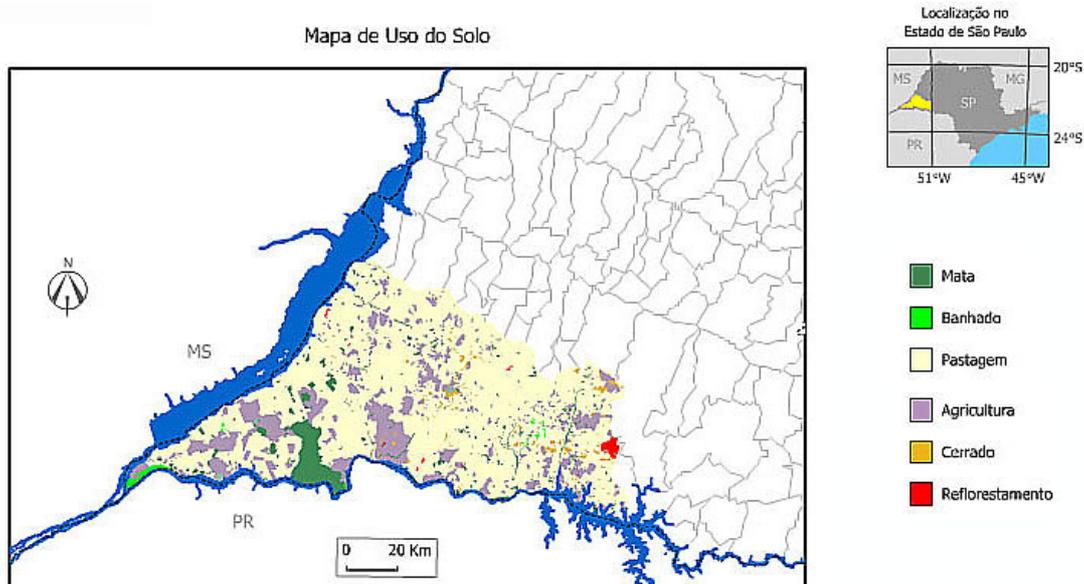


Figura 3 Região do Pontal do Paranapanema e uso do solo (Fonte: Meneguette, 2001).

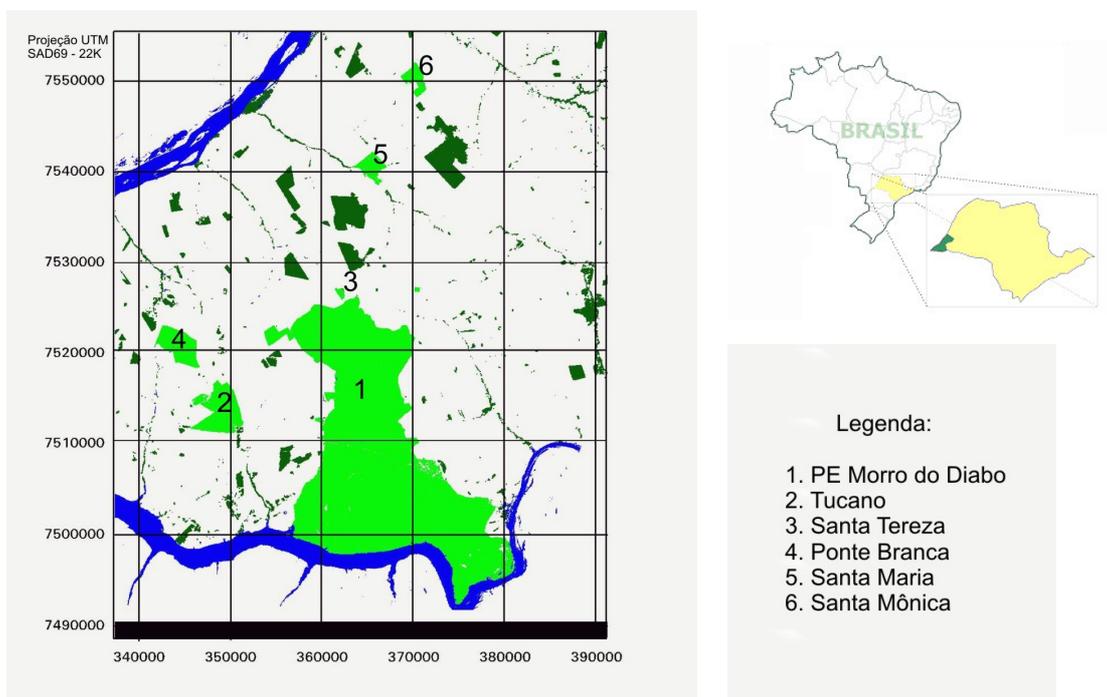


Figura 4 Mapa da região do Pontal do Paranapanema mostrando o Parque Estadual Morro do Diabo e os fragmentos florestais remanescentes. As áreas amostradas estão enumeradas de 1 a 6.

Tabela 1 Características das áreas amostradas e número de indivíduos amostrados de *Micoureus paraguayanus*.

Área	Tamanho (km ²)	Distância do PEMD (km)	Nº de indivíduos de <i>M. paraguayanus</i>
PEMD	37156,00	--	8
Tucano	1990,00	9,00	8
Santa Teresa	83,00	0,32	17
Ponte Branca	1195,00	7,90	22
Santa Maria	441,00	13,20	12
Santa Mônica	584,00	23,00	28

3.3 Isolamento de marcadores do tipo microsatélite

3.3.1 Biblioteca genômica

Para isolar os locos de microsatélite foi utilizada a técnica de enriquecimento de biblioteca genômica com microsatélites que se baseia no processo de hibridação subtrativa pelo uso de contas magnéticas encapsuladas com estreptavidina. Como tais contas têm grande afinidade por biotina, foram usadas para “pescar” regiões no genoma ricas em repetições pelo uso de oligonucleotídeos biotinilados. Este procedimento aumenta sobremaneira a proporção de microsatélites na biblioteca genômica de DNA antes da clonagem. Essa técnica foi desenvolvida por Hamilton *et al.* (1999) e modificada neste trabalho, conforme descrito a seguir:

O protocolo de enriquecimento de biblioteca genômica iniciou-se com a extração de DNA genômico de dois indivíduos da espécie *M. paraguayanus*. Esses DNAs foram digeridos com enzimas de restrição (AluI, HaeIII e RsaI). Os fragmentos entre 300 e 600 pb foram cortados de um gel de agarose e purificados através de precipitação diferencial com PEG (Polietileno Glicol) 8000 (LIS e SCHLEIF, 1975), ressuspensos e ligados a adaptadores. Após esta ligação, os fragmentos foram amplificados para confirmar sua ligação aos adaptadores e subsequentemente hibridizados a sondas biotiniladas contendo seqüências repetitivas para microsatélites tetranucleotídeos (AACC₅, GACA₅ e GATA₅). Fragmentos ricos em repetições de microsatélites foram capturados através da interação entre esferas magnéticas/estreptavidina + sonda/biotina + DNA e clonados em bactérias competentes usando-se o kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas), de acordo com especificações do fabricante. As colônias recombinantes foram selecionadas e mais de 800 colônias foram

replaqueadas para permitir manutenção e replicação das mesmas até o momento de sua utilização (Anexo I).

A avaliação da presença de inserto nas colônias recombinantes foi feita por PCR direta de colônia (DALLAS-YANG et al, 1998), com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* que amplificam regiões flanqueando a região do inserto no clone. Foram purificados com PEG cerca de 150 insertos com tamanho entre 300 e 600 nucleotídeos.

3.3.2 Sequenciamento

Os fragmentos purificados dos clones foram seqüenciados utilizando-se o kit *DYEnamicTM Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare) de acordo com especificações do fabricante. O produto foi corrido em seqüenciador automático MegaBACE 750 localizado no Laboratório de Genética Bioquímica do DGE – UFSCar.

3.3.3 Determinação de *primers* para amplificação de microssatélite

Na avaliação das seqüências obtidas foram consideradas, para o estabelecimento de *primers*, regiões contendo no mínimo três repetições de microssatélites hexa ou pentanucleotídico, quatro repetições de microssatélites tetra ou trinucleotídico e dez repetições de microssatélites dinucleotídico. Os *primers* foram determinados com o auxílio do programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software) e dos endereços eletrônicos: <http://www.idtdna.com> e <http://www.fastpcr.com>. Para a definição dos *primers* também foram considerados os seguintes critérios: maior número de bases C e G em especial na extremidade 3', poucos ou nenhum *hairpin* evitando essas formações na extremidade 3', alta temperatura de *melting* e baixo ΔK .

3.4 Síntese dos *primers* e amplificação das regiões microssatélites isoladas

Os *primers* desenvolvidos para as regiões microssatélites isoladas foram sintetizados e utilizados para a amplificação dos marcadores através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As reações de amplificação foram feitas em volume de

15ul, que continham 50ng de DNA, 10mM Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 uM de cada dNTP, 0,5 de cada *primer* e 0,5 unidade de *Taq* polimerase (PHT). A amplificação dos *primers* foi padronizada em um termociclador PTC-100 (BioRad) com gradiente de temperatura, o que permitiu que várias temperaturas de anelamento diferentes fossem testadas de uma única vez. As condições da PCR, para a maioria dos *primers*, foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 94°C por 1 min; em seguida, 3 ciclos iniciais de 94°C por 30s, temperaturas que variaram entre 57-63°C (três graus acima da temperatura de anelamento) por 30s e 72°C por 30s; depois outros 30 ciclos com 94°C por 30 s, temperaturas de anelamento que variaram entre 54-60°C por 30s e 72°C por 30s; finalizado com 72°C por 10 min. Este programa, com três ciclos com a temperatura ligeiramente mais alta que a temperatura de anelamento, foi usado para aumentar a especificidade do *primer*, diminuindo assim a ocorrência de bandas inespecíficas. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%, feito com TBE e corado com brometo de etídio.

Após o estabelecimento das condições ideais de amplificação, tais *primers* foram utilizados em PCRs individuais de diferentes indivíduos da população estudada. Nesta etapa, usou-se o termociclador PE 9700 (PE Biosystems).

A partir de então, houve amplificação dos locos e alguns indivíduos foram genotipados na forma multiplex, na qual são usados de dois a três locos de microssatélite na mesma reação, considerando o tamanho do fragmento esperado e a fluorescência na sua cauda. Foi utilizado 1ul de cada um dos produtos das PCR para os multiplex. Em seguida, 1 µL dessa diluição foi colocado em placa de 96 poços, e adicionados 1 µL de marcador interno fluorescente (ROX) e 9 µL de formamida, para análise em gel poliacrilamida desnaturantes a 7% em um seqüenciador de DNA ABI 377. A detecção e a estimativa do tamanho dos alelos, em pares de base, foram realizadas com o uso dos programas GeneScan (GENESCAN 3.7, 2001) e Genotyper (GENOTYPER 3.7, 2000).

3.5 Utilização de *primers* (heterólogos e espécie-específicos) desenvolvidos por outros pesquisadores

Além dos *primers* desenvolvidos no presente trabalho foram utilizados também *primers* desenvolvidos por outros autores. Foram selecionados 5 *primers* (Mdo2L022, Mdo3L024, Mdo4L028, Mdo6L032 e Mdo7L033) descritos originalmente para *Monodelphis domestica* por Samollow *et al.* (2004) e 7 *primers* desenvolvidos para *Micoureus*

paraguayanus por Dias *et al.* (2008) (Mdem09, Mdem12 e Mdem15) e Rodrigues (dados não publicados – Mpa06, Mtra41, Mtra55 e Mtra75).

3.6 Análise estatística

Para os locos que apresentaram polimorfismos foram avaliados o número de alelos, suas frequências, as heterozigosidades esperada e observada, o desequilíbrio de ligação para pares de locos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do software Arlequin (EXCOFFIER *et al.*, 2005). O programa MicroChecker (OOSTERHOUT *et al.*, 2003) foi utilizado para verificar a probabilidade de ocorrência de alelo nulos para os locos em cada população. O programa Cervus 3.0.3 (MARSHALL, 1998), serviu para calcular o Conteúdo de Informação de Polimorfismo – PIC. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se níveis de significância de 0,017 ou 0,005, de acordo com as correções de B-Y FDR (NARUM 2006) ou Bonferroni (RICE, 1989), respectivamente.

O software Bottleneck vs 1.2.02 (CORNUET e LUIKART, 1996) foi utilizado para testar para desvios do modelo de Wright-Fisher de equilíbrio mutação e deriva. Este software utiliza simulações através da coalescência segundo modelo modificado de Hudson (1996), considerando três modelos de evolução distintos, IAM (modelo de alelos infinitos), SMM (modelo de mutação por passos) e TPM (modelo de duas fases de mutação), que é intermediário aos dois anteriores, para estimar valores esperados de heterozigosidade considerando o número de alelos observado. Estes valores são contrastados com valores observados, considerando a premissa de que, em um gargalo evolutivo recente e rápido, o efeito é maior sobre o número de alelos e menor sobre a heterozigosidade. Este software faz três testes distintos, um primeiro, chamado de “sign test”, com pouco poder estatístico, que considera o número esperado de locos que desviariam significativamente dos valores de heterozigosidade. Um segundo teste, “standardized differences test”, tem mais poder estatístico quando pelo menos 20 locos são amostrados e considera qual a probabilidade de desvio do equilíbrio mutação-deriva se todos os locos estiverem evoluindo de acordo com o modelo de mutação específico. O terceiro teste, “Wilcoxon sign-rank test” tem maior poder estatístico e pode ser utilizado com um menor número de locos, embora seja recomendado ao menos entre 15 e 40 indivíduos e 10-15 locos (LUIKART *et al.*, 1997). Todos estes testes são considerados em conjunto para se investigar se populações apresentam desvios significativos do Equilíbrio Wright-Fisher.

Para se avaliar a existência de correlação entre a distância genética e a distância geográfica entre os indivíduos amostrados, realizamos o teste de Mantel conforme implementado pelo programa GeneAlEx VS. 6.1 (PEAKALL e SMOUSE, 2007). Além disso, o número de migrantes por geração (Nm) foi avaliado entre pares de populações, calculado através dos valores de M baseados em F_{st} e R_{st} , também com o auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER et al, 2005).

A diferenciação e estruturação genética foram avaliadas através da utilização de diversas metodologias. O grau de diferenciação genética entre os pares de populações foi avaliado através da estimativa dos valores de F_{st} (WEIR e COCKERHAM, 1984) e R_{st} (SLATKIN, 1995) utilizando-se o software Arlequin (EXCOFFIER et al, 2005).

Para a análise da estrutura populacional foram ainda utilizados os programas Tess (FRANÇOIS et al, 2006; CHEN et al, 2007) e Structure (PRITCHARD et al, 2000) por apresentarem bons resultados na identificação de baixos níveis de diferenciação populacional (CHEN et al, 2007; GAUFFRE et al, 2008). Ambos os programas são baseados em análises Bayesianas, sendo que o Structure baseia-se apenas nos dados genéticos para identificar a diferenciação da população, enquanto que o Tess é um programa que leva em consideração os dados geográficos nas suas análises. Nos programas Tess e Structure os seguintes parâmetros foram testados: modelo de ancestralidade; número de corridas; número de agrupamentos (K); parâmetro de interação espacial (Ψ); período de “*burning*” antes da coleta dos dados e número de Markov Chain Monte Carlo – MCMC após o “*burn in*”. Na análise de estruturação genética entre populações também foram considerados os dados de F_{st} e R_{st} gerados pelo programa Arlequin.

Tabela 2 Relação dos *primers* testados na espécie *Micoureus paraguayanus*. Os números da tabela correspondem a: 1 – *primer* desenvolvido neste trabalho para *Micoureus paraguayanus*; 2 – *primer* desenvolvido por outro pesquisador para *M. paraguayanus* e que ainda não havia sido testado; 3 – *primer* desenvolvido para *Monodelphis domestica*; e 4 – *primer* desenvolvido para *M. paraguayanus*.

