

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

ANA CAROLINA RAMOS ARANTES

**Avaliação do *status* taxonômico e análise populacional de  
*Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos Cerrados do estado de  
São Paulo.**

São Carlos, SP  
2011

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Avaliação do *status* taxonômico e análise populacional de  
*Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos Cerrados do estado de  
São Paulo.**

**Ana Carolina Ramos Arantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues.**

São Carlos, SP  
2011

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

A662as

Arantes, Ana Carolina Ramos.

Avaliação do status taxonômico e análise populacional de *Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos Cerrados do estado de São Paulo / Ana Carolina Ramos Arantes. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética. 2. *Clyomys bishopi*. 3. Diversidade genética.  
4. Taxonomia. 5. Estrutura populacional. 6. Estrutura social.  
I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

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

**Avaliação do *status* taxonômico e análise populacional de *Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos Cerrados do estado de São Paulo**

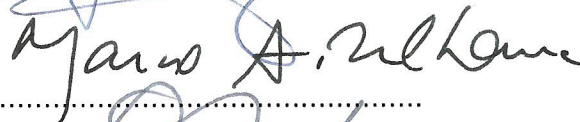
Dissertação de Mestrado de ANA CAROLINA RAMOS ARANTES

Banca Examinadora


Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

.....  


Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

.....  


Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

.....  


*Aos meus pais,  
os maiores mestres da minha vida.*

## *Agradecimentos*

*Agradeço a Deus.*

*A minha família. Meus pais, pelo apoio incondicional aos meus estudos, conselhos, amor e dedicação de sempre. Meus irmãos e cunhadas, pelas conversas, risadas e suporte em todos os momentos. Meu namorado, por todos os anos de companheirismo, abraços, compreensão e amor. Todos vocês contribuíram muito em mais essa etapa da minha vida, amo vocês!*

*Ao professor Fernando Pacheco Rodrigues, pela oportunidade, orientação, todos os ensinamentos transmitidos, paciência e crescimento profissional durante o convívio nestes dois anos e meio.*

*A todos os alunos e amigos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, pelos ótimos momentos de convívio diário, diversão, amizade, companheirismo e conhecimento compartilhado.*

*Aos amigos de perto e de longe, antigos e recentes, que de alguma forma fizeram parte da minha formação pessoal e profissional. Em especial à Tatiana, por todas as conversas, risadas e os muitos anos de amizade.*

*Aos professores que passaram pela minha vida, pelos ensinamentos e inspirações transmitidos.*

*Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, por ceder a estrutura física laboratorial.*

*Ao Roberto Guilherme Trovati, pelas coletas e preciosas informações de campo. E ao apoio dos funcionários da Estação Ecológica de Itirapina – SP.*

*À Pâmela Castro Antunes, por ceder as amostras do Pantanal e ao Prof. Dr. Jader Marinho Filho, por permitir o acesso aos animais depositados na Coleção de Mamíferos da UnB.*

*Ao ICMBio (Proc. No. 21075-1) e ao Instituto Florestal de São Paulo (Proc. No. 260108-014.277/2009), por concederem as licenças necessárias para realização desse projeto.*

*A CAPES, pela bolsa concedida durante o mestrado.*

*Obrigada a todos por contribuírem para a realização deste trabalho!*

*“Chegará o dia em que o homem conhecerá o íntimo dos animais. E neste dia, qualquer crime cometido contra um animal será um crime cometido contra a humanidade.”*

*Leonardo Da Vinci*

## RESUMO

O Cerrado é um dos biomas brasileiros com maior concentração de espécies e endemismo, sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade mundial. Apenas 20% da sua área original continua intacta no país e tem sido continuamente transformada pelas ações humanas, o que faz deste bioma uma área prioritária para conservação. Devido à grande perda de habitat e biodiversidade, faz-se necessário a ampliação do conhecimento de características básicas das espécies existentes. A genética da conservação faz uso da variação genética para inferir sobre o *status* taxonômico e a história de vida de uma espécie, tornando possível a investigação de características como o padrão de estruturação social e de dispersão. Assim, dados básicos de espécies de difícil avaliação direta podem ser acessados e melhores estratégias de conservação podem ser adotadas. Os marcadores moleculares dos tipos mitocondriais e nucleares são importantes ferramentas para estudos de estrutura genética populacional e social em animais. Neste estudo, avaliamos o *status* taxonômico de *Clyomys bishopi*, um roedor colonial e semi-fossorial que habita fisionomias do Cerrado do estado de São Paulo, e ainda a estrutura genética espacial e social de indivíduos coletados na Estação Ecológica de Itirapina-SP. Para a avaliação do *status* taxonômico, analisamos o gene citocromo b de 21 indivíduos do gênero provenientes de várias localidades distribuídas por quase toda a sua área de ocorrência. Métodos filogenéticos baseados em Inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Neighbor-Joining mostraram altos valores de suporte de ramos na separação dos indivíduos de São Paulo em relação ao restante das amostras, e uma distância genética de aproximadamente 4% entre esses grupos, indicando separação genética significativa entre eles. Para a realização das análises populacionais, dez locos microssatélites foram isolados e caracterizados para *Clyomys bishopi*. Analisando-se 40 indivíduos coletados em três áreas no interior da EE de Itirapina, verificamos elevados índices de diversidade genética ( $N_A = 10$ ,  $H_O$  média = 0,76 e  $H_E$  média = 0,90). Nove desses locos, mais a região controle do DNA mitocondrial, foram utilizados para avaliar a estrutura genética espacial e a estrutura social na população analisada. A análise bayesiana de agrupamento não indicou estruturação genética espacial, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre as áreas analisadas. As avaliações de parentesco indicaram, em geral, baixos coeficientes de parentesco entre os indivíduos analisados (0,05), com valores levemente maiores quando se considera indivíduos amostrados em uma pequena escala geográfica. O parentesco médio por sexo não indicou diferenças significativas, o que sugere a existência de dispersão similar entre machos e fêmeas. Os resultados obtidos sugerem que as colônias de *Clyomys bishopi* são formadas por indivíduos em sua maioria não aparentados, apresentando estrutura genética compatível com a de espécies que apresentam hábitos solitários.

Palavras-chave: *Clyomys bishopi*, diversidade genética, taxonomia, estrutura populacional, estrutura social.



## ABSTRACT

Cerrado is one of the Brazilian biomes with the highest concentration of species and endemism, and is considered a hotspot of global biodiversity. Only 20% of its original area remains intact in the country and has been permanently transformed by human actions, which makes this biome a priority area for conservation. Due to the great loss of habitat and biodiversity, it is necessary to increase knowledge of basic characteristics of the existing species. Conservation genetics makes use of the genetic variation to infer the taxonomic *status* and life history of a species, making possible the study of characteristics such as the pattern of social structure and dispersion. Thus, basic data from species to which we have difficult access can be accessed and better conservation strategies can be adopted. Mitochondrial and nuclear markers are important tools for studies of genetic and social structure in animals. In this study we assessed the taxonomic *status* of *Clyomys bishopi*, a colonial and semi-fossorial rodent inhabiting the Cerrado of São Paulo, and also the social and spatial genetic structure of individuals collected in the Estação Ecológica de Itirapina-SP. To evaluate *C. bishopi* taxonomic status we analyzed the cytochrome b gene of 21 individuals belonging to the genus and from various localities of its distribution. Phylogenetic methods based on Bayesian Inference, Maximum Parsimony and Neighbor-Joining showed high values of branch support separating individuals from São Paulo with respect to the rest of the samples, and genetic distance of about 4% between these groups, suggesting a significant genetic separation between them. For population analysis, ten microsatellite loci were isolated and characterized within *C. bishopi*. Through the analysis of 40 individuals sampled at three areas within EE de Itirapina, we verified high levels of genetic diversity ( $N_A = 10$ , average  $H_O = 0,76$  and averaged  $H_E = 0,90$ ). Nine microsatellite loci and the control region of the mitochondrial DNA were used to assess the spatial and social genetic structure of the EE de Itirapina population. The Bayesian clustering analysis indicated no genetic structure, suggesting the occurrence of gene flow between sampled areas. Relatedness analyses indicated, in general, low relatedness indices between analyzed individuals (0.05), with slightly larger values when only individuals in a small geographic scale are considered. The average relatedness by sex indicated no significant differences, suggesting similar dispersion between males and females. Results suggest that colonies of *Clyomys bishopi* are composed largely by unrelated individuals, and present genetic structure compatible to that showed by species with solitary habits.

Keywords: *Clyomys bishopi*, genetic diversity, taxonomy, population structure, social structure.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I.</b> <i>Clyomys laticeps</i> . Fonte: Bonvicino <i>et al.</i> , 2008. ....	6
<b>Figura II.</b> <i>Clyomys bishopi</i> . Fonte: Bueno <i>et al.</i> , 2002. ....	6
<b>Figura III.</b> Mapa de localização das Estações Ecológica e Experimental de Itirapina. Fonte: Silva, 2005. ....	7
<b>Figura 1.1.</b> Mapa do Brasil mostrando a localização das amostras de <i>Clyomys</i> analisadas. ....	15
<b>Figura 1.2.</b> Rede de haplótipos construída no programa Network; os pontos pretos representam eventos mutacionais. ....	17
<b>Figura 1.3.</b> Topologia da árvore consenso obtida através do método de Máxima Parcimônia após 10.000 replicações. Os valores apresentados nos nós representam os suportes de bootstrap. ....	18
<b>Figura 1.4.</b> Topologia da árvore consenso obtida através do método de Inferência Bayesiana após 4.000.000 de gerações, a partir de análises do citocromo b para amostras pertencentes ao gênero <i>Clyomys</i> . Nos nós podem ser visualizados os valores de probabilidade posterior bayesiana (0 a 1) e os valores de bootstrap maiores de 70% para o método de distância Neighbor-Joining. ....	19
<b>Figura 2.1.</b> Digestão do DNA com as enzimas BstUI e RsaI visualizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. ....	29
<b>Figura 2.2.</b> Histograma mostrando a distribuição das frequências alélicas em cada um dos locos analisados. ....	32
<b>Figura 3.1.</b> Distribuição das áreas de coleta dentro da Estação Ecológica de Itirapina. Área A (A1-A10) = 34 amostras; Área B = 6 amostras e C = 2 amostras. ....	39
<b>Figura 3.2.</b> Resultado obtido com o programa Structure para K=2, representando a população não estrutura de <i>C. bishopi</i> . ....	45
<b>Figura 3.3.</b> Resultado obtido com o programa Structure para K=12, representando a população não estrutura de <i>C. bishopi</i> . ....	46
<b>Figura 3.4.</b> Resultados das estimativas de $\ln(P(X K))$ versus o número de agrupamentos K. Os pontos são médias entre 6 corridas independentes com 1.000.000 repetições da MCMC e 500.000 repetições de “burn-in”. ....	46
<b>Figura 3.5.</b> Estimativa do número de agrupamentos (K) de acordo com o método de Evanno <i>et al.</i> (2005). ....	46
<b>Figura 3.6.</b> Gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) mostrando a sexagem de 5 indivíduos (2 machos e 3 fêmeas); PM = Marcador de peso molecular. ....	47
<b>Figura 3.7.</b> Ilustração representando o número de indivíduos machos e fêmeas em cada uma das áreas de coleta, conforme determinado através da sexagem molecular. ....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Distâncias genéticas médias (DGM) dentro e entres os clados 1, 2 e 3. ....	20
<b>Tabela 2.1.</b> Descrição dos 10 locos de microssatélites isolados para o rato-de-espinho ( <i>Clyomys bishopi</i> ). .....	31
<b>Tabela 3.1.</b> Caracterização da diversidade genética encontrada em <i>Clyomys bishopi</i> na EE de Itirapina, através da análise de 10 locos microssatélites. ....	44
<b>Tabela 3.2.</b> Distribuição dos haplótipos de DNA mitocondrial entre as áreas de coleta. Os números apresentados referem-se à quantidade de indivíduos com um determinado haplótipo em cada uma das áreas.....	45
<b>Tabela 3.3.</b> Valores de $p$ para análise de gargalo populacional.....	47
<b>Tabela 3.4.</b> Valores de probabilidade de exclusão ( $P_E$ ) por loco e combinado para todos os locos.....	48
<b>Tabela 3.5.</b> Valores médios de parentesco e erro padrão para as diferentes áreas e sítios de coleta, separados ou não de acordo com o sexo, e valores percentuais de pares de indivíduos relacionados (PO, FS ou HS).....	49
<b>Tabela 3.6.</b> Distribuição dos pares de indivíduos relacionados dentro e entre sítios e áreas de coleta.....	50
<b>Tabela 3.7.</b> Identificação dos pares de indivíduos apresentando parentesco de primeira ordem na área A, relacionando o sexo (F=fêmea, M=macho), sítio de coleta e distâncias entre os sítios.....	50

# Sumário

Introdução Geral .....	1
Cerrado: biodiversidade e estado de conservação .....	2
Genética e a conservação da biodiversidade .....	3
A espécie <i>Clyomys bishopi</i> (rato-de-espinho) .....	5
A Estação Ecológica de Itirapina (EEI).....	6
Justificativa.....	8
Objetivos.....	9
Capítulo 1 .....	10
Análise do DNA mitocondrial (Citocromo b) para a resolução das incertezas taxonômicas no gênero <i>Clyomys</i> .....	11
Abstract.....	11
Resumo .....	11
1.1. Introdução.....	12
1.2. Material e Métodos .....	14
1.3. Resultados.....	16
1.4. Discussão.....	20
Capítulo 2 .....	23
Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para <i>Clyomys bishopi</i> (Rodentia: Echimyidae).....	24
Abstract.....	24
Resumo .....	24
2.1. Introdução.....	25
2.2. Material e Métodos .....	26
2.3. Resultados.....	28
2.4. Discussão.....	33
Capítulo 3 .....	35
Avaliação da estrutura genético-populacional e genético social de <i>Clyomys bishopi</i> , um roedor endêmico dos cerrados do estado de São Paulo .....	36
Abstract.....	36
Resumo .....	36
3.1. Introdução.....	37
3.2. Material e Métodos .....	38
3.3. Resultados.....	43
3.4. Discussão.....	50
Conclusões.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
APÊNDICES .....	64
ANEXOS .....	67

# **Introdução Geral**

## Introdução Geral

### *Cerrado: biodiversidade e estado de conservação*

O crescimento exacerbado da população humana tem levado a uma grande diminuição da riqueza de espécies no mundo, e até mesmo a extinções de espécies ou comunidades inteiras. Tal fato tem acontecido devido às perturbações em massa causadas pelo homem, as quais resultam na degradação e destruição da paisagem em larga escala. As maiores ameaças que o homem tem causado à diversidade biológica são: superexploração das espécies, introdução de espécies exóticas, aumento da ocorrência de doenças e, a maior e principal delas, a destruição, degradação e fragmentação de habitats naturais (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Um dos biomas mais ameaçados do Brasil é o Cerrado, considerado a maior região de savana da América do Sul e o segundo maior bioma sul-americano depois da Amazônia. Originalmente o Cerrado ocupava 21% da superfície terrestre do país e distribuía-se pelo nordeste do Paraguai, leste da Bolívia e a parte central do Brasil (SILVA; BATES, 2002; KLINK; MACHADO, 2005). Apresenta um grande número de espécies endêmicas, sendo que 44% das plantas vasculares, 30% dos anfíbios, 20% dos répteis, 1,4% das aves e 11,8% dos mamíferos encontrados no Cerrado só ocorrem nesse ecossistema. O elevado endemismo é explicado pela ocorrência de estratificação horizontal ocasionada pela existência de diversas fisionomias, classificadas em ordem crescente de densidade de vegetação como campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu strictu* e cerradão. Estas fisionomias se distribuem em mosaicos complexos com características próprias, o que permitiu a diversificação e a especialização de linhagens (SILVA; BATES, 2002; HÜLLE, 2006; THOMÉ, 2006). Uma visão alternativa sobre a aplicação do conceito de bioma ao Cerrado e às suas fisionomias é fornecida por Batalha (2011). Segundo esse autor, o Cerrado não é um complexo de fitofisionomias, mas um complexo de biomas, pois tal termo deve ser definido além da formação vegetal da região e incluir também suas características funcionais (associação da vegetação com a fauna local). Sendo assim, o autor propõe a existência de três biomas dentro do que se chama de Cerrado, cada um deles com características próprias e bem definidas\*.

Apesar da rica biodiversidade e elevado endemismo este bioma tem recebido pouca atenção com relação a medidas de conservação. Segundo Mittermeier *et al.* (2000) apenas 20% da área original do cerrado ainda continua intacta, sendo que apenas 2% desta encontra-

---

\* Para maiores detalhes ver Batalha, 2011.

se protegida em reservas e parques (SILVA; BATES, 2002; KLINK; MACHADO, 2005). Este fato tem permitido que este bioma venha desaparecendo rapidamente, principalmente em função da transformação de suas áreas para a implantação de atividades agrícolas (COSTA *et al.*, 2005; KLINK; MACHADO, 2005). Tal transformação tem causado sérios danos ambientais como erosão do solo, poluição das águas, alterações nos regimes de incêndio, fragmentação de habitat e, conseqüentemente, perda de diversidade biológica (KLINK; MACHADO, 2005). A alta concentração de espécies endêmicas e a grande perda de habitat ocasionada pelas ações antrópicas fazem com que o Cerrado brasileiro seja considerado um *hotspot* de biodiversidade mundial e, portanto, uma área prioritária para conservação (MYER *et al.*, 2000).

### *Genética e a conservação da biodiversidade*

A genética da conservação, como a conhecemos hoje, é uma disciplina relativamente nova que utiliza um grande número de metodologias oriundas de diversas áreas do conhecimento, como a biologia evolutiva, sistemática, genética molecular e ecologia, entre outras. Devido à ampla gama de questões possíveis de serem abordadas por esta ciência, ela vêm se tornando uma das disciplinas centrais dentro da biologia da conservação, auxiliando na conservação da diversidade biológica nos seus três níveis principais: genes, espécies e ecossistemas (FRANKHAM, 2010).

Dois dos principais temas abordados pela genética da conservação são a identificação correta das espécies existentes dentro de um determinado grupo taxonômico e a avaliação da diversidade e estrutura genética encontrada em uma espécie e suas populações. O reconhecimento adequado do estado taxonômico dos organismos é uma premissa básica dentro da biologia da conservação, para que os esforços de conservação sejam adequadamente direcionados. A genética da conservação pode ser utilizada como ferramenta na produção de informações relevantes para a resolução de incertezas taxonômicas e para a definição de unidades de manejo ou unidades com potencial evolutivo único dentro de espécies, e assim, entre outras ações, evitar a perda de linhagens evolutivas importantes e a perda da diversidade genética à elas associadas (GALETTI *et al.*, 2008; FRANKHAM, 2010). No que tange à avaliação da diversidade e estrutura genética populacional, esta também é de suma importância dentro da genética da conservação, já que o conhecimento da distribuição espacial da variação genética fornece informações importantes sobre a biologia de uma espécie e permite, entre outros, a realização de inferências sobre os padrões de estruturação social e de dispersão.

Diversos tipos de marcadores moleculares estão atualmente disponíveis para o estudo da diversidade e estrutura genética nos animais. Entre estes, destacam-se os marcadores do tipo microssatélites e os marcadores mitocondriais. Os microssatélites são seqüências simples repetidas em tandem no DNA que variam de 1 a 6 bases (ZANE *et al.* 2002). A detecção dessas regiões é feita a partir de *primers* que flanqueiam tais seqüências repetitivas e permitem sua amplificação através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sendo os fragmentos amplificados visualizados em gel de eletroforese. O alto polimorfismo geralmente encontrado, sua característica codominante, e a facilidade de detecção através da PCR tornam os marcadores microssatélites extremamente úteis para o estudo de indivíduos, famílias e populações e para a avaliação da estrutura genética a elas associadas (SOLE-CAVA, 2001; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2003). Já o DNA mitocondrial é transmitido por apenas um dos sexos e é utilizado com freqüência em estudos de genética de populações e sistemática molecular para a obtenção de dados de evolução e dispersão. Além da herança uniparental (via materna na maioria das espécies), o DNA mitocondrial caracteriza-se por ausência de recombinação e altas taxas evolutivas quando comparadas ao DNA nuclear (CALCAGNOTTO, 2001). A região controle do DNA mitocondrial (D-loop), portadora do local de origem de replicação desta molécula, apresenta domínios altamente variáveis, sendo por isso utilizada na abordagem de diversas questões populacionais (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2003). Já as regiões mais conservadas do DNA mitocondrial são utilizadas com sucesso em estudos filogenéticos e filogeográficos. Uma destas regiões é a do gene citocromo b, que devido à sua função na respiração celular, é bastante conservado em todos os organismos de maneira equivalente, o que o torna um bom marcador molecular para análises de relações evolutivas entre organismos (RUSSO, 2001).

A análise destes marcadores tem sido utilizada no estudo de genética de populações animais, e sua aplicação na conservação de espécies inclui o estudo de hibridação (VIANNA *et al.*, 2006), análise da variabilidade genética dentro e entre populações (VAN VUUREN *et al.*, 2004; PURRENHAGE *et al.*, 2009), determinação de parentesco (MATOCQ; LACEY, 2004; ZEYL *et al.*, 2009), sistemática molecular (SULLIVAN *et al.*, 1996), identificação molecular de espécies (FARRELL *et al.*, 2000; BITANYL *et al.*, 2011), determinação de unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e dispersão (DIXON *et al.*, 2006; LECOMTE *et al.*, 2009), entre outros.



## *A espécie *Clyomys bishopi* (rato-de-espinho)*

O gênero *Clyomys* pertence à subfamília Eumysopinae, a mais diversa da família Echimyidae (LEITE; PATTON, 2002). Até 1981 poucos autores citaram o gênero, e apenas uma única espécie havia sido descrita (*Clyomys laticeps* – Figura I), quando Ávila-Pires e Wutke abordaram a existência de mais uma espécie, *Clyomys bishopi* (Figura II). Esta foi diferenciada da primeira por características morfológicas distintas, como coloração diferenciada no dorso (castanho-avermelhado em *C. laticeps* e cinza-amarelada em *C. bishopi*), medidas da série molar superior, comprimento palatal, largura da caixa craniana, tamanho corporal (menores em *C. laticeps* e maiores em *C. bishopi*) e distribuição geográfica (*C. laticeps* ocupando amplamente as áreas de Cerrado da América do Sul e *C. bishopi* restrita ao Cerrado do estado de São Paulo) (ÁVILA-PIRES; WUTKE, 1981; BEZERRA, 2003).