Origem do primer	Loco	Seqüência do primer (5' - 3')	Repetição	Tamanho (pb)
1	26.1	F: TCATGATCCCCTACACACACAC R: GTAACCCAGTGGAATTGCTTGGCA	(AC)33	111
1	41.4	F: AGACGGATAGATAGACGACAG R: TGTCCATGCGTCCGTCATCTGTC	(CA)32 (CT)8	111
1	37.1	F: GTAAGTGTCTCCAGCCTGAA R: CTGAAAAGACACAGGATAGAGAG	(AGAC)6	220
1	43.2*	F: ACTGGTGCTGCTTCCACTGGTG R: CATGCTGGAAGCCCCCTACAGGAA	(GCTGGT)3	139
1	44.2	F: GCATGTTCCATCTGCTCCGGCA R: ACCTGCACACACGCACACACTTGG	(GTGTGC)4	117
1	49.2	F: GCAGGGGAAGAAGAACAGAGATTTAAGTGT R: AAGTGACCTTCTTGCCAAGGA	(GT)23	269
1	51.2*	F: TGGTGGCAAATAGTTCTGCCACAC R: CAGTGCTCAGAACAATGCAGGCTC	(CAG)3	203
2	Mpa06*	F: TTCCAGCTACACATCCACAC R: ACTTCCAACCTCTCATCTTTAG	(CA)18	212
2	Mtra 41*	F: TGTTTGTGGAGCTTGTGG R: GCCTAGAGCCGAATTCAC	(CA)20	322
2	Mtra 55	F: ATGACGTATAGCAAAGGC R: CACTATAGGGAAAGCTCG	(GT)13	159
2	Mtra 75	F: GGTTTCTAGATTCCATGTTG R: AATCCTTCCCCTCTTCC	(GT)23	121
3	Mdo 2L022	F: TTGGCTCTCTGCTTTCCAAT R: AGCACATGCAGTCCTTTGAA	(GT)12	161–181
3	Mdo 3L024	F: TTTGTAGGGAGGTAGAAGATAGG R: TGTGTTCAATGTGGGTCTCAA	(GA)29	173–215
3	Mdo 4L028*	F: TTTCTGCATTGTCCATGTCC R: CACATTGCCCATTTCTGAT	(CA)15	135–153
3	Mdo 6L032	F: CATTCTTCATTTTCATGACCAC R: GTACTGGGCAACAGTATATTGAG	(CA)13	92–108
3	Mdo 7L033	F: CCTTGGGCATGATCAAGTTT R: TGCATGACCAAACACCTAA	(CA)20	158–162
4	Mdem 09*	F: GCGTTATTTGAATTTTACAGAAACC R: TGTCCAATTCTCTCCAGTTGC	(AG)9	244–260
4	Mdem 12*	F: GTACCATCACGGGCTTTGAC R: GGCTGTCCAAAAGAGGATG	(AG)9	165–199
4	Mdem15*	F: TGCTCTGTGGAGGATTGTGA R: CCCAGTGGGATAGCTCCTC	(TG)18	194–246

* loco cujo produto de amplificação permitiu a verificação de polimorfismos.

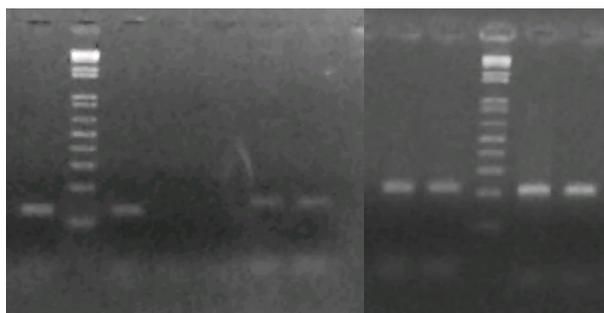


Figura 6 *Primers* 44.2, Mdo4L028, Mpa06 e 51.2, testados em dois indivíduos, respectivamente nas colunas 1 e 3; 6 e 7; 8 e 9; 11 e 12. Nas colunas 4 e 5 testou-se outro *primer* que não apresentou produto de amplificação.

Após a avaliação do sucesso de amplificação, procedeu-se a genotipagem de 20 indivíduos com os oito *primers* selecionados visando a verificação de polimorfismos. Os *primers* 43.2, 44.2 e 51.2 apresentaram microssatélites monomórficos enquanto os *primers* Mpa06, Mdo4L028, Mdem09, Mdem12 e Mdem15 apresentaram polimorfismos. A temperatura de anelamento utilizada e o número de alelos encontrados para cada loco avaliado neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Temperatura de anelamento e número de alelos para os *primers* 43.2, 44.2, 51.2, Mpa06, Mdo4L028, Mdem09, Mdem12 e Mdem15 para *Micoureus paraguayanus*.

Loco	T_a (°C)	Número de alelos
43.2	60	1
44.2	60	1
51.2	54	1
Mpa06	56	9
Mdo4L028	60	5
Mdem09	58	4
Mdem12	58	10
Mdem15	58	5

Uma vez selecionados os locos polimórficos, estes foram utilizados para a genotipagem das 95 amostras disponíveis.

4.3 Diversidade genética

Para as análises de diversidade genética foram utilizados dez locos, sendo cinco anteriormente analisados por Rodrigues (2004) (Mpa01, Mpa02, Mpa03, Mpa04,

Mpa05) e cinco avaliados neste trabalho (Mpa06, Mdo4L028, Mde09, Mdem12 e Mdem15). A diversidade genética obtida com cada loco é apresentada na Tabela 4.

Foram encontrados 61 alelos nos dez locos analisados, sendo que o número de alelos por loco variou de 4 a 10, e a diversidade alélica foi igual a 6,1. A heterozigosidade média observada foi de 0,488 (Tabela 4). O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou entre 0,310 e 0,801, com um valor médio de 0,485.

Tabela 4 Diversidade genética de *Micoureus paraguayanus* da região do Pontal do Paranapanema, SP, obtida através da análise de 10 locos do tipo microssatélite. É fornecido o número de alelos identificados em cada loco (N_a); o número total de alelos (N_t); o número médio de alelos; a heterozigosidade encontrada em cada loco (H_m); a heterozigosidade total média; o conteúdo de informação polimórfica (PIC); e o PIC médio.

	N_a	H_m	PIC
<i>Mpa01</i>	4	0,369	0.322
<i>Mpa02</i>	5	0,337	0.401
<i>Mpa03</i>	6	0,569	0.504
<i>Mpa04</i>	6	0,393	0.310
Locos <i>Mpa05</i>	7	0,384	0.334
<i>Mpa06</i>	9	0,496	0.515
<i>Mdo4L028</i>	5	0,650	0.505
<i>Mdem09</i>	4	0,320	0.523
<i>Mdem12</i>	10	0,843	0.801
<i>Mdem15</i>	5	0,516	0.633
Médias	6,1	0,488	0.485
N_t	61		

A Tabela 5 contém as características genéticas de cada loco por fragmento. As populações que apresentaram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando a correção estatística de Bonferroni ($\alpha=0,005$), foram as de Ponte Branca e Santa Mônica para o loco Mdem09 e a de Santa Teresa para os locos Mpa02 e Mdem09. Considerando a correção pelo método B-Y FDR ($\alpha=0,017$), além das populações já citadas, estariam violando o equilíbrio de Hardy-Weinberg as populações de Tucano para o loco Mdem09 e de Santa Mônica para o loco Mdem12.

A presença de alelos nulos foi sugerida pelas análises do programa MicroChecker, principalmente no loco Mpa02 em Santa Teresa, Ponte Branca, Santa Maria e Santa Mônica; no loco Mpa04 e Mpa05 em Santa Mônica; no loco Mdem09 no PEMD, Tucano, Santa Teresa, Ponte Branca e Santa Mônica; e no loco Mdem12 no PEMD, Tucano, Santa Teresa e Ponte Branca. A estimativa das frequências desses alelos nulos em cada uma das populações é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 Características dos locos de microssatélites de *Micoureus paraguayanus*, nas seis áreas amostradas no Pontal do Paranapanema, SP. Entre parênteses: indivíduos genotipados na localidade; N° alelos = número de alelos por localidade; H_o e H_e = Heterozigosidades observadas e esperadas; P = valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg; r = estimativa da frequência de alelos nulos de acordo com Brookfield (1996).

Loco	Área amostrada					
	PEMD (8)	Tucano (8)	Santa Teresa (17)	Ponte Branca (22)	Santa Maria (12)	Santa Monica (28)
<i>Mpa01</i>						
N° de alelos	3	4	4	2	2	3
Faixa de tamanho	185-189	185-191	185-191	185-189	185-187	185-189
H_e	0,517	0,533	0,447	0,089	0,409	0,411
H_o	0,500	0,375	0,471	0,091	0,417	0,357
P	1,000	0,391	0,761	1,000	1,000	0,050
r	0,0	0,028	0,0	0,0	0,0	0,033
<i>Mpa02</i>						
N° de alelos	3	2	3	3	3	3
Faixa de tamanho	139-143	139-141	139-145	139-145	137-141	139-145
H_e	0,658	0,542	0,437	0,439	0,543	0,390
H_o	0,625	0,375	0,176	0,273	0,250	0,321
P	0,230	1,000	0,002 ⁺ #	0,041	0,018	0,150
r	0,0	0,038	0,174	0,109	0,141	0,045
<i>Mpa03</i>						
N° de alelos	5	4	3	4	3	3
Faixa de tamanho	148-178	148-168	164-168	148-168	164-176	148-168
H_e	0,733	0,750	0,169	0,542	0,605	0,575
H_o	0,750	0,750	0,176	0,545	0,583	0,607
P	0,633	0,359	1,000	0,902	0,541	0,817
r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Mpa04</i>						
N° de alelos	4	4	3	2	6	2
Faixa de tamanho	197-205	197-203	199-203	199-205	197-207	199-201
H_e	0,517	0,575	0,358	0,130	0,721	0,103
H_o	0,625	0,625	0,353	0,136	0,583	0,036
P	1,000	0,550	0,539	1,000	0,440	0,054
r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,030	0,060
<i>Mpa05</i>						
N° de alelos	4	4	4	2	7	2
Faixa de tamanho	143-153	143-149	145-153	145-153	141-155	145-147
H_e	0,442	0,575	0,408	0,172	0,198	0,779
H_o	0,500	0,625	0,353	0,136	0,107	0,583
P	1,000	0,567	0,559	1,000	0,179	0,133
r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,073	0,048

⁺ valores estatisticamente menores que $\alpha=0,017$ (correção pelo método de B-Y FDR); [#] valores estatisticamente menores que $\alpha=0,005$ (correção pelo método Bonferroni).

Tabela 5 Características dos locos de microssatélites de *Micoureus paraguayanus*, nas seis áreas amostradas no Pontal do Paranapanema, SP. Entre parênteses: indivíduos genotipados na localidade; N° alelos = número de alelos por localidade; *Ho* e *He* = Heterozigosidades observadas e esperadas; *P* = valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg; *r* = estimativa da frequência de alelos nulos de acordo com Brookfield (1996). (continuação)

Loco	Área amostrada					
	PEMD (8)	Tucano (8)	Santa Teresa (17)	Ponte Branca (22)	Santa Maria (12)	Santa Monica (28)
<i>Mpa 06</i>						
N° de alelos	4	5	3	5	8	4
Faixa de tamanho	206-232	206-230	212-230	206-230	206-232	206-228
<i>He</i>	0,442	0,533	0,171	0,517	0,768	0,637
<i>Ho</i>	0,500	0,500	0,118	0,545	0,667	0,643
<i>P</i>	1,000	0,565	1,000	0,776	0,537	0,877
<i>r</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,032	0,0
<i>Mdo 4L028</i>						
N° de alelos	3	4	3	3	5	3
Faixa de tamanho	148-150	138-154	138-150	148-152	138-154	138-150
<i>He</i>	0,542	0,517	0,613	0,556	0,728	0,510
<i>Ho</i>	0,750	0,625	0,647	0,591	0,750	0,536
<i>P</i>	0,629	1,000	1,000	0,375	0,962	1,000
<i>r</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Mdem 09</i>						
N° de alelos	4	3	4	4	2	4
Faixa de tamanho	244-250	244-248	244-250	244-250	244-248	244-250
<i>He</i>	0,675	0,683	0,497	0,640	0,359	0,635
<i>Ho</i>	0,375	0,125	0,176	0,409	0,333	0,500
<i>P</i>	0,046	0,007 ⁺	0,002 ^{+#}	0,000 ^{+#}	1,000	0,000 ^{+#}
<i>r</i>	0,107	0,284	0,178	0,116	0,0	0,075
<i>Mdem 12</i>						
N° de alelos	6	6	7	6	7	9
Faixa de tamanho	160-174	156-172	158-176	156-172	156-176	156-176
<i>He</i>	0,900	0,833	0,774	0,724	0,783	0,834
<i>Ho</i>	0,875	1,000	0,882	0,682	0,833	0,786
<i>P</i>	0,441	0,876	0,678	0,431	0,749	0,010 ⁺
<i>r</i>	0,0	0,0	0,075	0,011	0,0	0,0
<i>Mdem 15</i>						
N° de alelos	4	5	4	5	3	4
Faixa de tamanho	223-229	223-231	223-231	223-231	223-227	223-229
<i>He</i>	0,533	0,750	0,702	0,663	0,598	0,675
<i>Ho</i>	0,375	0,500	0,588	0,409	0,583	0,643
<i>P</i>	0,197	0,180	0,027	0,017	0,246	0,723
<i>r</i>	0,078	0,115	0,050	0,145	0,0	0,012

⁺ valores estatisticamente menores que $\alpha=0,017$ (correção pelo método de B-Y FDR); [#] valores estatisticamente menores que $\alpha=0,005$ (correção pelo método Bonferroni).

A frequência dos alelos encontrados nas diferentes áreas amostradas está descrita na Tabela 6 e representada através de histogramas na Figura 7. Foi verificada a presença de alelos exclusivos no PEMD, para os locos Mpa02 (19%) e Mpa03 (6%); em Santa Teresa, nos locos Mpa06 (3%) e Mdem12 (3%); em Santa Maria, nos locos Mpa02 (17%), Mpa03 (13%), Mpa04 (4%) e Mpa05 (8% e 4%); e em Santa Mônica no loco Mdem12 (2%).

A diversidade média das áreas bem como os resultados dos testes de desvio de equilíbrio mutação-deriva, realizados no software Bottleneck, são apresentados na Tabela 7. Na Figura 8, a diversidade é representada pela média da heterozigosidade observada em cada fragmento, comparada com a heterozigosidade esperada. Na Tabela 8 é apresentada a heterozigosidade por loco na análise de toda a população sem considerar grupos populacionais em cada área amostrada. Os Locos Mpa02, Mdem09 e Mdem15 apresentaram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg na análise da população como um todo. A Figura 9 mostra as proporções de heterozigosidade observada e esperada por loco na população com um todo.

Tabela 6 Frequência dos alelos encontrados em *Micoureus paraguayanus* por localidade e por loco. Os alelos estão colocados de acordo com seu tamanho em pares de base. Entre parênteses: número de indivíduos coletados na localidade.