Recentemente Bezerra e Oliveira (2010), baseando-se na análise de medidas craniodentais e de coloração da pelagem, não encontraram diferenças significativas entre os animais de São Paulo e do restante do Brasil, o que os levou a afirmar que *C. bishopi* seria apenas um sinônimo júnior de *C. laticeps* e a considerar a existência de uma única espécie em todo o Cerrado. Apesar disso, ainda não existe consenso dentro da comunidade científica acerca do *status* taxonômico das populações encontradas no estado de São Paulo.

Apesar de existirem poucas informações sobre *C. bishopi* disponíveis na literatura, alguns autores dão informações importantes sobre a espécie. Trata-se de um roedor herbívoro, colonial e semi-fossorial (VIEIRA, 1997; BUENO *et al.*, 2004; BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2006) que habita fisionomias de Cerrado limitadas ao estado de São Paulo (ÁVILA-PIRES e WUTKE, 1981; BUENO *et al.*, 2004). Possui alimentação especializada em monocotiledôneas (VIEIRA, 1997; BUENO *et al.*, 2004), atuando como dispersores de espécies vegetais como *Attalea geraensis* (ALMEIDA; GALETTI, 2007). Em sua área de ocorrência *C. bishopi* representa um importante recurso alimentar para diversas espécies, sendo predado por animais como o lobo-guará, o cachorro-do-mato, e diversas espécies de corujas e cascavéis (BUENO *et al.*, 2002; BUENO 2003; BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2006; MOTTA-JUNIOR *et al.*, 2004). Não há dados publicados sobre tamanho e peso corporal para *C. bishopi*, contudo, para *C. laticeps*, Oliveira e Bonvicino (2006), descrevem que os indivíduos apresentam tamanho mediano em relação à outros roedores e cauda bem menor que o corpo (cauda = 48-89 mm, corpo = 145-208 mm), e pesam entre 100 e 257 gramas.



**Figura I.** *Clyomys laticeps*. Fonte: Bonvicino *et al.*, 2008.



**Figura II.** *Clyomys bishopi*. Fonte: Bueno *et al.*, 2002.

De acordo com Burda *et al.* (2000), roedores subterrâneos e fossoriais podem apresentar diversos sistemas sociais, variando de indivíduos solitários, coloniais, sociais comunal ou familiar até eussociais. Estes sistemas crescem em complexidade com relação a algumas características como o monopólio de acasalamentos, cuidados com a prole e dispersão.

Apesar de ser considerado uma espécie social (BURDA *et al.* 2000), pouco se conhece sobre os hábitos comportamentais dos indivíduos pertencentes ao gênero *Clyomys*. Segundo R. G. Trovati (*comunicação pessoal*), ocasionalmente verifica-se a captura simultânea de 2 a 3 indivíduos de *C. bishopi* em uma mesma armadilha o que, segundo Granjon e Cosson (2008), revela a ocorrência de interações sociais em populações de roedores.

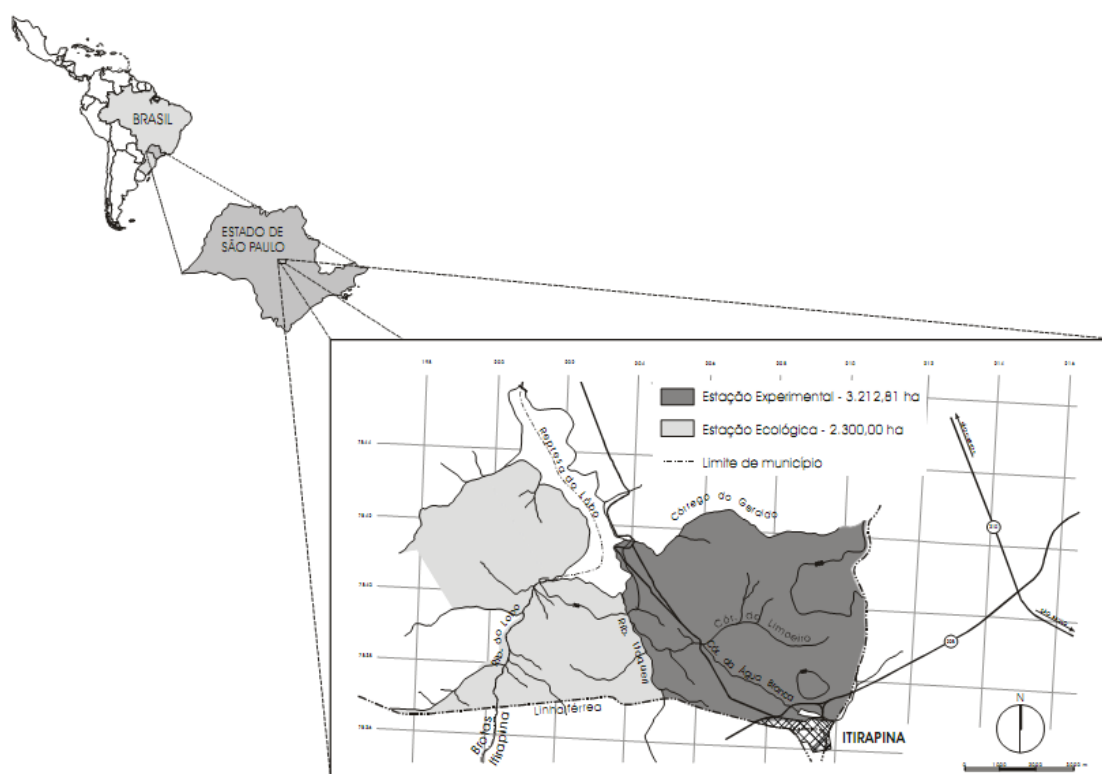
Com relação ao hábito colonial, Burda *et al.* (2000) define como coloniais os roedores fossoriais que constroem seus sistemas de tocas próximos uns aos outros. Através de observações próprias, verificamos agrupamentos de tocas de *C. bishopi* nas áreas de sua ocorrência associadas às áreas com alta incidência de palmáceas, como *Attalea geraensis* (Arecaceae), espécie que apresenta dispersão de suas sementes e frutos efetuada por este roedor.

Diante das incertezas relacionadas à identificação taxonômica das espécies existentes no gênero *Clyomys*, assim como a ausência de informações mais precisas em relação à estrutura populacional e social apresentada por elas, a utilização de marcadores moleculares pode ser bastante útil e trazer informações importantes para o conhecimento deste grupo.

### *A Estação Ecológica de Itirapina (EEI)*

No estado de São Paulo o bioma Cerrado originalmente abrangia 14% do seu território. Hoje, porém, apenas 1% ainda existe, estando esse remanescente distribuído em pequenos fragmentos que perfazem cerca de 238.400 ha (CAVALCANTI; JOLY 2002).

A Estação Ecológica de Itirapina (EEI) é uma unidade de conservação regida pelo SNUC (Sistema Nacional de Unidade de Conservação) e administrada pelo Instituto Florestal do Estado de São Paulo, sendo considerado um dos principais remanescentes de Cerrado do estado (ZANCHETTA; DINIZ, 2006). Atualmente, a EEI faz divisa com a Estação Experimental de Itirapina (Figura III), que é destinada principalmente ao desenvolvimento de atividades silviculturais e visitação pública, enquanto que a Estação Ecológica objetiva a preservação da natureza e a realização de pesquisas científicas (DELGADO *et al.* 2004; SILVA, 2005).



**Figura III.** Mapa de localização das Estações Ecológica e Experimental de Itirapina. Fonte: Silva, 2005.

A EEI encontra-se na unidade geomorfológica da “Província de Cuestas Basálticas”, estando inserida em uma região denominada de Planalto de São Carlos com altitudes que vão de 705 a 750 m. Localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas (coordenadas 22° 00’ a 22° 15’ S e 47° 45’ a 48° 00’W), esta reserva possui aproximadamente 2.300 ha inseridos em uma matriz composta por áreas de pinus (*Pinus spp.*), eucalipto (*Eucalyptus spp.*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), laranja (*Citrus aurantium*) e áreas de pastagens exóticas (predominantemente *Brachiaria decumbens*) (DELGADO *et al.*, 2004). As principais fisionomias deste fragmento são o campo sujo, com aproximadamente 1.250 ha, e o campo cerrado, com cerca de 370 ha. A paisagem é também composta por áreas de várzeas e

fragmentos de cerrado *sensu stricto*, florestas de galeria, floresta paludosa e cerradão. *Pinus* spp., *Eucalyptus* spp., *Brachiaria decumbens* e *Melinis minutiflora* são espécies invasoras em praticamente todos os ambientes da EEI, o que constitui causa de grande impacto sobre a fauna local (BUENO *et al.*, 2002; BUENO *et al.*, 2004; HÜLLE, 2006). O clima da região é do tipo Mesotérmico com uma estação seca pronunciada entre abril e setembro (pluviosidade média de 44,2 mm) e chuvosa entre outubro e março (média de 191,2 mm) (MOTTA-JUNIOR *et al.*, 2008).

Apesar de sua pequena área a Estação Ecológica de Itirapina é considerada uma das áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade no estado de São Paulo, estando ali presentes um grande número de aves (cerca de 231 espécies, muitas delas ameaçadas de extinção - MOTTA-JUNIOR *et al.*, 2008; TELLES; DIAS, 2009), répteis e anfíbios (SAWAYA, 2003; BRASILEIRO, 2005; THOMÉ, 2006), e mamíferos de pequeno, médio e grande porte (HÜLLE, 2006). Entre os grandes mamíferos, destaca-se a presença de onças-pardas (HÜLLE, 2006) e do lobo-guará (BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2006). Dentre os roedores, Vieira (1997) e Bueno *et al.* (2002) relatam que *Clyomys bishopi* parece ser um dos pequenos mamíferos mais abundantes.

### *Justificativa*

Devido à intensa destruição dos habitats e à crescente perda de biodiversidade, torna-se necessário a realização de estudos que ampliem o conhecimento sobre as características biológicas básicas das espécies pertencentes à nossa fauna. Somente a partir das informações acumuladas sobre elas, nos diferentes campos do conhecimento, é que medidas efetivas para a sua conservação poderão ser tomadas.

O reconhecimento correto do *status* taxonômico dos organismos é crucial para programas de manejo e conservação, permitindo assim que estes sejam realizados com sucesso e evitando a perda de biodiversidade ainda não conhecida. Por outro lado, a avaliação da distribuição espacial da diversidade genética em populações naturais pode fornecer informações importantes acerca da relação existente entre a estrutura genética, a estrutura social e a capacidade de dispersão de uma espécie. A investigação desses tópicos utilizando o rato-de-espinho (*Clyomys bishopi*) torna este projeto bastante relevante, já que seu *status* taxonômico ainda não está resolvido e esta é uma das poucas espécies de roedor brasileiro que, acredita-se, apresenta hábitos sociais. Além disso, *Clyomys bishopi* seria uma espécie endêmica das áreas de Cerrado do estado de São Paulo, muito pouco conhecida e por isso apresentada como tendo deficiência de dados na lista de espécies ameaçadas da IUCN.

Além do conhecimento relativo às forças evolutivas que governam a estruturação genética em *C. bishopi*, a realização desse estudo poderá fornecer subsídios importantes para a adoção de medidas que visem a conservação das áreas onde essa espécie ocorre, como a Estação Ecológica de Itirapina, uma das reservas naturais mais ricas em biodiversidade do estado. Além disso, é importante que países em desenvolvimento tenham o domínio e utilizem as biotécnicas atualmente disponíveis para a avaliação e conservação de seus recursos naturais.

## *Objetivos*

- Objetivo geral

Avaliar o *status* taxonômico de *Clyomys bishopi* e analisar a diversidade e estrutura genética populacional e social de indivíduos em uma área de sua ocorrência.

- Objetivos específicos

Avaliação do *status* taxonômico da espécie *Clyomys bishopi* através da análise do gene citocromo b em indivíduos pertencentes ao gênero oriundos de várias localidades do Brasil.

Isolamento e caracterização de locos de microssatélites específicos para *Clyomys bishopi*.

Avaliação da estrutura genética populacional de *Clyomys bishopi* através da análise de indivíduos coletados em diferentes áreas amostrais dentro da Estação Ecológica de Itirapina (SP).

Avaliação da estrutura genética social e das relações de parentesco entre indivíduos de *Clyomys bishopi* coletados em diferentes áreas amostrais dentro da Estação Ecológica de Itirapina (SP).

## **Capítulo 1**

**Análise do DNA mitocondrial (*Citocromo b*) para a  
resolução das incertezas taxonômicas no gênero  
*Clyomys***

## Análise do DNA mitocondrial (Citocromo b) para a resolução das incertezas taxonômicas no gênero *Clyomys*

### *Abstract*

The genus *Clyomys* has been the target of taxonomic uncertainties regarding the number of species it holds. While some authors assert de existence of only one species, *C. laticeps*, distributed throughout the Brazilian cerrado, others describe a second one, *C. bishopi*, restricted to the cerrado of São Paulo. We analyzed 21 individuals of the genus from various areas of occurrence using the cytochrome b gene, and performed phylogenetic and genetic distance analysis between samples. Methods of Bayesian Inference, Maximum Parsimony and Neighbor-Joining showed high values of support for the separation of three major clades: the first clade composed of individuals from the states of MG, GO, DF and BA; clade 2 by individuals from the Pantanal-MS and clade 3, sheltering individuals from EE Itirapina-SP. Genetic distances between clades were: clades 1 x 2 equal to 2.7%, clade 1 x 3 equal to 4.2% and clades 2 x 3 equal to 4.1% All results obtained in this work show a significant genetic separation between individuals from São Paulo compared to the other sampled regions and suggest that *C. bishopi* continues to be considered a valid species.

### Resumo

O gênero *Clyomys* vem sendo alvo de incertezas taxonômicas quanto ao número de espécies que abriga, com alguns autores afirmando existir uma única espécie, *C. laticeps*, distribuída ao longo de todo cerrado brasileiro, enquanto outros relatam a existência de uma segunda espécie, *C. bishopi*, restrita aos cerrados do estado de São Paulo. Analisamos 21 indivíduos do gênero provenientes de várias áreas de ocorrência utilizando o gene mitocondrial citocromo b, e realizamos análises filogenéticas e de distância genética entre as amostras. Métodos de Inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Neighbor-Joining mostraram a ocorrência de 3 clados principais: o clado 1 composto por indivíduos dos estados de MG, GO, DF e BA; clado 2 por indivíduos proveniente do Pantanal-MS e clado 3, abrigando indivíduos da EE de Itirapina-SP. As distâncias genéticas entre os clados foram: clados 1 x 2 igual a 2,7%, clados 1 x 3 igual a 4,2% e clados 2 x 3 igual a 4,1%. Todos os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam uma separação genética significativa entre os indivíduos de São Paulo em relação às outras regiões amostradas e sugerem que *C. bishopi* continue sendo considerada como uma espécie válida.

## 1.1. Introdução

A genética da conservação é uma ciência aplicada dentro da biologia da conservação que envolve a aplicação da genética evolutiva e molecular para conservação da biodiversidade (FRANKHAM, 2010). Um dos principais papéis da genética da conservação está na contribuição para resolver incertezas taxonômicas e definir unidades evolutivas divergentes para o manejo apropriado dentro de espécies, evitando que seja negada proteção às espécies em perigo ou que esforços sejam desperdiçados com espécies abundantes (GALETTI *et al.*, 2008).

O DNA mitocondrial é uma importante ferramenta para estudos de relações evolutivas entre indivíduos, populações e espécies, por apresentar características como herança uniparental, ausência de recombinação e altas taxas evolutivas (CALCAGNOTTO, 2001). Entre as várias regiões gênicas presentes no DNA mitocondrial, uma das mais utilizadas é a do gene citocromo b, a qual tem sido extensamente analisada e possui várias sequências parciais ou completas já depositadas em bancos de dados. Muitos estudos filogenéticos utilizando sequências deste gene podem ser encontrados na literatura para roedores. Este marcador têm sido utilizado com sucesso para, entre outros estudos, revisitar relações filogenéticas (LEITE; PATTON, 2002), apoiar estados taxonômicos previamente estabelecidos (LIST *et al.*, 2010; ORDÓÑEZ-GARZA *et al.*, 2010), definir linhagens genéticas evolutivas (SAKKA *et al.*, 2010) e reconhecer grupos candidatos a espécies válidas (ROGERS; GONZÁLES, 2010).

A definição do número de espécies existentes dentro do gênero *Clyomys* tem sido motivo de grande discussão no meio científico, principalmente nos últimos anos. A primeira descrição de *Clyomys laticeps* foi realizada por Thomas (1909), tendo como base um espécime coletado em Lagoa Santa, no estado de Minas Gerais. Posteriormente Moojen, em 1952, reconheceu a existência de uma subespécie distinta no Chaco Paraguai, denominada por ele de *C. laticeps whartoni*. Já em 1974, Bishop verificou que animais coletados na Serra do Roncador (Mato Grosso) e em Itapetininga (São Paulo) apresentavam características morfológicas distintas dos holótipos de *C. laticeps* e *C. l. whartoni*. Apesar das diferenças no tamanho corporal e na coloração da pelagem observadas naquele momento, Bishop apenas sugeriu que novos estudos fossem realizados com um número mais representativo de amostras, antes que novas designações taxonômicas fossem realizadas.

Uma nova revisão foi publicada em 1981 por Ávila-Pires e Wutke, os quais sugeriram então a existência de duas espécies: a primeira delas, *C. laticeps*, distribuindo-se desde o Chaco Paraguai até os estados de Minas Gerais e Bahia, passando por todo Cerrado do Brasil



Central; e a segunda, *C. bishopi*, restrita às áreas de Cerrado existentes no interior do estado de São Paulo.

Entretanto essa classificação proposta por Ávila-Pires e Wutke (1981) foi contestada em uma revisão recente do gênero realizada por Bezerra e Oliveira (2010). Segundo esses autores, a análise de caracteres craniodentais de 78 espécimes adultos de *Clyomys* evidencia a existência de dois grupos geográficos, não condizentes com a classificação taxonômica proposta por Ávila-Pires e Wutke (1981). Desta forma, além de sugerir uma divisão no sentido leste-oeste (amostras de SP e DF à leste, e amostras de Goiás (PN de Emas), Mato-Grosso do Sul e Mato-Grosso (Serra do Roncador) à oeste), Bezerra e Oliveira (2010) sugerem que *C. bishopi* não é uma espécie válida, e seria portanto apenas um sinônimo júnior de *C. laticeps*.

Essa alteração realizada na classificação taxonômica dos animais existentes no estado de São Paulo afeta diretamente a sua conservação, já que esta informação é utilizada por organismos governamentais e não-governamentais para a confecção das Listas de Espécies Ameaçadas do país e do estado, as quais servem de base para o estabelecimento de políticas públicas de proteção à natureza. Na Lista de Espécies Ameaçadas do Estado de São Paulo de 1998, *C. bishopi* é classificado como vulnerável. Na Lista publicada dez anos depois, em 2008, *C. bishopi* foi substituído por *C. laticeps*, sendo classificado como apresentando dados deficientes. Já na Lista de Espécies Ameaçadas da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) *C. bishopi*, classificada como vulnerável em 2009, é apresentada como possuindo dados deficientes em 2010 (IUCN, 2010). Segundo a IUCN, a inclusão de *C. bishopi* dentro dessa categoria deve-se à falta de informações recentes sobre a espécie e ao fato de que ela poderia ser um sinônimo de *C. laticeps*, necessitando então de estudos que ajudem a resolver seu *status* taxonômico.

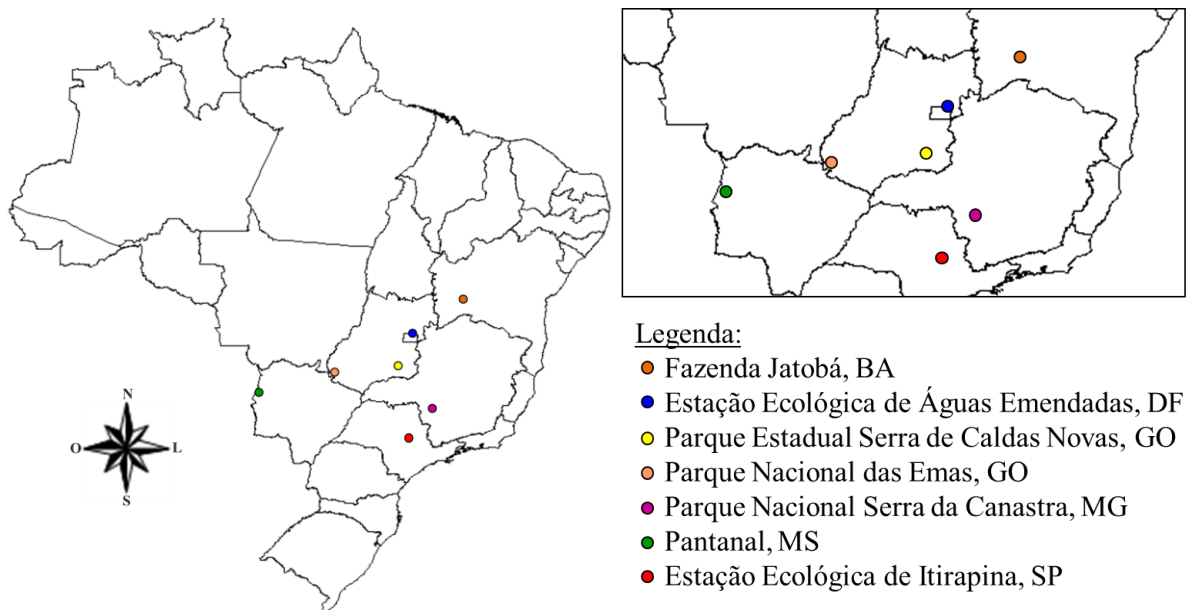
Diante de tais incertezas, o trabalho aqui apresentado tem como objetivo avaliar a diferenciação genética existente entre indivíduos pertencentes ao gênero *Clyomys*. Para tanto, analisamos o gene mitocondrial citocromo b de espécimes coletados em várias localidades, envolvendo quase toda a distribuição do gênero. Desta forma esperamos contribuir para a resolução das incertezas taxonômicas ainda existentes dentro deste grupo, fornecendo informações que possam ser úteis para o estabelecimento de políticas públicas e para a conservação das espécies da nossa fauna.