	Mpa01				Mpa02					Mpa03						Mpa04					
	185	187	189	191	137	139	141	143	145	148	164	166	168	176	178	197	199	201	203	205	207
PEMD (8)	0,75	0,19	0,06	–	–	0,50	0,31	0,19*	–	0,06	0,44	0,13	0,31	–	0,06*	0,06	0,69	0,19	–	0,06	–
Tucano (8)	0,75	0,06	0,06	0,13	–	0,69	0,31	–	–	0,07	0,31	0,31	0,31	–	–	0,06	0,63	0,25	0,06	–	–
Santa Teresa (17)	0,73	0,06	0,12	0,09	–	0,73	0,12	–	0,15	–	0,91	0,03	0,06	–	–	–	0,80	0,11	0,09	–	–
Ponte Branca (22)	0,95	–	0,05	–	–	0,71	0,27	–	0,02	0,02	0,64	0,11	0,23	–	–	–	0,93	–	–	0,07	–
Santa Maria (12)	0,79	0,21	–	–	0,17*	0,71	0,12	–	–	–	0,54	–	0,33	0,13*	–	0,25	0,54	0,09	0,04	0,04	0,04*
Santa Mônica (28)	0,75	0,16	0,09	–	–	0,75	0,23	–	0,02	0,09	0,54	–	0,37	–	–	–	0,95	0,05	–	–	–
Total (95)	0,79	0,11	0,06	0,04	0,03	0,68	0,23	0,03	0,03	0,04	0,56	0,10	0,27	0,02	0,01	0,04	0,56	0,10	0,27	0,02	0,01

	Mpa05						Mpa06							Mdo4L028							
	141	143	145	147	149	153	155	206	208	210	212	214	226	228	230	232	138	148	150	152	154
PEMD (8)	–	0,06	0,75	0,13	–	0,06	–	0,06	–	–	0,75	–	–	–	0,13	0,06	0,06	0,31	0,63	–	–
Tucano (8)	–	0,06	0,63	0,25	0,06	–	–	0,06	–	0,06	0,69	–	–	0,06	0,13	–	0,06	0,06	0,69	–	0,19
Santa Teresa (17)	–	–	0,79	0,12	0,06	0,03	–	–	–	–	0,94	0,03*	–	–	0,03	–	0,15	0,29	0,56	–	–
Ponte Branca (22)	–	–	0,93	–	–	0,07	–	0,09	–	0,14	0,7	–	0,05	–	0,02	–	–	0,39	0,59	0,02	–
Santa Maria (12)	0,08*	0,25	0,46	0,09	0,04	0,04	0,04*	0,04	0,13	0,04	0,46	–	0,04	0,21	0,04	0,04	0,04	0,5	0,21	0,21	0,04
Santa Mônica (28)	–	–	0,91	0,09	–	–	–	0,14	0,02	–	0,5	–	–	0,34	–	–	0,09	0,23	0,68	–	–
Total (95)	0,01	0,06	0,74	0,11	0,03	0,03	0,01	0,07	0,03	0,04	0,67	0,01	0,02	0,10	0,06	0,02	0,07	0,3	0,56	0,04	0,04

	Mdem09				Mdem12							Mdem15							
	244	246	248	250	156	158	160	162	164	166	168	172	174	176	223	225	227	229	231
PEMD (8)	0,25	0,06	0,63	0,06	–	–	0,14	0,22	–	0,29	0,14	0,07	0,14	–	0,12	0,69	0,13	0,06	–
Tucano (8)	0,31	0,13	0,56	–	0,06	–	0,19	0,25	–	0,31	0,06	0,13	–	–	0,06	0,38	0,38	0,06	0,12
Santa Teresa (17)	0,15	0,06	0,73	0,06	–	0,03*	0,38	0,03	–	0,26	0,06	0,12	–	0,12	0,35	0,41	–	0,18	0,06
Ponte Branca (22)	0,57	0,14	0,25	0,04	0,16	–	0,09	0,48	–	0,18	0,07	0,02	–	–	0,14	0,52	0,09	0,02	0,23
Santa Maria (12)	0,17	–	0,83	–	0,21	–	0,08	0,13	–	0,42	–	0,04	0,08	0,04	0,21	0,58	0,21	–	–
Santa Mônica (28)	0,45	0,05	0,41	0,09	0,17	–	0,08	0,08	0,02*	0,32	0,06	0,23	0,02	0,02	0,23	0,48	0,22	0,07	–
Total (95)	0,32	0,07	0,57	0,04	0,10	0,01	0,16	0,20	0,00	0,30	0,07	0,10	0,04	0,03	0,19	0,51	0,17	0,07	0,07

* alelo exclusivo de uma das áreas amostradas.

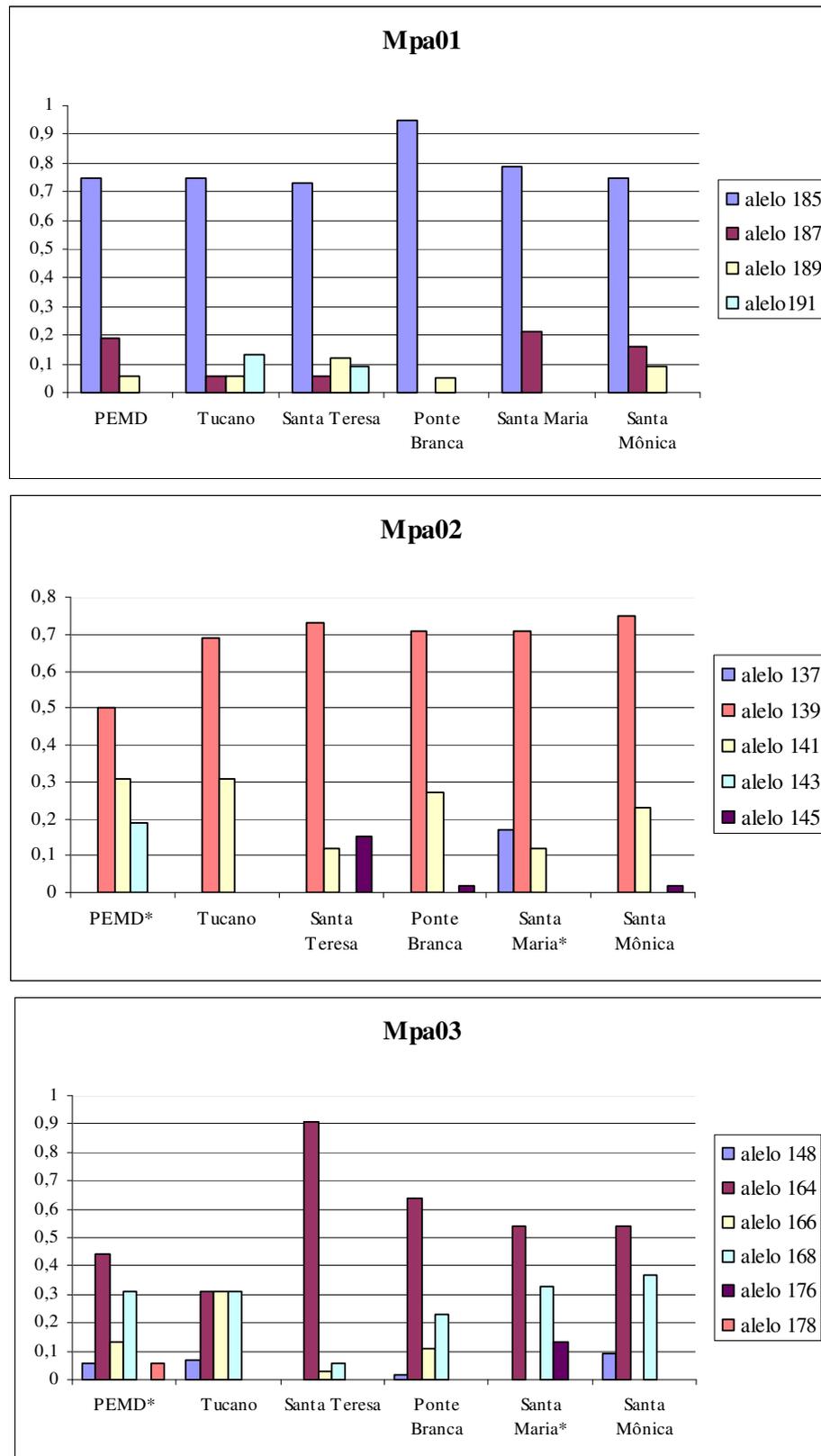


Figura 7a Histogramas com as representações das freqüências alélicas em cada loco dos indivíduos amostrados por fragmento florestal. Os asteriscos (*) junto ao nome da área amostrada indicam a presença de alelos exclusivos.

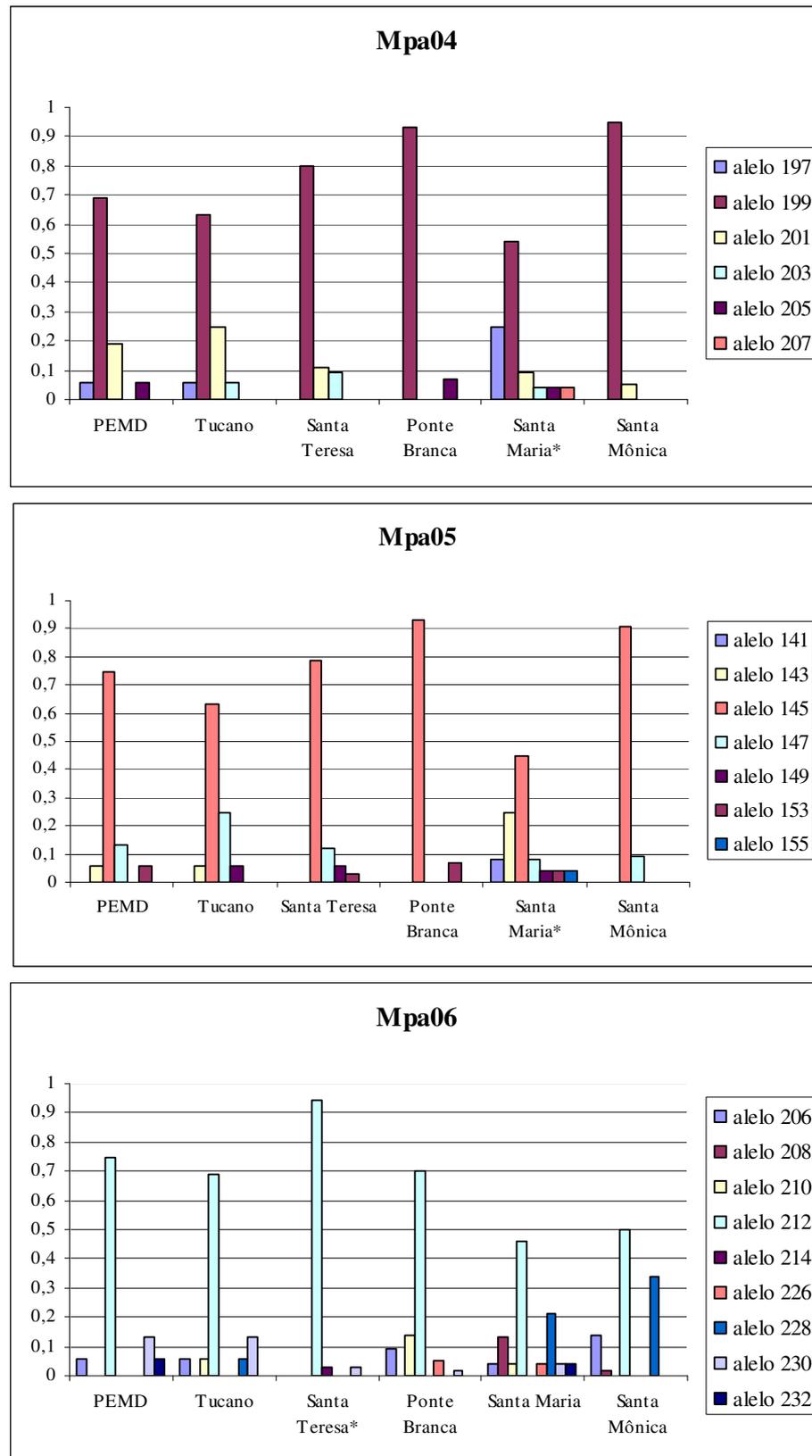


Figura 7b Histogramas com as representações das frequências alélicas em cada loco dos indivíduos amostrados por fragmento florestal. Os asteriscos (*) junto ao nome da área amostrada indicam a presença de alelos exclusivos. (continuação)

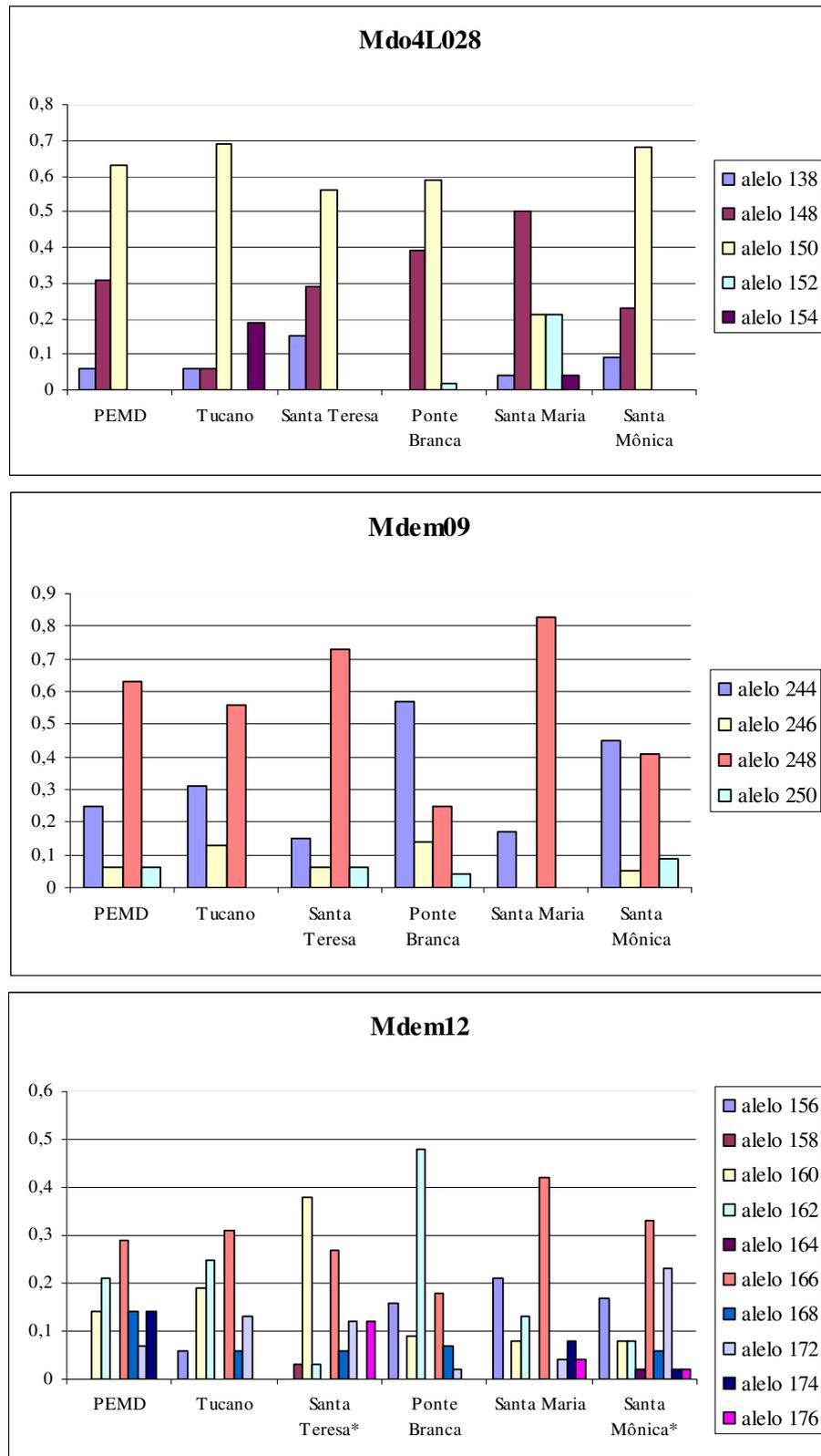


Figura 7c Histogramas com as representações das frequências alélicas em cada loco dos indivíduos amostrados por fragmento florestal. Os asteriscos (*) junto ao nome da área amostrada indicam a presença de alelos exclusivos. (continuação)