## 1.2. Material e Métodos

### *Obtenção das amostras e extração do DNA*

A avaliação taxonômica de *Clyomys* sp. foi realizada utilizando-se 21 amostras provenientes de diferentes localidades, abrangendo grande parte da distribuição conhecida para este gênero no Brasil (Figura 1.1). Dez amostras, provenientes dos estados de Minas Gerais (n=1), Bahia (n=1), Goiás (n=6) e do Distrito Federal (n=2), foram obtidas junto à Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília, sendo constituídas por um pequeno fragmento da pele ou de tecido muscular retirado dos animais depositados naquela coleção. Outras 11 amostras, constituídas por fragmentos de tecido preservados em etanol absoluto, foram obtidas de animais coletados por pesquisadores em fazendas na região do Pantanal (Corumbá – MS; n = 5) e de animais capturados por nós na Estação Ecológica de Itirapina, em São Paulo (n = 6).

Antes de realizarmos a extração de DNA das amostras da coleção da UnB, estas foram submetidas à um processo de lavagem e hidratação. Para tanto, as amostras foram mantidas em água destilada à 37° C durante 3 dias, durante os quais elas foram agitadas e a água trocada diariamente. Após esse processo o DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial DNeasy Blood & Tissue seguindo as instruções do fabricante. O DNA das amostras do Pantanal e da EE de Itirapina foi extraído através do método de fenol:clorofórmio, seguindo-se um protocolo de extração baseado na metodologia descrita por Sambrook e Russel. (2001). Um volume de 5µl foi aplicado em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualizado em transluminador de luz UV, a fim de se avaliar a qualidade do DNA extraído.



**Figura 1.1.** Mapa do Brasil mostrando a localização das amostras de *Clyomys* analisadas.

### *Amplificação e sequenciamento do gene citocromo b*

Um fragmento de aproximadamente 300pb do citocromo b foi amplificado para as 21 amostras obtidas, utilizando-se os *primers* L-14841 e H-15149 descritos por Kocher e colaboradores (1989). Tratam-se de *primers* conservados para várias espécies de vertebrados, incluindo peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos.

Foram feitas reações de amplificação (PCR) com volume final de 25 $\mu$ l, contendo 100ng de DNA, solução tampão 1X, 0,2mM de dNTPs, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 0,3 $\mu$ M de cada um dos *primers*. O ciclo das PCRs foi iniciado com uma etapa de desnaturação a 94°C por 10 min, seguido de 38 ciclos a 93°C por 1min, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, sendo finalizado com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualizados em transluminador de luz UV.

Os produtos da amplificação da região do citocromo b foram purificados através da precipitação diferencial com polietilenoglicol (PEG) (LIS; SCHLEIF, 1975) e enviados para sequenciamento em sequenciador automático ABI3730XL na empresa Macrogen (Coreia do Sul).

### *Análises estatísticas*

O software BioEdit (HALL, 1999) foi utilizado para analisar a qualidade do sequenciamento do DNA mitocondrial e para realizar o alinhamento múltiplo das sequências

através da ferramenta Clustal W. Após o alinhamento, as sequências foram editadas e utilizadas nas análises posteriores.

Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram calculados no programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009). A frequência dos haplótipos e as relações entre eles foram investigadas através da construção de uma rede de haplótipos pelo método median-joining, utilizando-se o programa Network versão 4.6.0 (disponível em <http://www.fluxus-engineering.com>).

As sequências do gene citocromo b foram analisadas utilizando métodos filogenéticos bayesianos, de máxima parcimônia e de distância genética. Para inferência bayesiana, utilizamos o programa MrModelTest versão 2.3 (NYLANDER, 2004) para selecionar, através de uma relação hierárquica de probabilidade, o modelo de evolução molecular mais apropriado aos nossos dados. O modelo GTR + I (General Time Reversible + Invariable sites) foi selecionado usando o critério de informação Akaike (AIC) para substituição de nucleotídeos

No programa MrBayes versão 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) foram feitas duas corridas independentes simultaneamente, cada uma usando 1 cadeia fria e 3 quentes. Após 4.000.000 de gerações de MCMC (Cadeias de Markov) para o conjunto de dados, árvores e parâmetros foram amostrados a cada 1000 gerações, descartando-se 25% das árvores amostradas como “*burn in*”.

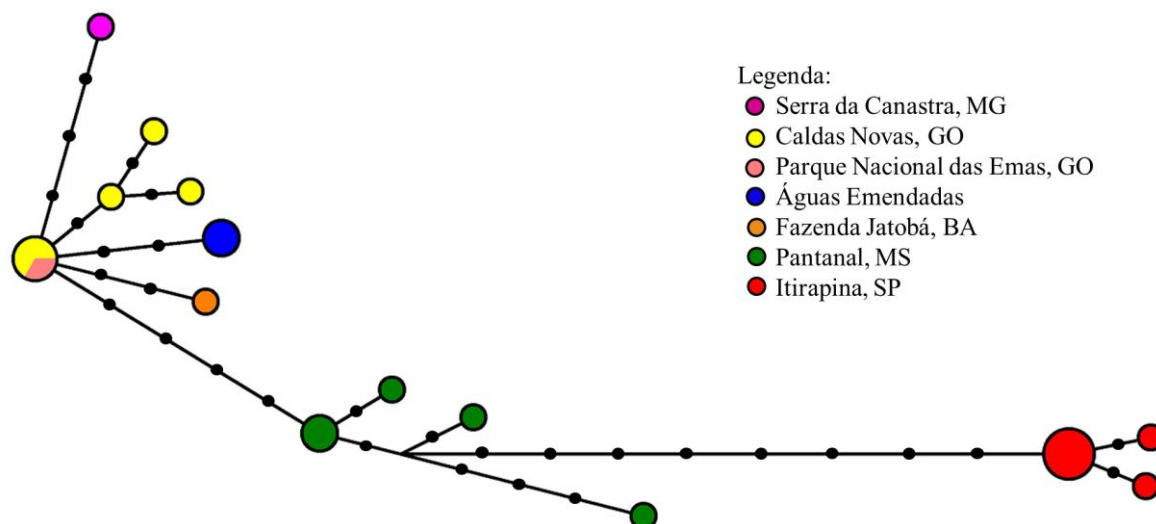
No programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al.*, 2011), foram realizadas análises de Máxima Parcimônia e de distâncias. Para a Máxima Parcimônia o suporte dos clados foram avaliados com 10.000 replicações de bootstrap. Para a análise de distância foi escolhido o método de Neighbor-Joining, utilizando o modelo K2P (Kimura 2-parâmetros) e taxas de variação uniformes entre os sítios. O suporte dos clados também foi avaliado com 10.000 replicações de bootstrap. A matriz de distância genética entre as amostras, obtida utilizando-se o modelo K2P, também foi utilizada para se avaliar as distâncias dentro e entre os clados obtidos.

Sequências de *Octodon degus* e *Ctenomys haigi* foram obtidas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e utilizadas como grupos externos para todas as análises filogenéticas.

### 1.3. Resultados

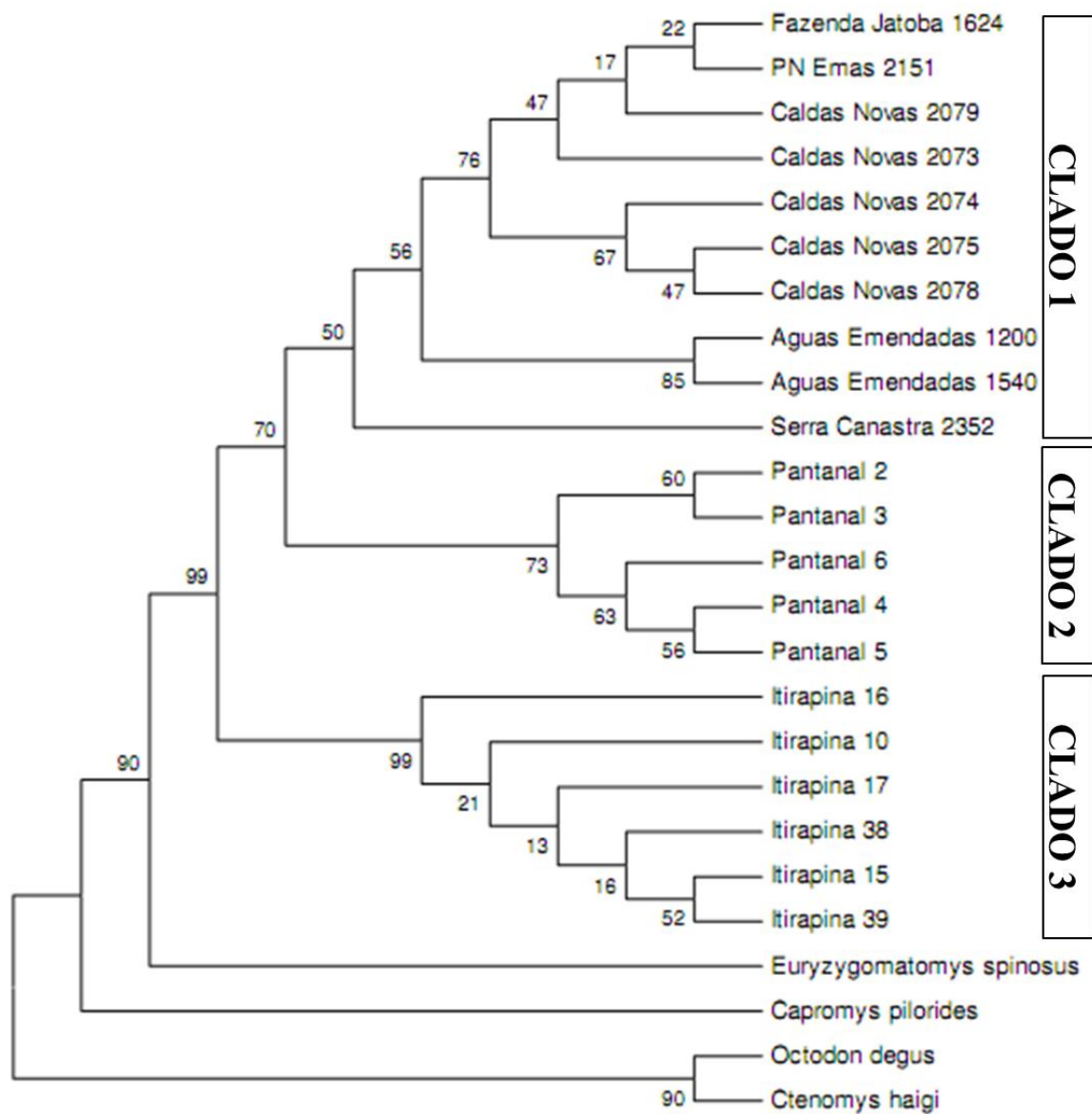
Após a edição final das 23 sequências (21 de *Clyomys* e 2 de grupos externos), 252 bases foram utilizadas nas análises filogenéticas. Entre as amostras identificamos um total de

25 sítios variáveis e 14 haplótipos, resultando em diversidade haplotípica de 0,9476 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,0263 ( $\pm 0,002$ ). A frequência dos haplótipos e a relação entre eles pode ser visualizada na rede de haplótipos construída através do programa Network (Figura 1.2).

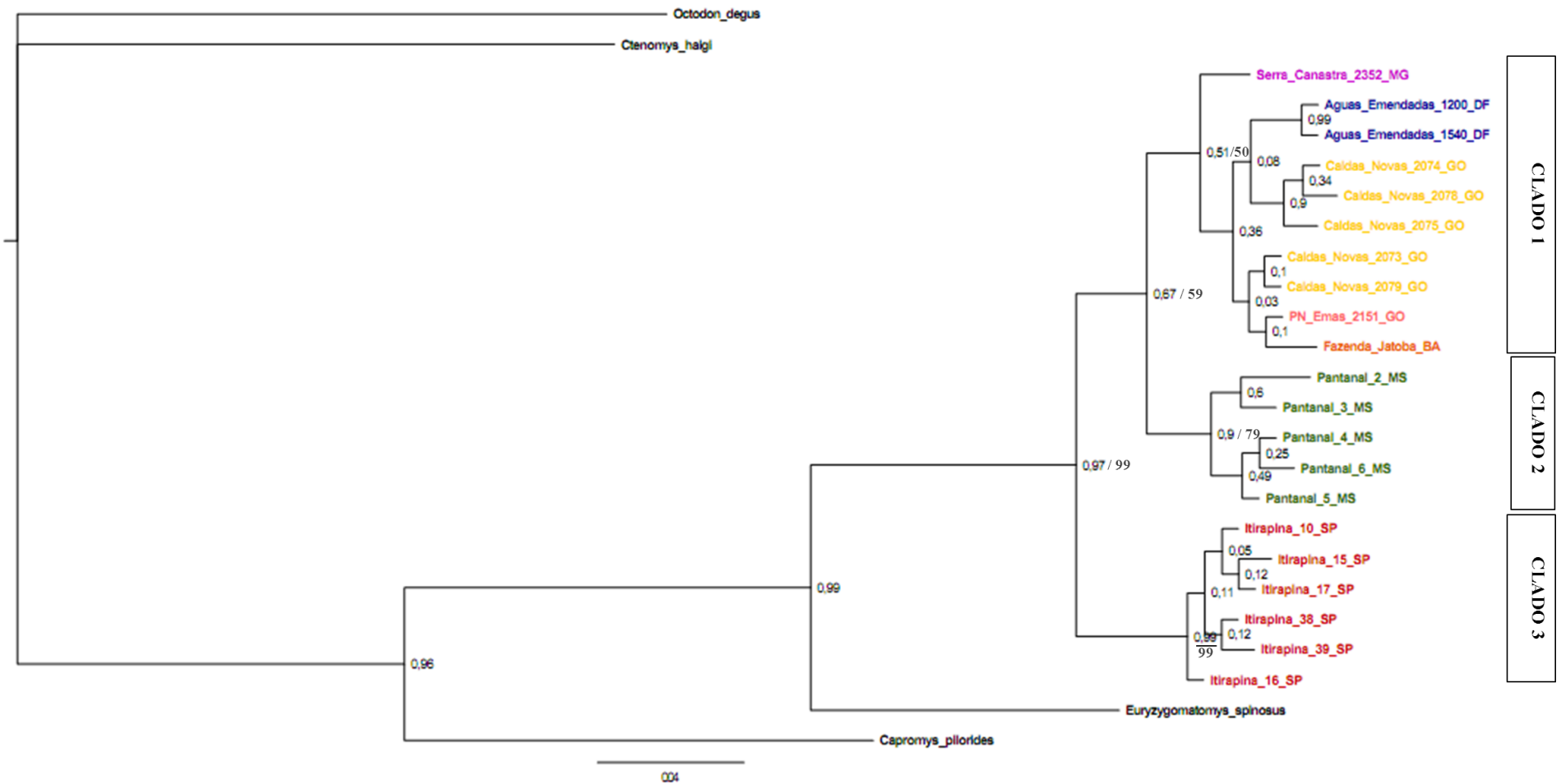


**Figura 1.2.** Rede de haplótipos construída no programa Network; os pontos pretos representam eventos mutacionais.

A topologia geral das árvores consenso obtidas com as análises de Inferência Bayesiana e Neighbor-Joining foram idênticas, enquanto que na árvore obtida pela análise de Máxima Parcimônia houveram algumas diferenças pontuais. Em todas elas verificamos a ocorrência de 3 clados principais. No Clado 1 estão agrupadas as amostras provenientes do Distrito Federal e dos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais. No Clado 2 estão presentes as amostras provenientes do Pantanal (Corumbá, Mato Grosso do Sul), e no Clado 3 as amostras do estado de São Paulo. As árvores consenso e seus suportes de ramos podem ser visualizados nas Figuras 1.3 e 1.4, sendo a primeira de Neighbor Joining e a segunda de Inferência Bayesiana.



**Figura 1.3.** Topologia da árvore consenso obtida através do método de Neighbor Joining após 10.000 replicações. Os valores apresentados nos nós representam os suportes de bootstrap.



**Figura 1.4.** Topologia da árvore consenso obtida através do método de Inferência Bayesiana após 4.000.000 de gerações, a partir de análises do citocromo b para amostras pertencentes ao gênero *Clyomys*. Nos nós podem ser visualizados os valores de probabilidade posterior bayesiana (0 a 0,99) e alguns valores de bootstrap para o método de Máxima Parcimônia.

As distâncias genéticas calculadas usando o modelo K2P (Kimura 2-parâmetros) variaram de 0 a 5% entre os indivíduos do gênero *Clyomys* analisados (Apêndice A). A distância genética média dentro de cada clado variou de 0,3 (clado 3) a 1,0% (clados 1 e 2), enquanto que a distância entre eles variou de 2,7 (clado 1 x clado 2) a 4,2 % (clado 1 x clado 3). Os valores médios das distâncias genéticas dentro e entre os clados são apresentados na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Distâncias genéticas médias (DGM) dentro e entres os clados 1, 2 e 3.

<i>Comparação</i>	<i>DGM (%)</i>
<b>Dentro dos clados</b>	
Clado 1	1,0
Clado 2	1,0
Clado 3	0,3
<b>Entre clados</b>	
Clados 1 x 2	2,7
Clados 1 x 3	4,2
Clados 2 x 3	4,1

#### 1.4. Discussão

Os resultados obtidos em nosso trabalho vão em sentido oposto aos descritos por Bezerra e Oliveira (2010), e reforçam o reconhecimento de *Clyomys bishopi* como uma unidade genética distinta dentro do gênero *Clyomys*.

Através da análise do citocromo b verificamos, por meio das diferentes análises realizadas, que as amostras provenientes do estado de São Paulo formam um grupo monofilético altamente coeso apresentando alto suporte estatístico nos valores de bootstrap (99) e probabilidade *a posteriori* (0,99). Reforçando a sua distinção em relação aos demais clados, verificamos um valor de diferenciação genética relativamente alto entre esse grupo e os demais. A distância genética entre o Clado 3 formado pelos animais de São Paulo e os demais encontra-se por volta de 4,1%, enquanto que a distância genética dentro de cada um dos clados varia de 0,3 a 1,0%.

Vários trabalhos utilizando o citocromo b para a definição das relações evolutivas dentro do grupo dos roedores têm sido relatados na literatura. Nestes, verifica-se uma variação bastante grande no valor da divergência genética existente entre espécies taxonomicamente



reconhecidas. Smith e Patton (1991), estudando roedores sul americanos do gênero *Akodon*, encontraram que diferenças genéticas abaixo de 1% correspondem à variação intra-específica, enquanto que valores de 3 a 21% são encontrados entre as diferentes espécies pertencentes à esse gênero. Para o gênero *Calomys*, Haag *et al.* (2007) encontraram distâncias genéticas entre espécies variando de 1,3 à 18,1% e, nas comparações entre espécies realizadas por esses autores, várias apresentam distâncias genéticas iguais ou menores às encontradas por nós (*C. boliviae* x *C. innom* = 1,3%; *C. boliviensis* x *C. callosus* = 2,6%; *C. boliviae* x *C. venustus* = 3,3%, *C. callosus* x *C. venustus* 4,1%, entre outros). Ordóñez-Garza *et al.* (2010), analisando três espécies pertencentes ao complexo de espécies *Peromyscus mexicanus* (*P. grandis*, *P. guatemalensis* e *P. zahynchus*) confirmaram que tais grupos são, verdadeiramente, três unidades genéticas distintas, com valores de distâncias genéticas médias entre elas variando entre 4,5 e 9,5%. Já Bradley e Baker (2001), ao avaliarem espécies pertencentes à quatro gêneros de roedores na América do Norte, concluem que distâncias genéticas menores de 2% indicam variação intraespecífica, enquanto que linhagens que apresentam distâncias entre 2 e 11% possuem alta probabilidade de serem espécies válidas, merecendo portanto estudos adicionais que avaliem o seu *status* taxonômico.

Analisando-se os nossos dados verificamos ainda a existência de outros dois clados. No Clado 2 encontram-se as amostras provenientes do Pantanal (Corumbá – MS), enquanto que no Clado 1 encontram-se as amostras originárias do Distrito Federal, Goiás (PN de Emas e Caldas Novas), Bahia e ainda uma amostra proveniente de Minas Gerais (Serra da Canastra). A relação entre os Clados 1 e 2 apresenta suporte estatístico relativamente baixo (0,67 probabilidade *a posteriori* / 59 bootstrap parcimônia / 70 bootstrap neighbor-joining), contudo e distância genética entre eles igual à 2,7%, sugerindo a existência de processos evolutivos distintos entre essas populações.

Os dados aqui apresentados não corroboram as análises realizadas por Bezerra e Oliveira (2010), e sugerem que a classificação proposta por Ávila-Pires e Wutke (1981) reflete de forma mais precisa a história evolutiva deste grupo. Apesar disso, ressaltamos que novos estudos abrangendo um número maior de amostras, com uma distribuição mais ampla, e envolvendo um número maior de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares pode trazer novas informações que ajudem a determinar o número real de espécies dentro desse grupo e a relação entre elas. Dessa forma, seria interessante incluir em análises futuras amostras provenientes do estado de Mato Grosso, já que Bishop (1974) descreve diferenças morfológicas em animais coletados na região da Serra do Roncador. Amostras provenientes da região do Chaco Paraguai também poderiam ser incluídas para se avaliar a validade de *C. l. whartoni*, descrita por Moojen em 1952, tornando ainda possível a investigação da sua

relação com grupos geograficamente próximos, como a população do Pantanal aqui analisada. Finalmente, a inclusão de amostras de outras localidades do estado de São Paulo, principalmente próximas à região de Itapetininga, localidade da espécie-tipo de *Clyomys bishopi*, reforçaria a distinção e validação desta espécie e forneceria uma visão mais ampla da diversidade total nela encontrada.