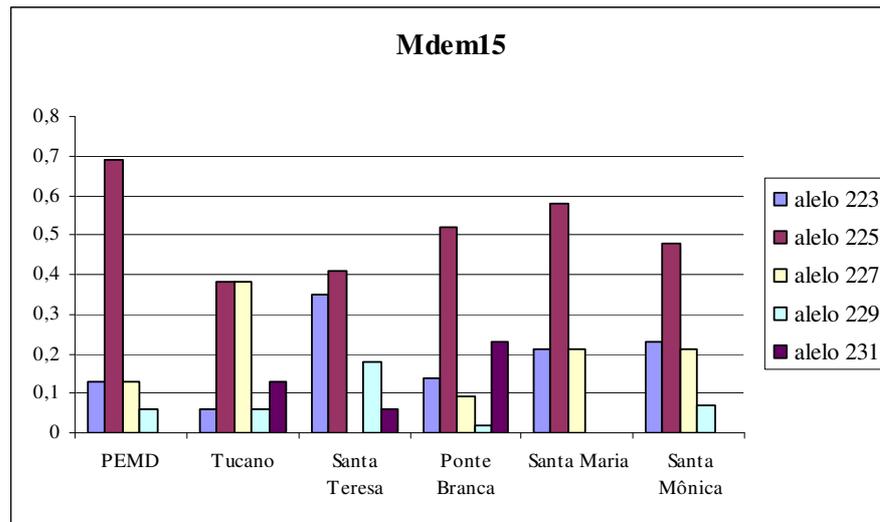


Figura 7d Histogramas com as representações das frequências alélicas em cada loco dos indivíduos amostrados por fragmento florestal. Os asteriscos (*) junto ao nome da área amostrada indicam a presença de alelos exclusivos. (continuação)

Tabela 7 Heterozigosidades observada e esperada médias para cada uma das áreas amostradas e significância destes valores quando contrastados com simulações de coalescência e diferentes modelos mutacionais (IAM, TPM e SMM). Para descrição de testes e modelos evolutivos, vide texto. Entre parênteses: indivíduos genotipados na localidade; Na = número de alelos por localidade; H_{def} – Deficiência de heterozigosidade; H_{exc} – Excesso de heterozigosidade

	PEMD (8)	Tucano (8)	Santa Teresa (17)	Ponte Branca (22)	Santa Maria (12)	Santa Mônica (28)
H_o	0,588	0,550	0,394	0,382	0,511	0,501
H_e	0,596	0,629	0,458	0,447	0,571	0,555
N_a	40	41	38	36	46	37
“Sign test”	IAM					
	TPM					
	SMM	P<0.01		P<0.01	P<0.005	
“T2 test”	IAM					P<0.05
	TPM	P<0.02		P<0.02		
	SMM	P<0.001	P<0.005	P<0.0001	P<0.01	P<0.001
“Sign rank-test”	IAM					$H_{exc}^{P<0.01}$
	TPM			$H_{def}^{P<0.01}$		
	SMM	$H_{def}^{P<0.01}$		$H_{def}^{P<0.01}$	$H_{def}^{P<0.02}$	

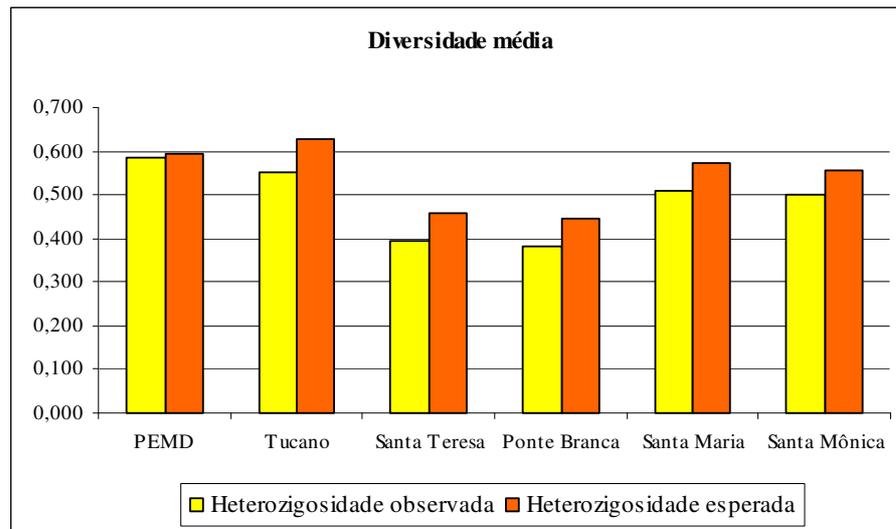


Figura 8 Histogramas com as médias das heterozigosidades observada e esperada em cada fragmento amostrado.

Tabela 8 Heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) considerando uma única população.

Locus	H_o	H_e	P
Mpa01	0,337	0,345	0,220
Mpa02	0,305*	0,454	0,000
Mpa03	0,537	0,564	0,525
Mpa04	0,295	0,330	0,106
Mpa05	0,295	0,350	0,021
Mpa06	0,505	0,543	0,314
Mdo4L028	0,621	0,575	0,255
Mdem09	0,358*	0,601	0,000
Mdem12	0,811	0,837	0,005
Mdem15	0,537*	0,678	0,000
Média	0,478	0,550	

* valores estatisticamente menores que $\alpha = 0,005$

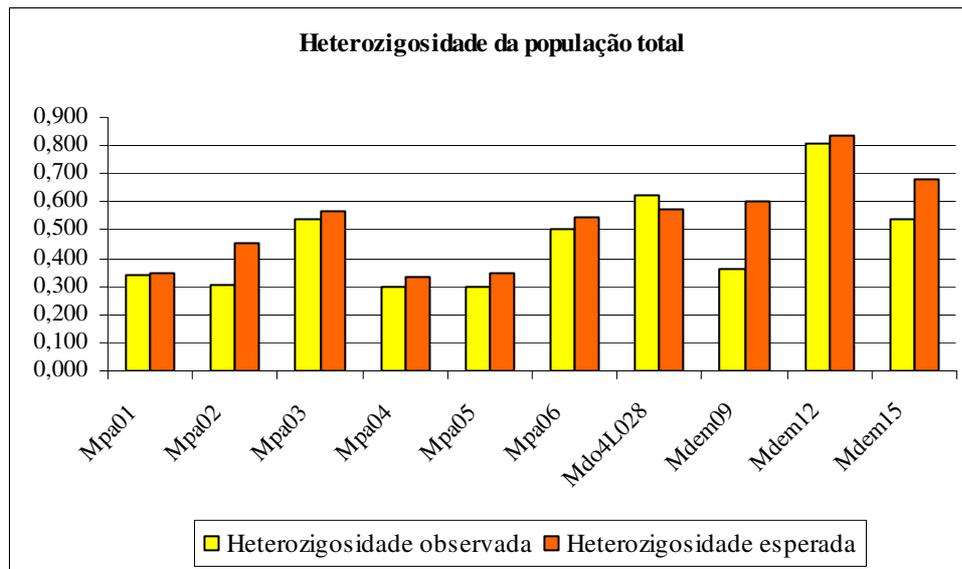


Figura 9 Histogramas com as heterozigosidades observada e esperada nos locos na análise de toda a população analisada.

O desequilíbrio de ligação foi testado no programa Arlequin para todos os pares de locos. Devido ao fato de ter sido encontrado forte indício de haver desequilíbrio de ligação entre os alelos dos locos Mpa04 e Mpa05, excluimos o loco Mpa04 das análises populacionais, restando para tanto um total de nove locos. O critério de escolha para a retirada do loco Mpa04 foi a existência de menor diversidade alélica e o menor número de alelos exclusivos.

4.4 Estrutura populacional

Os valores de F_{st} e R_{st} do conjunto da população foram, respectivamente, 0,068 ($P = 0,000$) e -0,002 ($P = 0,888$). As Tabelas 9 e 10 apresentam, respectivamente, os valores de F_{st} e R_{st} para cada par de população analisada e seus níveis de significância. As diferenças inter-populacionais de acordo com os valores de F_{st} variaram de zero entre Tucano e o PEMD a 12,5 % entre Ponte Branca e Santa Maria. Os valores de R_{st} apresentaram-se evidentemente mais baixos, variando de zero a 12,8% entre Ponte Branca e Santa Maria. Na análise de F_{st} , oito das 15 comparações par-a-par entre populações apresentaram diferenças significativas, enquanto que para a análise de R_{st} apenas duas apresentaram diferenças significativas considerando $\alpha = 0,005$, conforme indicado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 Matriz de diferenciação populacional. Área inferior esquerda = valores de *Fst*; área superior direita = valores de *P*.

	PEMD	Tucano	Santa Teresa	Ponte Branca	Santa Maria	Santa Mônica
PEMD	-	0,753	0,008	0,032	0,043	0,081
Tucano	-0,010	-	0,000	0,008	0,004	0,047
Santa Teresa	0,052	0,085*	-	0,000	0,000	0,000
Ponte Branca	0,044	0,059	0,112*	-	0,000	0,000
Santa Maria	0,036	0,062*	0,103*	0,125*	-	0,000
Santa Mônica	0,023	0,031	0,089*	0,055*	0,075*	-

* populações que apresentaram significativa diferenciação com *Fst* ($\alpha = 0,005$).

Tabela 10 Matriz de diferenciação populacional. Área inferior esquerda = valores de *Rst*; área superior direita = valores de *P*.

	PEMD	Tucano	Santa Teresa	Ponte Branca	Santa Maria	Santa Mônica
PEMD	-	0,884	0,209	0,252	0,320	0,890
Tucano	0,038	-	0,140	0,087	0,436	0,862
Santa Teresa	0,122	0,028	-	0,002	0,006	0,262
Ponte Branca	0,107	0,033	0,093*	-	0,000	0,462
Santa Maria	0,071	-0,008	0,085	0,128*	-	0,467
Santa Mônica	-0,025	-0,002	0,037	0,022	0,013	-

* populações que apresentaram significativa diferenciação com *Rst* ($\alpha = 0,005$)

Para as análises com os programas Tess e Structure os modelos de ancestralidade individual ou o “*no-admixture*” são os mais indicados para estudos com populações ligeiramente discretas e mostraram-se mais adequados (PRITCHARD et al, 2000). O melhor valor de interação espacial (Ψ) utilizado foi estabelecido como 0,6.

O software Structure indicou que os números de agrupamentos (*K*) acima e abaixo de três apresentaram as maiores estimativas para os valores do logaritmo de máxima verossimilhança (*likelihood*). Já no software Tess, quanto maior o valor de K_{max} utilizado, maiores foram os valores médios estimados para o logaritmo de máxima verossimilhança. Segundo François *et al.* (2006), no programa Tess o *K* pode ser considerado maior que o número real, ou presumido de agrupamentos. Apesar desses valores crescentes de log, todas as simulações realizadas com *Ks* acima de três apresentaram no programa Tess, como resultado mais provável, o agrupamento dos indivíduos em três agrupamentos principais.

As Figuras 10, 11, 12 e 13 apresentam os resultados das análises do programa Tess para a subdivisão da população estudada. As Figuras 10 e 12 representam, através de barras, uma estimativa da afiliação de cada indivíduo a um determinado cluster, representado por cores diferentes, de acordo com o número de *K* testado. Como ilustração, estas figuras apresentam o resultado de uma das simulações realizadas utilizando-se $K_{max} = 3$ e $K_{max} = 8$,

respectivamente. Na Figura 11 e 13 há a representação da distribuição espacial dos indivíduos de acordo com as suas áreas de coleta e o seu agrupamento nos três clusters obtidos pelo programa, indicados através de cores diferentes.

As Figuras 14, 15 e 16 são diferentes representações dos resultados encontrados com o auxílio do programa Structure. A Figura 14 mostra barras que correspondem a indivíduos dispostas de acordo com o valor de Q que indica a proporção de miscigenação para cada indivíduo. (PRITCHARD et al, 2000). Na Figura 15 tem-se a disposição dos indivíduos de acordo com a sua aproximação com cada um dos três agrupamentos, na forma de um triângulo. A Figura 16 é a matriz de afiliação gerada pelo Structure, com os indivíduos agrupados nas seis áreas previamente indicadas e com a representação, através das cores, da proporção de afiliação a cada um dos três agrupamentos obtidos. A proporção de afiliação dos indivíduos de cada uma das seis populações nos três clusters indicados pelo Structure também pode ser vista na Tabela 11.

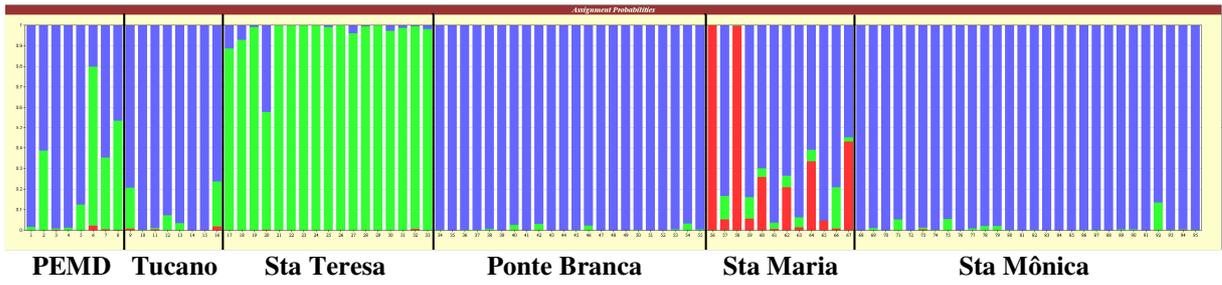


Figura 10 Matriz de afiliação gerada pelo programa Tess ($K_{\max} = 3$; $\log = -1819,7$).

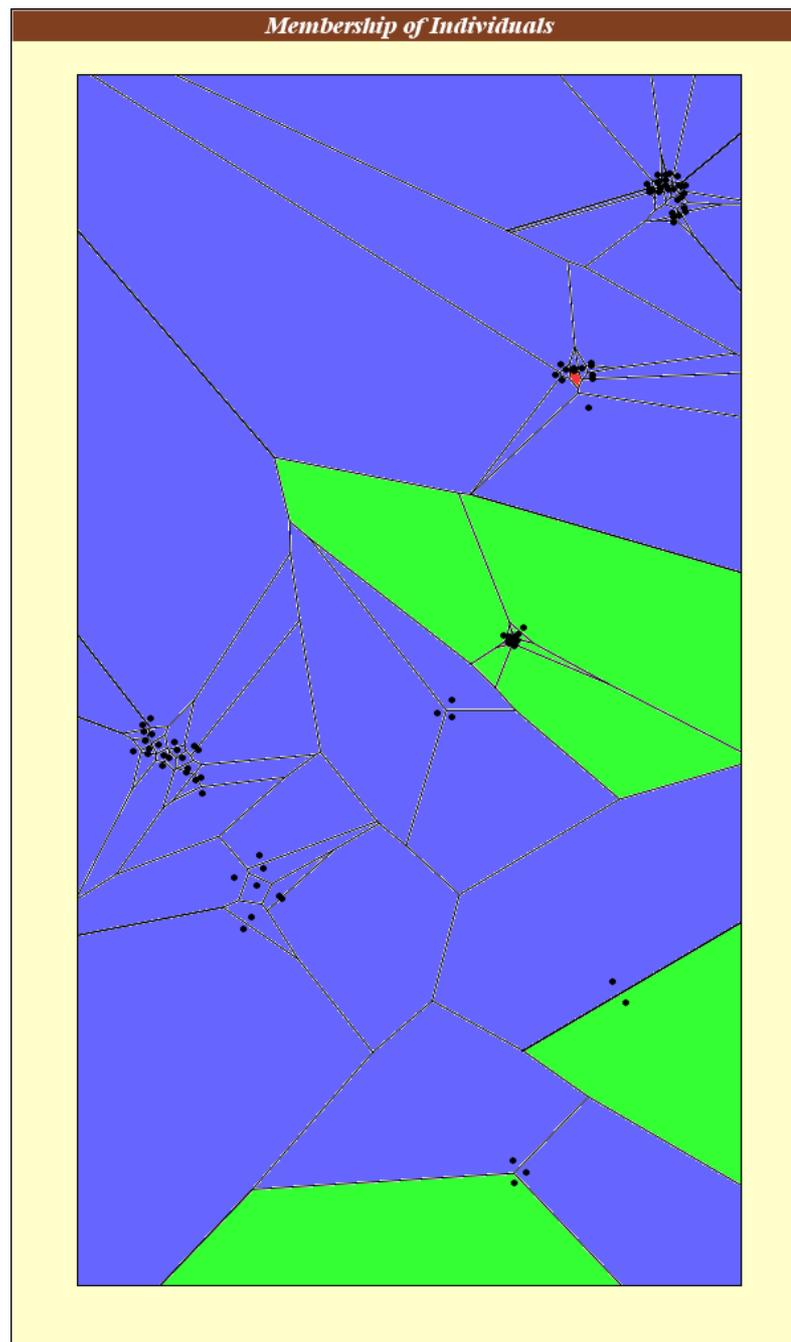


Figura 11 Visualização dos três clusters indicados pelo programa Tess para a população de *Micoureus paraguayanus* do Pontal do Paranapanema, SP ($K_{\max} = 3$; $\log = -1819,7$). Cada ponto corresponde a um indivíduo na localidade onde foi capturado.

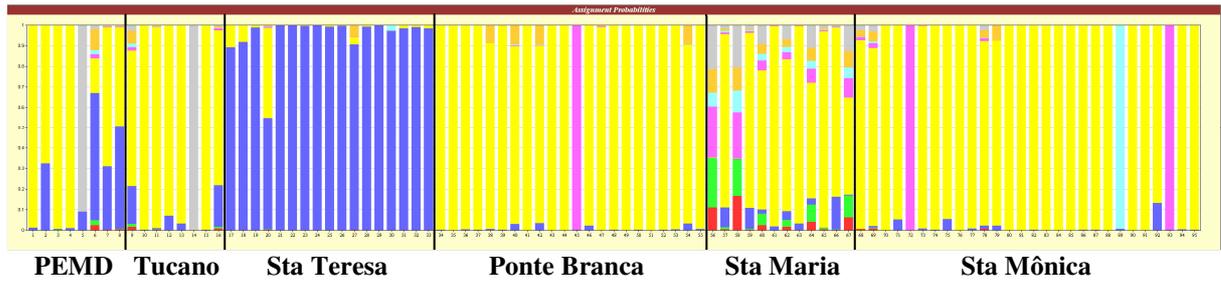


Figura 12 Matriz de afiliação gerada pelo programa Tess ($K_{\max} = 8$; $\log = -1815,7$).

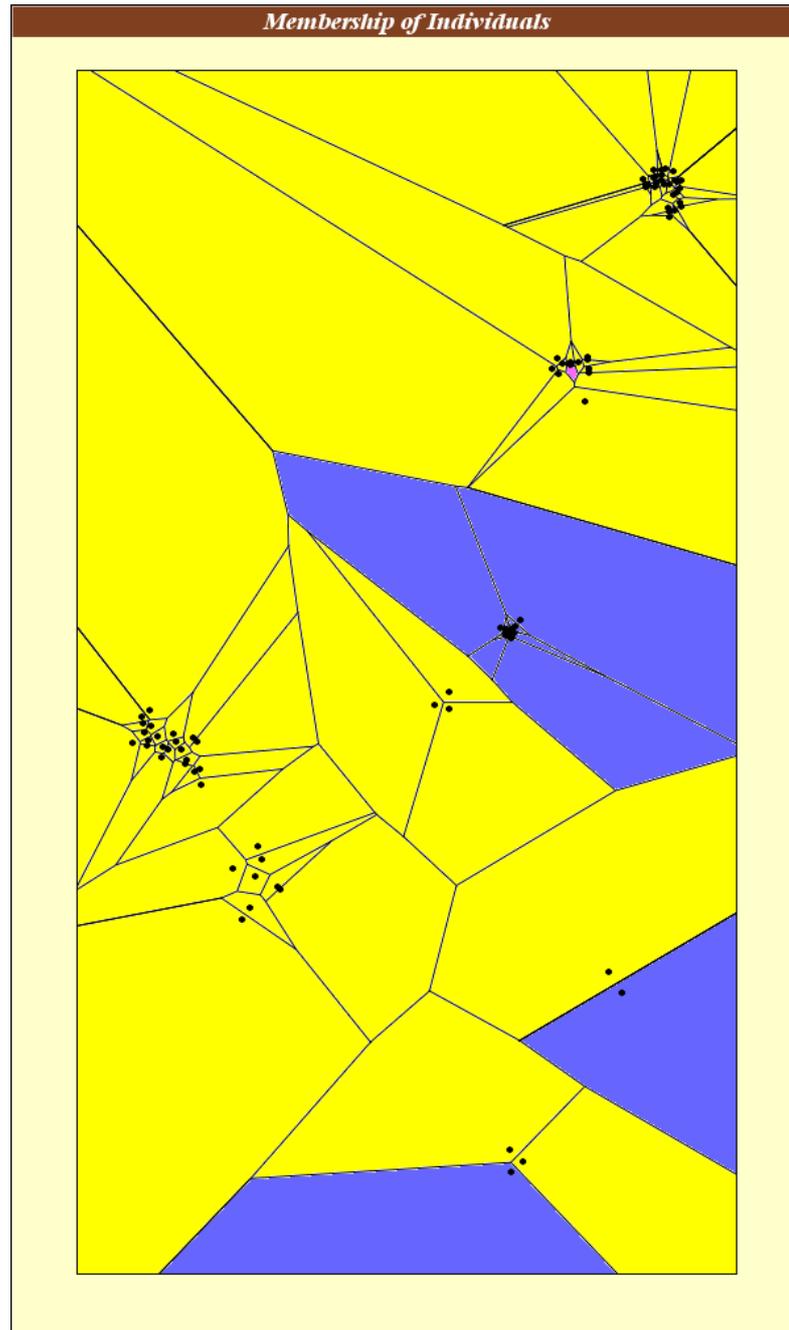


Figura 13 Visualização dos três clusters indicados pelo programa Tess para a população de *Micoureus paraguayanus* do Pontal do Paranapanema, SP ($K_{\max} = 8$; $\log = -1815,7$). Cada ponto corresponde a um indivíduo na localidade onde foi capturado.

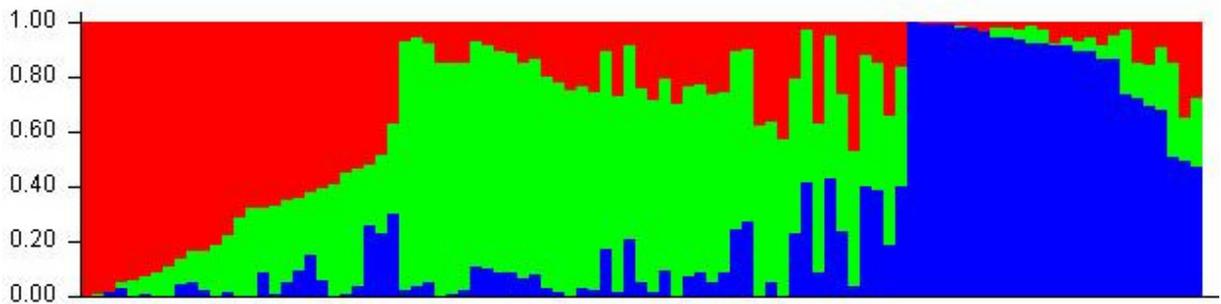


Figura 14 Histograma, com agrupamentos de acordo com o valor de Q , resultado do programa Structure ($K = 3$; $\log = -1868,7$). Cada barra refere-se a um indivíduo e a sua respectiva probabilidade de pertencer a um dos três cluster apontados.

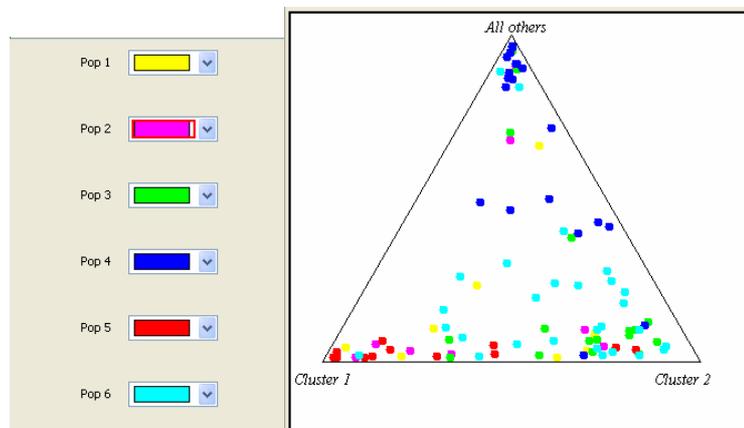


Figura 15 Triângulo gerado pelo programa Structure. Cada ponto representa um indivíduo no qual é indicada a sua origem pela cor e também a sua afiliação aos *clusters* de acordo com a sua posição ($K = 3$; $\log = -1868,7$). As populações são: 1 = PEMD; 2 = Tucano; 3 = Sta Teresa; 4 = Ponte Branca; 5 = Sta Maria; 6 = Sta Mônica.

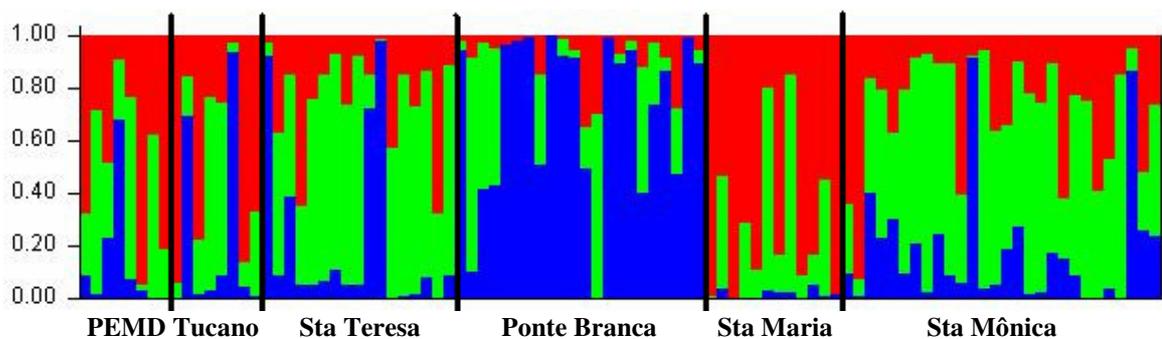


Figura 16 Matriz de afiliação gerada pelo programa Structure ($K = 3$; $\log = -1868,7$).

Tabela 11 Proporção de afiliação dos indivíduos das populações pré-definidas nos três clusters encontrados pelo programa Structure.

População	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3
PEMD	0.488	0.371	0.142
Tucano	0.488	0.282	0.229
Santa Teresa	0.229	0.552	0.219
Ponte Branca	0.078	0.198	0.724
Santa Maria	0.714	0.269	0.017
Santa Mônica	0.289	0.527	0.184

Através do teste de Mantel, foi verificada a existência de correlação positiva e significativa ($R = 0,087$; $P = 0,003$) entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas dos indivíduos amostrados (Figura 17).

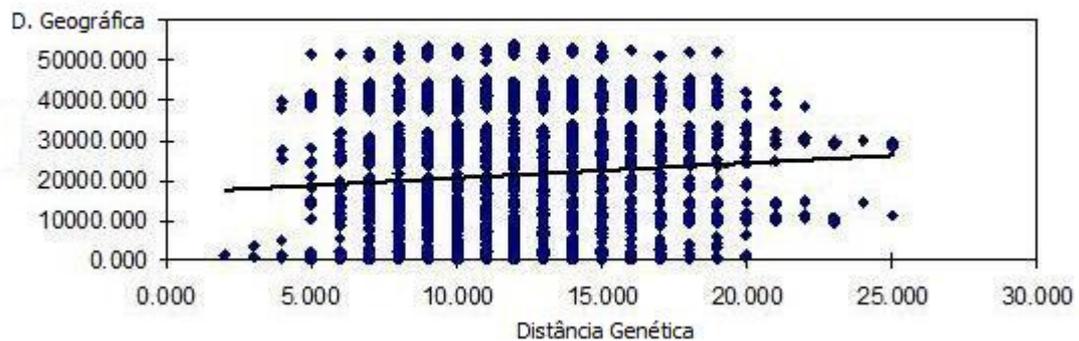


Figura 17 Representação da correlação entre distância genética e geográfica, teste de Mantel.

O número de migrantes por geração (Nm) variou entre 1,749 e 10,575 a partir da estimativa de F_{st} e variou entre 1,704 e 18,890 a partir da estimativa de R_{st} . O valor de Nm foi calculado a partir dos valores de M ($M=2Nm$) dados pelo programa Arlequin para a comparação dos pares das amostras populacionais, assumindo um modelo de ilha (Tabela 12).

Tabela 12 Matriz com os valores de M ($M=2Nm$) apresentados pelo programa Arlequin para as diferentes populações, para F_{st} e R_{st} . Área inferior esquerda = valores de M derivado de F_{st} ; área superior direita = valor de M derivado de R_{st} .

	PEMD	Tucano	Santa Teresa	Ponte Branca	Santa Maria	Santa Mônica
PEMD	-	12,570	3,607	4,177	6,579	inf
Tucano	inf	-	17,676	14,611	inf	inf
Santa Teresa	9,135	5,413	-	4,851	5,355	13,080
Ponte Branca	10,842	8,038	3,973	-	3,408	22,556
Santa Maria	13,434	7,556	4,357	3,498	-	37,780
Santa Mônica	21,151	15,650	5,087	8,612	6,193	-

5 DISCUSSÃO

5.1 Busca de marcadores do tipo microssatélite para *Micoureus paraguayanus*

O procedimento para a busca de marcadores do tipo microssatélites adotado neste trabalho não foi bem sucedido. Dos 130 fragmentos analisados, cerca de 18% (23) continham microssatélites e destes apenas para 30% (7) foi possível o estabelecimento de *primers*. No entanto, apenas três apresentaram produto de amplificação adequado e mesmo assim não foi atingido o objetivo de identificar microssatélites polimórficos para a população estudada de *M. paraguayanus*, a partir da biblioteca genômica construída neste trabalho. Esse resultado pode ter sido consequência do tamanho dos fragmentos isolados (200-600 pb), ou das enzimas utilizadas, pois os fragmentos muitas vezes mostraram-se pequenos para que houvesse espaço suficiente para o desenho dos iniciadores em uma de suas pontas. Também, o protocolo adotado talvez tenha sido muito restritivo, pois foram utilizados oligonucleotídeos com repetições tetranucleotídicas e altas temperaturas.