Dessa forma, apesar de ser recomendável a realização de estudos mais profundos, sugerimos que *Clyomys bishopi* continue sendo considerada uma espécie válida. Além disso, o agrupamento das amostras de *Clyomys laticeps* provenientes do Pantanal em um clado separado do restante das amostras oriundas de Goiás, Distrito Federal, Bahia e Minas Gerais indicam a existência de processos evolutivos diferenciados entre esses grupos. Assim, é prudente considerar que esses animais pertençam à Unidades de Manejo ou Unidades Evolutivas Significativas distintas, de forma que medidas adequadas de manejo e conservação possam ser realizadas.

## **Capítulo 2**

### **Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microsatélites para *Clyomys bishopi* (Rodentia: Echimyidae)**

## Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para *Clyomys bishopi* (Rodentia: Echimyidae)

### *Abstract*

Ten microsatellite loci were isolated and characterized within the spiny-rat (*Clyomys bishopi*), a medium-size Neotropical rodent that inhabits some of the last remaining savannas from São Paulo state, Brazil. Between 5 and 17 alleles were detected per locus, with expected heterozygosity ranging from 0.605 to 0.921. All but one locus were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium, and no linkage disequilibrium was detected among pairs of loci. These microsatellites should provide useful markers in a variety of genetic studies including parentage analyses and in determining the genetic and social structure in its populations.

### Resumo

Dez locos microssatélites foram isolados e caracterizados para o rato-de-espinho (*Clyomys bishopi*), um roedor Neotropical de porte médio que habita alguns dos últimos remanescentes de Cerrado do estado de São Paulo, Brasil. Foram detectados entre 5 e 17 alelos por loco, sendo que a heterozigosidade esperada variou de 0,605 a 0,921. Com exceção de um loco, todos os demais encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não sendo detectado a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados. Estes locos microssatélites fornecerão marcadores úteis para a realização de vários estudos genéticos incluindo a análise do parentesco e a determinação da estrutura genética e social de suas populações.

## 2.1. Introdução

O rato-de-espinho (*Clyomys bishopi*) é um roedor pertencente à família Echimyidae, cuja distribuição parece estar restrita a apenas alguns dos remanescentes de Cerrado do estado de São Paulo. Descrita inicialmente em 1981 por Ávila-Pires e Wutke, ainda hoje pouco se conhece sobre suas características biológicas e hábitos de vida. Na literatura existente encontramos a informação de que se trata de um roedor herbívoro (com alimentação especializada em monocotiledôneas), que apresenta hábitos coloniais, sociais e semi-fossoriais (VIEIRA, 1997; BURDA *et al.* 2000; BUENO *et al.*, 2004; BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2006). Aparentemente é um importante agente dispersor de espécies vegetais, principalmente da palmácea *Attalea geraensis*, da qual se alimenta (ALMEIDA; GALETTI, 2007) sendo ele mesmo, por outro lado, um importante recurso alimentar para diversas espécies de mamíferos, aves e répteis carnívoros (BUENO *et al.*, 2002; BUENO 2003; BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2006; MOTTA-JUNIOR *et al.*, 2004).

Até a execução do presente trabalho, nenhum estudo genético havia sido realizado com esta espécie. Dessa forma, o desenvolvimento e a utilização de marcadores moleculares para o seu estudo tornam-se bastante relevantes, já que isso permitirá uma abordagem mais precisa de questões ainda pouco conhecidas relacionadas principalmente aos seus hábitos coloniais e sociais. Marcadores moleculares microssatélites vêm sendo utilizados com sucesso na determinação do comportamento social de diversas espécies de roedores ao possibilitar que a análise do sistema social seja realizada com base na estrutura genética de suas populações (FAULKES *et al.*, 1997; CUTRERA *et al.* 2005, FRESDESTED *et al.* 2005).

Para abordar estas e outras questões relativas à história de vida desses animais, marcadores moleculares do tipo microssatélites foram desenvolvidos a partir da construção de uma biblioteca genômica parcial enriquecida para essas sequências repetitivas. Aqui nós descrevemos o desenvolvimento e a caracterização de dez locos de microssatélites que foram utilizados no estudo da estrutura genética populacional e social de uma população de *Clyomys bishopi* (ver capítulo 3).

## 2.2. Material e Métodos

### *Isolamento dos locos microssatélites*

O isolamento dos locos de microssatélites foi feito através do desenvolvimento de uma biblioteca parcial enriquecida baseada no protocolo desenvolvido por Hamilton *et al.* (1999). Para a construção desta biblioteca utilizamos DNA isolado a partir de tecido epitelial preservado em etanol absoluto de um exemplar de *Clyomys bishopi*, seguindo-se um protocolo de extração de DNA baseado na metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Um volume de 20µl de DNA a 200ng/µl foi digerido pelas enzimas de restrição RsaI e BstUI e posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a visualização do padrão de digestão, o DNA digerido com tamanho entre 200 e 1000 pb foi eluído do gel de agarose e purificado, sendo em seguida ligado a adaptadores (*linkers*) de sequência conhecida (SuperSNX24 e SuperSNX24+4p).

Após a realização de uma PCR utilizando-se *primers* complementares aos *linkers* utilizados, realizamos o processo de enriquecimento da biblioteca de microssatélites através da hibridação dos fragmentos amplificados a um conjunto de oito sondas biotinizadas tetranucleotídicas ([AAAC]<sub>6</sub>, [AAAG]<sub>6</sub>, [AATC]<sub>6</sub>, [AATG]<sub>6</sub>, [ACCT]<sub>6</sub>, [ACAG]<sub>6</sub>, [ACTC]<sub>6</sub>, [AATC]<sub>6</sub>). Utilizando uma estante magnética, os fragmentos hibridados às sondas foram recuperados através de lavagens em solução contendo partículas magnéticas ligadas à estreptavidina, a qual se liga à biotina. Esta fração do DNA enriquecida com regiões microssatélites foi então submetida a uma nova PCR, e os fragmentos amplificados foram clonados utilizando-se o kit comercial pGEM-T Easy Vector System (Promega) e células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α, as quais foram plaqueadas e crescidas em meio LB-Ágar contendo X-Gal, IPTG e ampicilina. Os clones positivos foram selecionados e replaqueados em meio CG líquido com ampicilina e, após seu crescimento, os plasmídeos recombinados foram extraídos e enviados para sequenciamento dos insertos clonados.

### *Sequenciamento dos clones e desenvolvimento dos primers*

Foram sequenciados 96 clones positivos em sequenciador automático ABI3730XL pela empresa Macrogen (Coréia do Sul). Para analisar a qualidade do sequenciamento, os eletroferogramas foram visualizados utilizando-se o software BioEdit (HALL, 1999), enquanto que para encontrar as regiões de microssatélites nas sequências analisadas foi usado o programa CID (FREITAS *et al.* 2008). A identificação e remoção das sequências referentes aos adaptadores ou ao vetor de clonagem foi feita através da plataforma *on-line* VecScreen,

disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>, enquanto que o desenho dos *primers* para os locos selecionados foi realizado no programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc), disponível em <http://www.generunner.net/>.

A síntese dos pares de *primers* foi realizada com a adição de uma cauda M13 de 18pb (5'- TGTAACGACGGCCAGT – 3') na porção 5' de um dos *primers*, possibilitando a realização do protocolo econômico proposto por Schuelke (2000) (Anexo A). Tal protocolo utiliza, em conjunto com o par de *primer* específico para o loco microssatélite, um *primer* M13 modificado com fluorescência que é incorporado ao fragmento amplificado durante a PCR. Desta forma torna-se desnecessário a síntese de *primers* modificados individualmente pela incorporação do fluoróforo, o que reduz sobremaneira os custos relacionados à genotipagem em sequenciador automático.

#### *Avaliação do polimorfismo*

Para a avaliação do polimorfismo existente nos locos isolados, reações de amplificação (PCR) foram feitas utilizando-se inicialmente 10 indivíduos de *C. bishopi*, sendo os produtos obtidos aplicados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz UV. Após essa avaliação inicial, os locos polimórficos foram utilizados no total de amostras disponíveis (n = 40), fornecendo assim os dados necessários para a sua caracterização. As PCRs foram realizadas em um volume final de 12µl, contendo 30ng de DNA, solução tampão 1X, 0,2mM de dNTPs, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,2µM do *primer* com a cauda M13, 0,5µM do *primer* sem cauda M13 e 0,5 µM do *primer* M13 com fluorescência FAM, HEX ou TET. Testes foram feitos aplicando-se um gradiente de temperatura para estabelecer a temperatura ótima de anelamento específica para cada par de *primer*. Os ciclos das PCRs foram iniciados com uma etapa de desnaturação à 94°C por 10 min., seguida de 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação à 94°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento (em temperatura variável de acordo com o par de *primers* utilizado) por 45 segundos e uma etapa de extensão à 72°C por um minuto. Em seguida foram realizados 10 ciclos adicionais utilizando-se a temperatura ótima de anelamento do *primer* M13, constituídos por 94°C por 30 segundo, 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, sendo finalizado com uma etapa de extensão à 72°C por 10 minutos. Para avaliação inicial do sucesso de amplificação, os produtos obtidos foram aplicados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz UV. Posteriormente os locos amplificados foram enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBace na empresa DNA Consult (São Carlos, SP) e analisados no programa MegaBace<sup>TM</sup> Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science).

### *Caracterização dos marcadores microssatélites desenvolvidos*

Os genótipos obtidos para os locos polimórficos foram usados para caracterização da diversidade genética encontrada nos marcadores microssatélites desenvolvidos. A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foi testada utilizando-se o teste exato para a ocorrência de desequilíbrio genotípico (teste G) implementado no programa Genepop 4.1 (ROUSSET 2008). Este programa foi ainda utilizado para a obtenção dos índices de diversidade genética como o número de alelos por loco ( $N_A$ ), a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e a diversidade gênica ( $H_E$ ) (NEI, 1987). Calculamos ainda o Conteúdo de Informação Polimórfica ( $PIC$ ) (BOTSTEIN *et al.* 1980) para cada um dos locos utilizando-se o programa Cervus 3.0.3 (MARSHALL 1998; KALINOWSKI *et al.* 2007).

A ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos locos analisados foi avaliada utilizando-se o software Genepop, empregando-se como teste estatístico o teste exato para deficiência de heterozigotos. A significância estatística dos resultados obtidos foi avaliada após a realização da correção de Bonferroni (RICE, 1989).

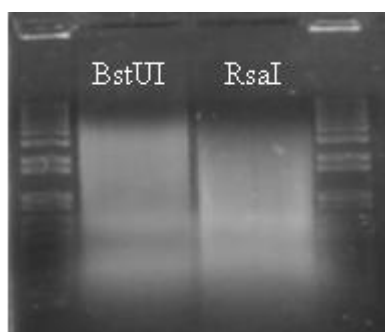
O programa MicroChecker (OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para se avaliar a existência de erros de genotipagem devido à ocorrência de alelos nulos, amplificação preferencial alelo-específica (*allele dropout*) e/ou aparecimento de picos “fantasmas” nos eletroferogramas (*stutter peaks*). A frequência de alelos nulos ( $fA_N$ ) foi calculada para cada loco realizando-se a estimativa de máxima-verossimilhança proposta por Dempster *et al.* (1977), conforme implementado pelo programa Freena (CHAPUIS; STOUP, 2007).