Além disso, a escolha dos oligonucleotídeos com repetição (GATA, AACC, GACA) utilizados no enriquecimento do DNA de *M. paraguayanus*, pode não ter sido adequada. Como não tínhamos informações sobre os microssatélites mais comuns para a espécie estudada nos baseamos em informações disponíveis para um apanhado de espécies próximas. Embora eles tenham sido eficientes para o enriquecimento da biblioteca genômica com fragmentos contendo regiões repetitivas, alguns dos microssatélites encontrados não foram correspondentes as sondas utilizadas. Outras sondas para microssatélites tais como AC poderiam ter sido mais eficientes, já que microssatélites correspondentes a esta sonda já foram identificados no genoma de *M. paraguayanus*, com sucesso, nos trabalhos de Dias *et al.* (2008) e Rodrigues *et al.* (2006).

Por outro lado, a bem sucedida amplificação em *Micoureus paraguayanus* de um *primer* desenvolvidos para *Monodelphis domestica* corrobora a afirmação sobre a proximidade das espécies (JANSA e VOSS, 2000, VOSS e JANSA, 2003), mostrando haver conservação de sítios de microssatélite entre elas. Também foi observado, ao alinharmos as seqüências dos clones obtidos da nossa biblioteca genômica com outras seqüências nucleotídicas do banco de dados do *site* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que uma seqüência que flanqueia um de nossos microssatélites é muito similar à outra do genoma de *M. domestica* (dados não apresentados).

A confirmação de semelhança entre os genomas das espécies gera uma boa perspectiva para a identificação de novos locos de microssatélites para *M. paraguayanus*, uma vez que existe grande disponibilidade desses marcadores para *M. domestica*. Além disso, *M. domestica* foi o primeiro marsupial a ter um mapa genético estabelecido (SAMOLLOW et al, 2004; SAMOLLOW et al, 2007), o que permitirá a disponibilização de um grande número de marcadores moleculares em geral para o genoma desse marsupial (GOUIN et al, 2005).

Os dois microssatélites – Mpa06 e Mdo4L028 – descritos no presente trabalho para *Micoureus paraguayanus* mostraram-se marcadores informativos, tendo apresentado 9 e 5 alelos e PIC de 0,515 e 0,505, respectivamente (Tabela 4).

O Conteúdo de Informações Polimórficas (PIC) é uma medida da informação relacionada à heterozigidade esperada e calculada a partir da frequência de alelos (Botstein et al. 1980). Botstein et al. (1980) classifica os valores de PIC em três níveis: altamente informativo ($PIC > 0,5$); moderadamente informativo ($0,5 > PIC > 0,25$) e pouco informativo ($PIC < 0,25$), em um contexto de investigação de paternidade. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) dos locos estudados neste trabalho variou entre moderadamente e altamente informativos (0,310 a 0,801) (Tabela 4). Este nível de variação genética é mais adequado para inferências populacionais do que níveis mais altos, em que existem diversos alelos presentes, porque existe um erro inerente no cálculo das frequências alélicas dos alelos. Quanto mais raro um alelo, maior a chance de nossas estimativas sobre sua frequência estar enviesada. Além disso, locos que apresentam um número excessivo de alelos estão provavelmente sujeitos a uma taxa de mutação maior, o que pode aumentar a chance de homoplasia. Por este motivo, locos com número intermediário de alelos, como os aqui estudados, são mais informativos para estudos populacionais, embora possam ser menos indicados para estudos de paternidade.

5.2 Diversidade genética

A diversidade genética da população de *Micoureus paraguayanus* foi avaliada através do número de alelos por loco e da heterozigidade observada. Verificou-se que o número de alelos por loco variou entre 4 e 10 (com número de alelos médio igual a 6,1), enquanto que a heterozigidade observada ficou entre 0,320 e 0,843 (heterozigidade total média igual a 0,480) (Tabela 4). Segundo Frankham et al. (2002), em populações não endogâmicas o número de alelos por loco encontra-se entre 5 e 10, enquanto que a

heterozigosidade situa-se frequentemente entre 0,6 e 0,8. O número de alelos por loco encontrado neste trabalho pode ser considerado dentro dos valores encontrados por Frankham *et al.* (2002) para populações não endogâmicas, no entanto a heterozigosidade observada ficou abaixo dos parâmetros sugeridos pelo autor.

É importante destacar que os locos Mdem09, Mdem12 e Mdem15 já foram avaliados em *M. paraguayanus* em uma outra espécie do mesmo gênero (DIAS *et al.*, 2008). Para *M. paraguayanus*, esses autores encontraram 9, 14 e 12 alelos, enquanto que para *M. demerarae* foram encontrados 2, 7 e 6 alelos respectivamente. Em nosso trabalho, esses locos apresentaram um número de alelos menor (4, 10 e 5 alelos, respectivamente) do que o encontrado por Dias *et al.* (2008) para *M. paraguayanus*. Por outro lado, a heterozigosidade média observada para esses locos no nosso trabalho (0,52, 0,61 e 0,59, respectivamente) são maiores do que o observado por Dias *et al.* (2008) (0,32; 0,60 e 0,49, respectivamente).

Rodrigues (2004), utilizando apenas 4 locos de microssatélite, avaliou a diversidade da mesma população estudada nesse trabalho e também identificou uma baixa diversidade genética. Foi sugerido que esta baixa diversidade resulte, dentre outros fatores, de eventos sucessivos de extinção e recolonização, devido às populações amostradas estarem localizadas à margem da distribuição da espécie. A menor diversidade alélica encontrada na população de *M. paraguayanus* estudada no presente trabalho quando comparada com a diversidade encontrada por Dias *et al.* (2008) reforçam a sugestão feita por Rodrigues (2004).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado considerando a correção estatística de Bonferroni ($\alpha = 0,005$), que é a mais indicada para esse teste por ser mais conservadora (Narum, 2006). Assim, apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg as populações de Santa Tereza para os locos Mdem02 e Mdem09, e de Ponte Branca e Santa Mônica para o loco Mdem09 (Tabela 5). Os desvios observados podem resultar da presença de alelos nulos, conforme verificado através de estimativas fornecidas pelo programa MicroChecker. Apesar disso, não encontramos indivíduos homozigotos para esses alelos nulos, o que ajudaria a reforçar essa interpretação. Como para algumas populações, as frequências inferidas para alelos nulos foram razoavelmente altas (até de 0,284), a ausência de homozigotos para estes alelos reduz a probabilidade de tais desvios serem explicados por alelos nulos (Tabela 5). Outros fatores como, por exemplo, a endogamia ou a seleção contra heterozigotos podem levar populações naturais a uma deficiência de heterozigotos. Além disso, a amplificação diferencial de alelos durante a PCR também pode levar a uma interpretação equivocada nesse sentido. A causa de excesso de homozigotos em locos de alguns dos grupos populacionais estudados, entretanto, é difícil de ser determinada.

Foi verificada a presença de dois alelos exclusivos no PEMD (nas frequências de 19% e 6%), dois em Santa Teresa (3% cada), cinco em Santa Maria (17%, 13%, 8% e dois com 4%) e um em Santa Mônica (2%) (Tabela 6). A detecção de alelos exclusivos em uma população pode ser resultado da retenção de polimorfismos ancestrais, da ocorrência de mutação ou meramente uma questão amostral. A identificação de alelos exclusivos no PEMD (oito indivíduos amostrados) na frequência de 12,5% do total de alelos encontrados e a sua não identificação em Ponte Branca (22), por exemplo, indica que o número de indivíduos amostrados parece não ter influenciado a identificação desses alelos. Ainda, considerando que a taxa de mutação deve ser a mesma nas diferentes populações para os diferentes locos e a ausência de simetria na detecção de tais alelos nos indivíduos de cada fragmento estudado, a retenção de polimorfismo ancestral parece ser a responsável por esses resultados. Contudo, tais alelos foram encontrados em populações sujeitas a condições distintas de habitat: o PEMD, uma grande e bem preservada área florestal e os fragmentos de Santa Teresa, Santa Maria e Santa Mônica, os menores dentre os estudados. Os fragmentos Santa Teresa e Santa Maria, onde foram observados alelos exclusivos em maior número e frequência, são também os mais alterados em suas características biológicas (ROCHA, 2004). É possível que a presença de alelos exclusivos encontrados no PEMD deva-se a uma alta diversidade genética (Tabela 7) que tem se mantido nessa população durante seus processos evolutivos históricos. Os testes realizados no software Bottleneck, por outro lado, indicaram o desvio do equilíbrio mutação-deriva para diversas populações. Como praticamente todas as localidades apresentaram desvios significativos quando contrastamos com valores simulados, assumindo o modelo de SMM, consideramos que estes desvios estão mais provavelmente associados à uma inadequação do modelo SMM para representar a história evolutiva dos alelos destes microssatélites do que, de fato, a indicação de gargalos. Tal conclusão é reforçada por evidências que indicam que a maioria dos dados de microssatélite segue melhor o modelo de TPM do que tanto o SMM ou o IAM (DIRIENZO et al, 1994, LUIKART et al, 1998). Quando isto foi levado em conta, os dados indicam valores significativos de desvios do equilíbrio mutação-deriva para o "*standardized differences test*" apenas em duas populações, do Parque Estadual do Morro do Diabo, e de Santa Teresa, embora apenas para este último os valores são significativos também para o teste "Wilcoxon Sign-rank test". Este último teste apresenta maior poder estatístico e é mais confiável para o tamanho amostral e de locos aqui estudados, uma vez que o primeiro requer ao menos 20 locos para fornecer dados confiáveis (CORNUET e LUIKART, 1996). Desta forma, as simulações de coalescência indicam que apenas a população de Santa Teresa pode ser considerada como tendo um desvio significativo

do equilíbrio Wright-Fisher, apresentado um déficit de heterozigotos, que pode ser o resultado de muitos processos, inclusive um gargalo evolutivo recente que pode levar a uma expansão populacional. Já nos outros fragmentos, devido às suas características diferenciadas, parece ser possível admitir que a detecção de alelos exclusivos em maior número e frequência seja reflexo de flutuações demográficas, genéticas ou amostrais.

5.3 Estrutura genética

O teste de Mantel foi realizado para identificar se há correlação entre a distância genética e a distância geográfica existente entre os agrupamentos de indivíduos de cada um dos fragmentos florestais avaliados. Foi encontrada uma correlação positiva e significativa ($R = 0,087$; $P = 0,003$), embora pequena, como pode ser observada pela ligeira inclinação da reta na Figura 17. A correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica indica a existência de fluxo gênico, porém com restrições devido à distância. Contudo, a correlação positiva sutil pode ser um indício de que a composição genética histórica da população estudada esteja se modificando devido ao processo de fragmentação recente (cerca de 60 anos) e considerando-se a hipótese de ausência de fluxo gênico, esta correlação tenderia a desaparecer. Pode ser também reflexo de um grande fluxo gênico entre as populações, o que diminui o processo de diferenciação e de isolamento por distância.

Para identificar a existência de estruturação genética na população de *Micoureus paraguayanus* do Pontal do Paranapanema, as seguintes avaliações foram realizadas: estimativas de F_{st} e R_{st} (Arlequin), além de duas análises Bayesianas, uma que avalia apenas as distribuições gênicas (Structure) e outra que considera também as coordenadas geográficas individuais (Tess).

Utilizando as estimativas de F_{st} como índice de diferenciação populacional, foi encontrado que, nas comparações par-a-par, oito delas apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,005$; Tabela 9). Os maiores valores observados referem-se às comparações entre três populações: Santa Teresa, Ponte Branca e Santa Maria. Entre elas, os valores de F_{st} observados foram: 0,125 (Ponte Branca vs Santa Maria), 0,112 (Ponte Branca vs Santa Teresa) e 0,103 (Santa Maria vs Santa Teresa). As demais comparações entre populações que se mostraram estatisticamente significativas apresentaram valores de F_{st} entre 0,089 e 0,055 (Tabela 9).

Ao utilizarmos como índice de diferenciação populacional as estimativas de R_{st} , encontramos que, para o mesmo nível de significância estatística ($p < 0,005$), as comparações entre Santa Teresa, Ponte Branca e Santa Maria são as únicas com diferenças estatisticamente significativas. Neste caso, os valores de R_{st} observados foram iguais a 0,128 (Ponte Branca *vs* Santa Maria) e 0,093 (Ponte Branca *vs* Santa Teresa), já entre Santa Maria e Santa Teresa não houve diferença significativa (Tabela 10).

Valores de F_{st} acima de 0,15 são geralmente considerados um indicativo de importante diferenciação entre populações fragmentadas. Apesar dos valores de F_{st} encontrados serem estatisticamente significantes para diversas das comparações entre muitas áreas amostradas, apenas as comparações entre Santa Teresa, Ponte Branca e Santa Maria são próximas a esse valor. Entretanto, devemos ainda considerar que, apesar de amplamente utilizado, o índice F_{st} é menos adequado para a análise de dados de microssatélites, entre outros motivos porque existem diversos alelos e qualquer coleta muito pouco provavelmente amostraria de forma efetiva toda a amplitude da diversidade. Além disso, o modelo evolutivo mais adequado para explicar sua evolução pode não ser dos alelos infinitos (IAM), que é premissa da estatística F_{st} , mas sim um modelo de mutação por passos (SMM) (Slatkin, 1995). Isto levou Slatkin (1995) a desenvolver o índice R_{st} . Alguns estudos de modelagem realizados para avaliar a utilidade desses índices indicam que, para a análise de diferenciação utilizando marcadores do tipo microssatélites, a estatística R_{st} apresenta um melhor desempenho quando comparado às abordagens baseadas em F_{st} (LOWE et al, 2004). Por outro lado, muito poucos marcadores apresentam taxa de mutação estritamente similar ao modelo SMM (LUIKART et al, 1998), estando mais provavelmente seguindo um processo intermediário entre SMM e IAM. Isto levou a criação de outros modelos de mutação como o TPM (DIRIENZO et al, 1994), previamente mencionados. Dessa forma, as inferências levando em consideração tanto valores de F_{st} quando de R_{st} devem ser consideradas com cautela. Em nossas análises, apenas as comparações entre Ponte Branca *vs* Santa Maria, e Ponte Branca *vs* Santa Teresa apresentaram valores de R_{st} significativos. Dessa maneira, levando-se em consideração o valor crítico de F_{st} sugerido por Frankham *et al.* (2002) como indicativo de importante diferenciação populacional, e um conservadorismo na inferência de diferenciação populacional que nos aproxima do índice R_{st} para a análise de marcadores do tipo microssatélites, apenas as populações de Santa Teresa, Ponte Branca e Santa Maria parecem apresentar uma diferenciação genética significativa.

Através das análises Bayesianas, os programas Tess e Structure indicaram que uma subdivisão em três agrupamentos (Figuras 10 a 16) é a que melhor representa a estrutura

do conjunto de populações estudado. Esses agrupamentos, como pode ser observado nas Figuras 10, 12 e 16, não são bem definidos no que diz respeito às populações e, portanto, não diferenciam fortemente nenhuma delas, corroborando assim os baixos valores de F_{st} e R_{st} para o conjunto da população (0,068 e -0,002, respectivamente). Apesar disso, é possível verificar, através dessas figuras, que as populações de Santa Teresa e Santa Maria apresentam evidências de diferenças com outras, reforçando assim os resultados obtidos através da análise de F_{st} e R_{st} . Ainda, os dados da Tabela 15 revelam que as populações de Santa Mônica, Santa Teresa e Ponte Branca têm, respectivamente, 71,4; 55,2 e 72,4% de filiação nos clusters 1, 2 e 3, encontrados pelo programa Structure, indicando a diferenciação que há entre essas três populações.

Adicionalmente, foram analisando os valores de migrantes por geração (N_m) com os valores de M obtidos a partir do F_{st} (Arlequin), que é sugerida como a escolha mais adequada se o número amostral é baixo (<10) e há poucos locos sendo analisados (<20), quando comparada aos valores obtidos a partir de R_{st} que superestimam o N_m (Gaggiotti *et al.*, 1999). Os valores obtidos são considerados altos e indicam a existência de fluxo gênico histórico entre todos os grupos populacionais de cada fragmento (Tabela 12). Embora os menores valores de N_m encontrados foram entre os fragmentos de Santa Teresa, Santa Maria e Ponte Branca, os mais diferenciados entre si, ainda assim estavam acima de um migrante por geração, considerado suficiente para se opor ao efeito de deriva (WRIGHT, 1951). É difícil determinar se o processo de fragmentação recente pode estar influenciando esses valores. Contudo, esperar-se-ia que não existisse alto fluxo gênico entre populações isoladas, o que faz sugerir que o fluxo gênico observado entre os fragmentos de Santa Tereza, Ponte Branca e Santa Maria pode não refletir existência de troca gênica após a fragmentação, e sim manutenção de polimorfismo ancestral.

5.4 Implicações da diversidade e estrutura genética encontrados

A correlação entre as distâncias genética e geográfica significativa, positiva, porém sutil, além dos altos valores de migrantes por geração (N_m), mostram um importante fluxo gênico histórico entre os grupos fragmentados de *Micoureus paraguayanus* abordados nesse estudo. Apesar disso, foi detectada estruturação genética nesta população, através de dois programas com diferentes abordagens (Tess e Structure), que concordaram com a indicação de três agrupamentos para esta população. Adicionalmente, foram detectadas

diferenças genéticas significativas entre três dos grupos populacionais aqui avaliados. Os fragmentos habitados por esses grupos caracterizam-se por apresentar as menores áreas dentre os amostrados, além de dois destes estarem em uma situação de forte alteração biológica. Tais características dos fragmentos indicam que a diferenciação genética entre suas populações poderia ser o resultado do processo de fragmentação.

O fragmento de Santa Teresa apresentou diferenciação genética significativa, indicando restrição ao fluxo gênico, sugerida pelos software Tess e Structure, além de sinal significativo de um gargalo evolutivo, mesmo estando bastante próximo (300 m) do PEMD, que é a área com maior diversidade genética (Figura 8). Tal hipótese pode ser reforçada pelos estudos sobre a movimentação de *M. paraguayanus* entre fragmentos de habitat, que indicam poucas movimentações entre distâncias de até 300 metros (GOULART et al, 2006; PIRES et al, 2002). Ainda, deve-se considerar que, segundo Rodrigues (comunicação pessoal), as condições da matriz vegetal na região do Pontal do Paranapanema são menos favoráveis a movimentações, quando comparada à matriz na área estudada por Pires *et al.* (2002). Desta forma, é possível que, mesmo o processo de fragmentação na região sendo recente (cerca de 60 anos), alguns processos já podem estar sendo afetados. Neste caso, a manutenção do fluxo gênico entre os fragmentos seria a maneira de dar continuidade aos padrões evolutivos históricos da população de *Micoureus paraguayanus*.

Ademais, os processos históricos evidenciados pela correlação entre as distâncias genética e geográfica, além do alto fluxo gênico, indicam uma população historicamente bastante homogênea. No entanto, a estruturação e a diferenciação significativa observadas na população estudada podem ser relacionadas com o processo recente de fragmentação florestal. Assim, no caso deste processo continuar sem monitoramento ou intervenções, a tendência será a ocorrência de alterações irreversíveis nos processos evolutivos. Tais alterações vão desde perda de variabilidade genética, diminuição do valor adaptativo, até extinções locais.

6 CONCLUSÕES

- A diversidade genética da população estudada, considerando principalmente a heterozigozidade (heterozigosidade total média igual a 0,480) dos locos analisados por fragmento, está abaixo do que foi sugerido na literatura para valores que caracterizariam uma população não endogâmica. Além disso, o número de alelos encontrado em três dos locos avaliados neste trabalho é menor que o encontrado, nos mesmos alelos, em outra população da mesma espécie. Sendo assim a diversidade genética foi considerada baixa.
- Os grupos populacionais amostrados nos fragmentos florestais do Pontal do Paranapanema apresentaram uma correlação positiva entre a distância genética e geografia, porém sutil ($R = 0,087$; $P = 0,003$).
- Foram indicados três agrupamentos na população estudada através da análise Bayesiana realizada em dois programas com diferentes abordagens: Tess (FRANÇOIS et al, 2006; CHEN et al, 2007) e o Structure (PRITCHARD et al, 2000).
- As populações de Santa Teresa, Santa Maria e Ponte Branca apresentaram diferenciação genética significativa entre si, os valores de F_{st} para as comparações par-a-par variaram de 0,103 a 0,125. Contudo, o aspecto mais relevante aqui observado é a diferenciação já encontrada na população de Santa Teresa, que é o menor fragmento estudado e apresenta evidências de expansão populacional, além de uma diferenciação em relação às outras localidades mesmo tendo passado apenas cerca de 40 anos desde seu possível isolamento.
- Há evidência de fluxo gênico histórico entre as populações de cada fragmento, estimado através do alto número de migrantes por geração, identificado pelos valores de N_m calculados entre os pares de populações dos fragmentos do Pontal do Paranapanema – SP.
- A evidência de correlação entre as distâncias genética e geográfica, além do alto fluxo gênico estimado, indicam que a população estudada tem historicamente um processo de troca gênica importante.
- A diferenciação e a estruturação genética observadas, que foram correlacionadas com a alteração na composição biológica e o tamanho dos fragmentos, parecem indicar que o recente processo de fragmentação – cerca de 60 anos – pode já ter sido responsável por uma mudança significativa na composição genética da população estudada.

7 REFERÊNCIAS

AMOS, B.; HOELZEL, A. R. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation*, v. 61, p. 133-144, 1992.

GENESCAN 3.7. Foster City: Applied Biosystems, 2001. CD-ROM.

GENOTYPER 3.7. Foster City: Applied Biosystems, 2000. CD-ROM.

BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas populações. 2ª edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 460 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Lista Nacional Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Instrução Normativa MMA nº 3, de 27 de maio de 2003. 2003. Brasília.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Lista Nacional Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Instrução Normativa MMA nº 6 de 23 de setembro de 2008. Brasília.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2007. Áreas Prioritárias para a Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira: Atualização – Portaria MMA nº 09, de 23 de janeiro de 2007. Brasília. 299p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Biodiversidade Brasileira - Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira. 2002. Brasília. 440p.

BRASIL. Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Mapa de Biomas do Brasil – Primeira Aproximação. 2004. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 23 nov. 2008.

BRASIL. Presidência da República Federativa do Brasil. Lei nº 11.428 de 22 de dezembro de 2006. Brasília.

BRASIL. Presidência da República Federativa do Brasil. Decreto nº 6.660 de 21 de novembro de 2008. Brasília.

BRITO, D.; FERNANDEZ, F. A. S. Dealing with extinction is forever: understanding the risks faced by small populations. *Ciência e Cultura*, v. 52, n. 3, p. 161-170, 2000.

CHEN, C.; DURAND, E.; FORBES, F.; FRANÇOIS, O. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 747-756, 2007.

CLARKE, G. M.; O'DWYER, C. Genetic variability and population structure of the endangered golden sun moth, *Synemon plana*. *Biological Conservation*, v. 92, p. 371-381, 2000.

COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. *Conservation Biology*, v. 16, n. 2, p. 369-376, 2001.

CORNUET J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, v. 144, p. 2001-2014, 1997.

CULLEN JUNIOR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PÁDUA, C. (Org.). *Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2003. 665 p.

DALLAS, J.F. Estimation of microsatellite mutation-rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, v.3, n. 8, p.452-456, 1992.

DALLAS-YANG, Q.; JIANG, G.; SLADEK, F. M. Avoiding false positives in colony PCR. *Biotechniques*, v. 24, n. 4, p. 580-582, 1998.

DIAS, I. M. G. et al. Characterization of eight microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus*, isolation from *Micoureus demerarae*. *Molecular Ecology Resources*. v. 8, p. 345-347, 2008.

DIRIENZO, A. et al. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

ELLSTRAND, N. C., ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 24, p. 217-242, 1993.

EMMONS, L.H., FEER, F. *Neotropical rainforest mammals. A field guide*. 2nd edition. Chicago: University of Chicago Press, 1997. 307 p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50. 2005.

FERNANDEZ, F.A.S.; BARROS, C.S.; SANDINO, M. Razões sexuais desviadas em populações da cuíca *Micoureus demerarae* em fragmentos de Mata Atlântica. *Natureza e Conservação*, v. 1, n. 1, p. 21-27, 2003.

FERRARI-LEITE, J. A ocupação do Pontal do Paranapanema. São Paulo: Hucitec e Fundação Unesp, 1998. 202 p.

FITZSIMMONS, N. N. et al. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics*, v. 147, n. 4, p. 1843-1854, 1997.

FRANÇOIS, O; ANCELET, S.; GUILLOT, G. Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics*, v. 174, n. 2, p. 805-816, 2006.

FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction - A threshold effect. *Conservation Biology*. v.9, n. 4. p. 792-799, 1995a.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, v. 29, p. 305-27, 1995b.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 640 p.

FRANKLIN, I. R. Evolutionary change in small populations. In: SOULÉ, M. E.; WILCOX, B. A. *Conservation biology: an evolutionary ecological perspective*. Sunderland: Sinauer, 1980. p. 135-149.

FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. 2ª Edição. Ribeirão Preto: Funpec-RP. 2002. 631p.

GAGGIOTTI, O.E. et al. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, v 8, n. 9, p. 1513-1520, 1999.

GAO, L. Z.; ZHANG, C. H.; JIA, J. Z. Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 52, p. 93-940, 2005.

GAUFFRE, B. et al. Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 21, p. 4619-4629, 2008.

GOUIN, N. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 87-89, 2005.

GOULART, F.V.B. et al. Estrutura populacional e uso do estrato vertical por *Micoureus paraguayanus* (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*) em fragmentos de Floresta Atlântica de planície no sul do Brasil. *Biotemas*, v. 19, n. 3, p. 45-53, 2006.

GRAIPEL, M.E. et al. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotropical*, v. 13, n. 1, p.31-49, 2006.

GRATIVOL, A. D.; BALLOU, J.; FLEISCHER, R. Microsatellite variation within and among recently isolated populations of golden lion tamarins. *Conservation Genetics*, v. 2, p. 1-9, 2001.

HAMILTON, M. B. et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, v. 27, n. 3, p. 500-507, 1999.

HUDSON, R. R. Gene genealogies and the coalescent process. In: FUTUYMA, D.; ANTONOVICS, J. *Oxford Survey in Evolutionary Biology*, v. 7 Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 1-42.

JANSA, S. A.; VOSS, R. S. Phylogenetic studies on Didelphid Marsupials I. Introduction and preliminary results from Nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 7, n. 1, p. 43-77, 2000.

JONES, M. E. et al. Microsatellites for the Tasmania devil (*Sarcophilus laniarius*). *Molecular Ecology Notes*, v. 3, p. 277-279, 2003.

KALINOWSKI, S.T. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, v. 88, p. 62-65, 2002.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, n. 7, p. 1161-1167, 2001.

KIMURA, M. Teoria neutralista de la evolucion molecular. *Investigacion y Ciência*, v. 40, p. 46-55, 1980.

LANDE, R. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Population Ecology*, v. 40, n. 3, p. 259-269, 1998.

LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G. F. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: SOULÉ, M. *Viable populations for conservation*. Cambridge Univ. Press., 1987. p. 87-123.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*, v. 2, n. 3, p. 383-389, 1975.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. *Ecological genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing, 2004. 326 p.

LUIKART G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, v. 89, p. 238-247, 1997.

MADSEN, T.; STILLE, B.; SHINE, R. Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation*, v. 75, p. 113-118, 1995.

MARSHALL, T.C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 639-655, 1998.

MARTINS, K. et al. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, n. 1, p. 61-69, 2008.

MENEGUETTE, A. A. C. Atlas interativo do Pontal do Paranapanema: uma contribuição à educação ambiental. P. Prudente. Tese (Livre-Docência em Cartografia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Presidente Prudente, 2001.

MOORE, J.A. et al. Fine-scale genetic structure of a long-lived reptile reflects recent habitat modification. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 21, p. 4630-4641, 2008.

MORAES JUNIOR, E.A., CHIARELLO, A.G. A radio tracking study of home range and movements of the marsupial *Micoureus demerarae* (Thomas) (Mammalia, Didelphidae) in the Atlantic forest of south-eastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 1. p. 85-91, 2005.

NARUM, S. R. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, v. 7, n. 5, p. 783-787, 2006.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 8, n. 7, p. 234-239, 1993.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLMOS, F. Aves ameaçadas, prioridades e políticas de conservação no Brasil. *Natureza e Conservação*, v. 3, n. 1, p. 21-42, 2005.

OOSTERHOUT, C. V. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 535-538, 2004.

PATTON, J. L.; COSTA, L. P. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: JONES, M.; DICKMAN, C.; ARCHER, M. *Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials*. Australia: CSIRO, Canberra, 2003. p. 63-81.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E., GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 288-295, 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JUNIOR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. *Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. 2003. p. 343-380.

PINHEIRO, P. S. Morfologia e ADNmt nos marsupiais *Marmosops incanus* e *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia, Didelphidae): um teste de diversificação ao longo de gradientes ecológicos. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PIRES, A. S.; FERNANDEZ, F. A. S. Use of space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 15, p. 279-290, 1999.

PIRES, A. S.; FERNANDEZ, F. A. S.; BARROS, C. Vivendo em um mundo em pedaços: Efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades e populações animais. In: ROCHA, C. F. D. et al. (Org.). *Biologia da conservação: essências*. Rio de Janeiro: Rima, 2006. p. 231-260.

PIRES, A. S. et al. C. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, v. 108, p. 229-237, 2002.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Rodrigues, 2001. 328p.

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

QUAMMEN, D. *The song of the Dodo: island biogeography in an age of extinctions*. New York: Scribner. 1996. 702p.

QUENTAL, T. B. Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 17, p. 339-352, 2001.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v. 49, n. 6, p. 1280-1283, 1995.

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

RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 Million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings Royal Society of Biology*, v. 263, p. 549-557, 1996.

ROCHA, F. S. *A conservação de pequenos mamíferos no Pontal do Paranapanema (SP): diagnóstico de padrão de comunidades e sugestões de manejo*. Tese (Doutorado em Ciências na área de Ecologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, F. P. *Análise da estrutura genética em populações de pequenos mamíferos, no Parque Estadual do Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes*. Tese (Doutorado em Ciências na área de Genética), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, F. P. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia: Didelphimorphia). *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 8-10, 2006.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. *Ordem Didelphimorphia*. In: REIS, N. R. et al. *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. 437 p.

SAHA, M.C. et al. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, p. 1449-1458, 2006.

SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, n. 4839, p.487-491, 1988.

SAMOLLO, P.B. et al. First-generation linkage map of the gray, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*, reveals genome-wide reduction in female recombination rates. *Genetics*, v. 166, p. 307-329, 2004.

SAMOLLO, P. B. et al. A microsatellite-based, physically anchored linkage map for the gray, short-tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Chromosome Research*, v. 15, n. 3, p. 269- 281, 2007.

SCHUG, M. D.; MACKAY, T. F. C.; AQUADRO, C. F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, v. 15, n. 1, p. 99-102, 1997.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, v. 9, p. 615-629, 2006.

SEOANE, C. E.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Forestalis*, v. 57, p. 123-139, 2000.

SLATKIN, M. A. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 139, p. 457-462. 1995.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia molecular e evolução*. São Paulo: Holos, 2001. p. 172-192.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Atlas dos Renascentes Florestais da Mata Atlântica. 2008. Disponível em: http://mapas.sosma.org.br/site_media/ATLAS%20MATA%20ATLANTICA%20-%20RELATORIO2000-2005.pdf Acesso em: 01 dez. 2008.

STALLINGS, R. L. Conservation and evolution of (Ct)(N)/(Ga)(N) microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. *Genomics*, v. 25, n. 1, p. 107-113, 1995.

STEARNS, S. C. *The evolution of life histories*. Oxford University Press. 1992. 249p.

STEARNS, S. C.; HOEKSTRA, R. F. *Evolution: an introduction*. Oxford University Press. 2000. 381p.

STOCKWELL, C. A.; HENDRY, A. P.; KINNISON, M. T. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 18, n. 2, p. 94-101, 2003.

STORFER, A. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, n. 8, p. 343-347, 1996.

STRAND, M. et al. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in Yeast by Mutations Affecting DNA mismatch repair. *Nature*, v. 365, n. 6443, p. 274-276, 1993.

SUN, H. S.; KIRKPATRICK, B. W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species. *Mammalian Genome*, v. 7, n. 2, p. 128-132, 1996.

TATE, G. H. H. Brief diagnoses of twenty-six apparently new forms of *Marmosa* (Marsupialia) from South America. *American Museum Novitates*, v. 493, p. 1-14, 1931.

TURNER, I. M.; CORLETT, R. T. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, n. 8, p. 330-333, 1996.

VAN BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 2, p. 275-293, 1998.

VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Phylogenetic studies on Didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of Didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 276, p. 1-82, 2003.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2, n. 8, p. 1123-1128, 1993.

WEIR, B.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population in the finite island model. *Genetics*, v. 104, p. 497-512, 1984.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97-159, 1931.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

YOUNG, A. G.; MERRIAM, H. G.; WARWICK, S. I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity*, v. 71, p. 277-289, 1993.

ZENGER, K. R. et al. Characterisation and cross-species utility of microsatellite markers within kangaroos, wallabies and rat kangaroos (Macropodoidea : Marsupialia). *Australian Journal of Zoology*, v. 51, p. 587-596, 2004.

ANEXO I

Protocolo de hibridização seletiva utilizado na obtenção de biblioteca genômica enriquecida com seqüências microssatélites .

1. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA de *Micoureus paraguayanus* foi realizada a partir de tecido preservado em etanol, de dois indivíduos, utilizando-se o kit comercial “Quiagen DNeasy Extraction Kit”, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para avaliação da integridade e quantidade de DNA realizou-se eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

2. Digestão do DNA com Enzima de Restrição

Foram testadas composições de 3 a 4 enzimas até conseguir um rastro forte na região de 200-600 bases. Em seguida, escolhido o tampão ideal para todas (“one-for-all”).

Foi digerido 10ug de DNA, em uma reação de 200ul:

a) DNA (200 ng/ul)	50ul
b) Buffer II	20ul
c) H ₂ O	122ul
d) AluI (5u/ul)	4ul
e) HaeIII (10u/ul)	2ul
f) RsaI (10u/ul)	2ul

A solução foi deixada “over-night” à 37°C e em seguida foi realizada concentração com etanol da seguinte forma:

- a) Adicionar aos 200ul de solução:
 1. Acetato de amônia 3M (10%) 20ul
 2. Álcool 100% (3,5 volumes) 700ul
- b) Deixar 20 min no freezer.
- c) Centrifugar por 10 min à 14000 rpm.
- d) Retirar sobrenadante.
- e) Esperar secar (não muito).
- f) Ressuspender em 20ul de H₂O.

3. Seleção dos fragmentos digeridos com tamanho entre 200 pb e 600 pb

Foi realizada corrida em gel de agarose 1,2%, em tampão TAE, de todo o material (20ul) digerido. Na mesma corrida, nos dois poços laterais ao material foi colocado marcadores de peso molecular de 50 pb e 1 kb. Após a corrida, o gel foi cortado longitudinalmente para que apenas as laterais com os marcadores fossem coradas e visualizadas sobre a luz violeta. Foi feita uma marca no gel, entre 200 e 600 pb para comparar com a região do gel com o material digerido e então cortar o gel com os fragmentos desejados.

Eluição dos fragmentos de DNA entre 200 e 600 pb:

- a) Cortar o gel na altura dos fragmentos de 200 a 600 pb.
- b) Em um tubo falcom colocar os pedaços de gel com 3X o volume (1g = 1ml) de Tiocianato de guanidina 6M.
- c) Incubar em banho maria (bm) por 10 min para dissolver a agarose, ou até que a dissolução se complete.
- d) Extrair o DNA usando a coluna do kit-quiagem. Passar de 500 em 500 ul pela “coluninha”.
- e) Desfosforilar DNA (250ul de reação):

1. DNA	100ul
2. H ₂ O	115ul
3. NEB2 (buffer 10X)	25ul
4. CIP (fosforilase)	10ul
- f) Incubar em bm à 37°C por 1h.
- g) Desnaturar CIP à 75°C por 10 min.
- h) Precipitar DNA com polietilenoglicol (EtOH)
- i) Ler em espectrofotômetro para ver concentração de DNA.

4. Preparação dos adaptadores SNX

Os adaptadores foram sintetizados a partir de duas seqüências denominadas Longa e Curta, são elas:

Seqüência Longa: 5` - GATCGGTGAATTCGGCTCTAGGCTG - 3`

Seqüência Curta: 5` - CAGCCTAGAGCCGAATTCACC - 3`

Essas seqüências foram hibridizadas para a formação do adaptador conforme o protocolo a seguir:

- | | |
|-----------------------------|-------|
| a) Seqüência longa (500 uM) | 20 ul |
| b) Seqüência curta (500 uM) | 20 ul |
| c) TE + 0,1 M NaCl | 10 ul |

A solução foi incubada à 55° C, por 15min, e armazenar por temperatura ambiente por 2h.

5. Ligação dos adaptadores aos fragmentos de DNA digeridos

A ligação dos adaptadores aos fragmentos foi feita conforme a reação abaixo:

- | | |
|---------------------|------|
| a) Linker (200uM) | 1ul |
| b) Buffer II | 5ul |
| c) ATP 10mM | 6ul |
| d) H ₂ O | 11ul |
| e) XmnI (10u) | 2ul |
| f) ligase (5u) | 4ul |
| g) BSA | 1ul |
| h) DNA (5ug) | 20ul |

Foi, então, feita PCR para verificar se houve ligação, conforme descrição a baixo:

a) DNA (40ng)	2,0ul
b) taq	0,4ul
c) tampão	2,5ul
d) dNTP	2,5ul
e) <i>primer</i> (seq. menor)	4,0ul
f) H ₂ O	13,6ul

Termociclador: 1. 96° C 5'

2. 96° C 45''

3. 60° C 1'

4. 72° C 1'

5. 2-4 40X

A avaliação da PCR foi feita através de uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, por 1,5 hora à 100V.

6. Enriquecimento

A seleção dos fragmentos ricos em repetições microssatélites foi realizada através da interação ente esferas magnéticas / estreptavidina + sonda / biotina + DNA, conforme o protocolo a seguir:

a) Desnaturar o DNA à 95° C por 10-15 min.

b) Preparar 100 ul de “hybridization mix”:

DNA + linker (PCR)	10 ul
OLIGOS: GATA (2uM)	1 ul
AACC (2uM)	1 ul
GACA (1uM)	2 ul
SSC 20 X	30 ul
SNX-Lf (10 uM)	3 ul
SDS 1%	5 ul
H2O	48 ul

c) Homogeneizar beads (esferas magnéticas) no vortex e passar 300 ul para eppendorf (1,5 ul)

d) Lavar duas vezes os beads com 300 ul de PBS 1 X + 0,1% de BSA. Retirar o sobrenadante com auxílio do MPC (ímã) e adicionar os 100 ul “hybridization mix”.

e) Incubar à 43° C por uma hora.

f) Colocar no MPC e retirar sobrenadante.

g) Aumentar temperatura para 48° C.

h) Lavar 2X com 200 ul SSC 2X, incubando por 5 min à 48° C.

i) Lavar 2X com 200 ul SSC 1X, incubando por 5 min à 48° C.

j) Lavar 2X com 200 ul SSC 0,5X, incubando por 5 min à 48° C.

l) Lavar 1X com 200 ul SSC 0,5X, incubando por 5 min à 48° C.

m) Adicionar 30 ul de lowTE e desnaturar à 98° C por 15 min. (ELUIÇÃO 1)

n) Adicionar 60 ul de lowTE e desnaturar à 98° C por 15 min. (ELUIÇÃO 2)

o) Adicionar 30 ul de lowTE e guardar o refrigerador.

p) Fazer 2 PCRs, uma com 1 ul das eluição 1 e outra com 5 ul da eluição 2:

1.	H ₂ O	33,5 ul
2.	Tampão	5,0 ul
3.	dNTP	5,0 ul
4.	SNX-Lf (10 uM)	4,0 ul
5.	Taq	0,5 ul
6.	DNA	2,0 ul

Termociclador:	1. 94°C	1'
	2. 94°C	20''
	3. 60°C	30''
	4. 72°C	1'
	5. 2-4 30X	
	6. 72°C	20'

q) Correr um gel para verificar se há DNA.

h) Fazer Precipitação de DNA com solução de polietilenoglicol (PEG), para purificar o produto de PCR, ressuspender em 20ul.

i) Quantificar em espectrofotômetro.

7. Ligação do DNA ao vetor

Ligação do inserto ao vetor foi feita de acordo com kit clonagem utilizando metade das medidas sugeridas pelo kit:

H ₂ O	4,0 ul
Tampão 10X	1,5 ul
Plasmídeo PTZ57R/T (55ng/ul)	1,5 ul
Inserto	6,0 ul
PEG 4000	1,5 ul
T4 DNA ligase (50 ul)	0,5 ul

8. Transformação das células competentes

Para a transformação foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* DH5α e seguiu-se o seguinte protocolo:

- Colocar suspensão celular no gelo até descongelar (3 min).
- Imediatamente aplicar 30 ul da suspensão na reação de ligação (100ng de plasmídeo/20ul de suspensão).
- Homoeneizar e deixar 30 min no gelo.
- Choque térmico em bm à 42° C por 2 min. (evitar trepidação).
- Incubar no gelo por 5 min.
- Acrescentar 500 ul de meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,0) à 37° C.
- Incubar em bm à 37° C por 1h. Verter gentilmente a cada 15 min.
- Centrifugar por 2 min a 3000 rpm.

- i) Descartar sobrenadante (300 ul).
- j) Homogeneizar e verter 20 ul em 10 placas com meio LB, espalhar bem.
- l) Incubar as placas a 37° C por 18h e colocá-las em um refrigerador (4° C).

Após o período de incubação apenas cresceram as bactérias com inserto, uma vez que no meio há ampicilina e as bactérias só se tornam resistentes após a inserção do vetor.

9. Isolamento do DNA das colônias

Foi seguido o seguinte protocolo:

- a) Ressuspender cada colônia em 20 ul de H₂O.
- b) Ferver as amostras por 5 min.
- c) PCR:

H ₂ O	13,7 ul
Tampão	3,0 ul
BSA 1ug/ul	3,0 ul
dNTP	3,0 ul
<i>Primer F</i> (2 uM)	3,0 ul
<i>Primer R</i> (2uM)	3,0 ul
Taq	0,3 ul
DNA	1,0 ul

Termociclador: (2:10 h)

1. 94°C 1'
2. 94°C 30''
3. 55°C 30''
4. 72°C 45''
5. GO TO 2 3X
6. 94°C 30''
7. 55°C 30''
8. 72°C 45''
9. GO TO 6 32X
10. 72°C 10'
11. 15°C 24 h

- d) Para cada colônia foi verificado o resultado da PCR em gel de agarose 1%. A intensidade das bandas indica a quantidade para ressuspensão depois do PEG (10-20 ul).
- e) Foi feito PEG e feita nova corrida para quantificar a solução de DNA.

10. Reação de sequenciamento

Em uma placa, para cada amostra foi feita uma reação de sequenciamento usando um dos *primers* M13 e para aquelas amostras sequenciadas que foram identificados microssatelites foi feita outra reação com o outro *primer* M13 para garantir uma seqüência completa e de qualidade.

A reação de sequenciamento é a seguinte:

- a) H₂O 2,0 ul
- b) *Primer M13* (5 uM) 1,0 ul
- c) ET KIT SOLUTION 4,0 ul
- d) DNA 3,0 ul

Termociclador: (3 h)

1. 94°C 20''
2. 55°C 15''
3. 60°C 3'
5. GO TO 1 30X
6. HOLD 15° C
7. END

Em seguida procedeu-se da seguinte forma:

- a) Aplicou-se na placa 3 ul do DNA
- b) Aplicou-se na placa 7 ul do ET KIT SOLUTION por último, homogeneizar bem.
- c) Incubou-se no termociclador utilizando a temperatura de anelamento do *primer* (M13 R e F, TA = 55° C).

11. Precipitação após PCR de sequenciamento

- a) Adicionar 1ul de acetato de sódio/EDTA (1,5M/259mM) + 40ul etanol 45%
- b) Deixar os tubos no escuro à temperatura ambiente por 20 min.
- c) Centrifugar por 40 min à 4000 rpm (ou 20 min. à 13000 rpm).
- d) Inverter a placa e deixa-la sobre um papel toalha.
- e) Adicionar 150ul de etanol 70%.
- f) Centrifugar por 10 min à 4000 rpm. Inverter a placa e centrifugar invertido (pulso) até 700 rpm.
- g) Deixar a 50°C por 10 min ou 40°C por 50 min a temperatura ambiente. (não secar muito para não dificultar a posterior dissolução no “loading dyebuffer”)
- h) Adicionar 3ul de “loading dyebuffer” e homogeneizar no vortex.
- i) Centrifugar (1 pulso) até 700 rpm.
- j) Embrulhar o que restar na placa em papel alumínio e guardar no freezer a -80°C. Colocar “loading dye buffer” e sequenciar.

12. Finalmente foi feita a análise das seqüências obtidas e desenho dos iniciadores (*primers*).

Precipitação de DNA com solução de polietilenoglicol – EtOH (PEG)

1. Adicionar a amostra solução de PEG (20%) na proporção 1:1. Homogeneizar e incubar no banho maria à 37°C por 15 min. (solução final de 10% de PEG precipita fragmentos pequenos de 200 pb).
2. Centrifugar por 15 min. A 13000 rpm (= 8000G).
3. Eliminar sobrenadante com pipeta.
4. Adicionar lentamente 125 ul de etanol 80% gelado.
5. Centrifugar por 2 min em velocidade máxima.
6. Eliminar sobrenadante.
7. Repetir passos 4 a 6
8. Secar à 37°C por 10 min.
9. Adicionar 20 ul de H₂O.
10. Quantificar DNA em gel de agarose.

Meio LB

Para 1 L de Meio LB com 0,1 ug/ul de Ampicilina, seguiu-se o seguinte protocolo:

- a) Colocar em um bequer:
 1. 10g bacto-peptona (triptona)
 2. 5g extrato de leveduras
 3. 5g NaCl
 4. 800 ml de H₂O destilada
- b) Ajustar para o pH 7,0.
- c) Ajustar o volume final para 1000 ml.
- d) Adicionar no frasco definitivo 15g de agar-agar.
- e) Autoclavar por 15 min.
- f) Quando o meio estiver a uma temperatura suportável ao toque, adicionar 1000 ul de ampicilina.
- g) Homogeneizar bem, plaquear, deixar secar na estufa (37°C) e guardar na geladeira lacrando em papel filme para não secar o meio, até o uso.