### 2.3. Resultados

#### *Isolamento dos locos microssatélites*

As duas enzimas utilizadas para a digestão do DNA apresentaram resultados semelhantes (Figura 2.1). Desta forma, o protocolo realizado para a construção da biblioteca parcial enriquecida com regiões microssatélites foi conduzido utilizando-se os fragmentos gerados pela enzima *RsaI*.





**Figura 2.1.** Digestão do DNA com as enzimas BstUI e RsaI visualizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Dos 96 clones positivos sequenciados, 54 (56,25%) apresentaram insertos contendo regiões de microssatélites, dos quais 32 (33,33%) possuíam regiões flangeadoras adequadas para a construção de *primers*. Dentre essas seqüências, 18 foram selecionadas e utilizadas para o desenvolvimento de *primers* loco-específicos, de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

#### *Avaliação do polimorfismo*

Reações de amplificação (PCR) foram realizadas para a avaliação do polimorfismo nos marcadores microssatélites selecionados, sendo que a temperatura de anelamento para cada um deles variou de 54 a 64°C (Tabela 3.1). Dos 18 pares de *primers* desenhados e testados, obtivemos sucesso na amplificação do fragmento esperado em 14 deles, enquanto que para os 4 locos restantes não obteve-se padrão de amplificação satisfatório. A análise inicial com 10 indivíduos em gel de agarose 3% indicou que, destes 14 locos, 12 eram polimórficos (85,7%) e dois monomórficos (14,3%). Ao serem genotipados utilizando-se o sequenciador automático, 02 dos locos polimórficos não apresentaram padrão de genotipagem satisfatório, sendo portanto excluídos das análises seguintes. Desta forma, dos 18 locos avaliados, 10 apresentaram padrão de amplificação adequado para a realização das análises desejadas.

#### *Caracterização dos marcadores microssatélites desenvolvidos*

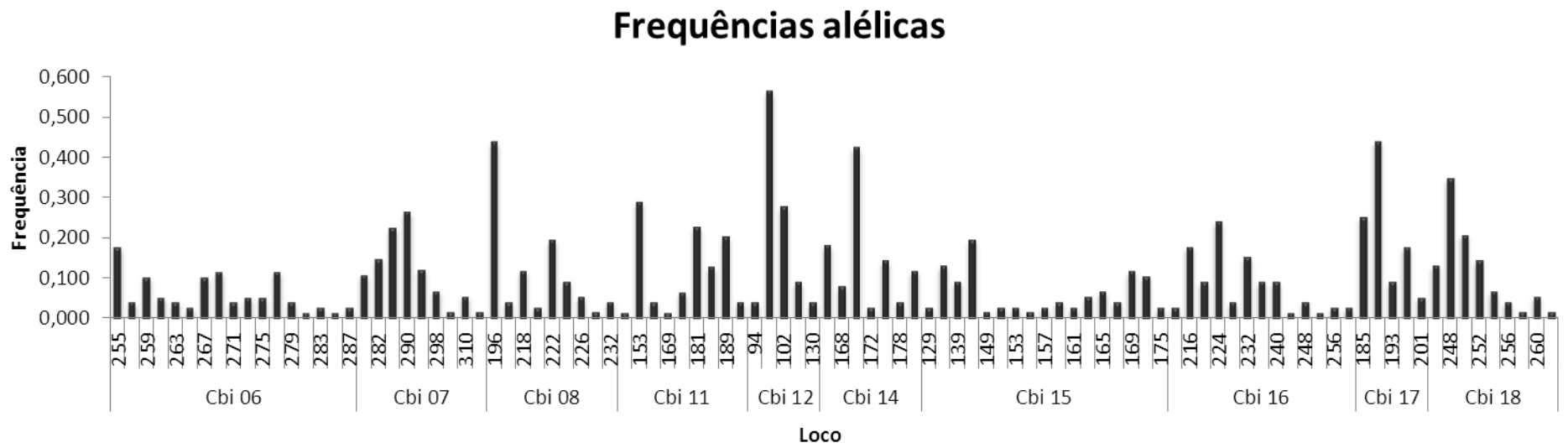
As características dos marcadores microssatélites desenvolvidos a partir dos 10 locos selecionados são apresentadas na Tabela 2.1. Nestes encontramos regiões repetitivas contendo di- ou tetranucleotídeos que, de acordo com a categorização descrita em Oliveira *et al.* (2006), podem ser classificados em perfeitos (não interrompidos por nenhuma base) ou compostos (com duas seqüências repetitivas adjacentes). O número de alelos por loco variou de 5 a 17, com uma média de 10 alelos por loco. A freqüência dos alelos em cada um dos locos

analisados é apresentada na Figura 2.2. A heterozigosidade observada variou de 0,615 a 0,875, enquanto que a heterozigosidade esperada variou de 0,604 a 0,921. Todos os locos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do loco Cbi 15, para o qual foi detectado uma deficiência de heterozigotos ( $p = 0,0007$ ). Através da análise realizada com o software Microchecker verificamos, para esse loco, a indicação de possível ocorrência de alelos nulos. A frequência de alelos nulos calculada utilizando-se uma estimativa baseada em máxima-verosimilhança foi igual à 0,083. Não foi observado evidência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados (Apêndice B).

**Tabela 2.1.** Descrição dos 10 locos de microssatélites isolados para o rato-de-espinho (*Clyomys bishopi*).

Loco	Sequência do primer (5' – 3')	Repetição	Faixa de Tamanho (pb)	Ta (°C)	N <sub>A</sub>	PIC	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	P <sub>EHW</sub>
Cbi 06	F: TGCTGTCTGCCTCCTAAG R: GGAGCAGGAAATAGGACG	(TC) <sub>21</sub>	255-287	60	17	0,902	0,875	0,921	0,0971
Cbi 07	F: GGTGCTTATGCTGCTGAG R: AGGGACCGCAGTTTGAT	(CTTT) <sub>17</sub>	278-314	64	9	0,805	0,789	0,839	0,0864
Cbi 08	F: GCCTGTGTTATTGGTCTG R: CAGCAGGGTGACAAGAG	(TG) <sub>16</sub>	196-232	54	9	0,718	0,846	0,754	0,8754
Cbi 11	F: GTAGTTTGTCTCCCTGGC R: CAGAAGTGGGCTCAAGG	(TGTC) <sub>10</sub>	149-189	60	9	0,777	0,675	0,816	0,0155
Cbi 12	F: CAGGGATTTTCTTTGATGC R: GCAAGTGCAAGGTCATGAG	(GATT) <sub>6</sub>	94-130	58	5	0,541	0,675	0,604	0,8857
Cbi 14	F: CTCCTACTGTCCCTCCTGC R: GAAGTCCTGAGAAGTGAC	(GC) <sub>11</sub> (AC) <sub>15</sub>	166-184	54	7	0,717	0,615	0,759	0,0222
Cbi 15	F: GTAACCACAAGGTTGACG R: CAACAGACAGACGGACAG	(TC) <sub>17</sub>	129-175	58	17	0,893	0,744	0,915	<b>0,0007</b>
Cbi 16	F: TGCATAGTGAGTTCAAGTCC R: GCTTCCTCTTCTCTCCAA	(AAGC) <sub>18</sub>	212-284	56	13	0,848	0,850	0,874	0,0106
Cbi 17	F: CTTTCAGCTTCCACACAC R: CACCATTGAGTTATCTTCC	(AGAC) <sub>5</sub> (AGGC) <sub>7</sub>	185-201	58	5	0,660	0,750	0,714	0,6333
Cbi 18	F: GGCAAACCTTAGGCAAATG R: CACTTCTTTTCCATTCCAG	(CA) <sub>16</sub>	246-262	56	9	0,767	0,769	0,804	0,4013

pb: pares de base, Ta: temperatura de anelamento, N<sub>A</sub>: número de alelos, PIC: conteúdo de informação polimórfica, H<sub>O</sub>: heterozigidade observada, H<sub>E</sub>: heterozigidade esperada (diversidade gênica, Nei 1987), P<sub>EHW</sub>: valor de p para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em negrito, valores significativos após a correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0,005$ ).



**Figura 2.2.** Histograma mostrando a distribuição das frequências alélicas em cada um dos locos analisados.

## 2.4. Discussão

O aperfeiçoamento das técnicas moleculares nos últimos anos tem resultado em um grande número de publicações envolvendo a prospecção de marcadores microssatélites, principalmente para utilização em análises de genética da conservação, já que estes marcadores apresentam notáveis vantagens para os estudos realizados nesta área. Para roedores também podemos verificar um crescente número de trabalhos envolvendo o seu desenvolvimento, os quais vêm sendo utilizados para diferentes finalidades como o estudo de estruturação espacial em populações naturais (LACEY *et al.*, 1999; LOUISEAU *et al.*, 2007; PELZ-SERRANO *et al.*, 2009), avaliação da estrutura e organização social (LACEY, 2001), análises de sistema de acasalamento e parentesco genético (HERRERA *et al.*, 2004) e estudos comparativos da diversidade entre populações naturais e reintroduzidas (BARCLAY *et al.*, 2006), entre outros.

O processo de isolamento de locos microssatélites específicos para *C. bishopi* foi realizado com sucesso e produziu um elevado número de clones contendo regiões repetitivas (54), dos quais aproximadamente 59% foram adequados para construção de pares de *primers*. Tal resultado é superior ao registrado na literatura para outros roedores, como para o *Castor canadensis*, onde os autores encontraram 44% das sequências que continham microssatélites adequadas para o desenho de *primers* (PELZ-SERRANO *et al.*, 2009). Tais autores construíram 40 pares de *primers* e atingiram um sucesso de 20% (oito pares de *primers*) na obtenção de marcadores polimórficos adequados para análises populacionais. No presente trabalho, dos 18 pares de *primers* construídos, 10 (55%) se mostraram adequados quanto ao polimorfismo e à qualidade dos produtos amplificados, o que resultou na obtenção de marcadores genéticos bastante úteis para a realização de análises populacionais.

As características básicas encontradas para os 10 locos microssatélites isolados para *C. bishopi* ( $N_A = 5$  a 17;  $H_E = 0,604$  a 0,921 e  $H_O = 0,615$  a 0,875) apresentaram valores maiores do que os relatados na literatura para outros roedores. Herrera *et al.* (2004), caracterizando 9 locos microssatélites em *Hydrochoerus hydrochaeris* (capivaras), encontraram números menores de alelos (2 a 7), heterozigosidade esperada (0,063 a 0,837) e heterozigosidade observada (0,063 a 0,800) do que os valores encontrados no presente trabalho. Comparações similares podem ser feitas com o trabalho de Pelz-Serrano *et al.* (2009), onde a caracterização de oito marcadores microssatélites isolados para *Castor canadensis* em uma população de 57 indivíduos também apresentou valores inferiores ( $N_A = 2$  a 4;  $H_E = 0,24$  a 0,65 e  $H_O = 0,27$  a 0,65) aos resultados obtidos por nós para *C. bishopi*.

Apesar de não ter sido testado em nosso trabalho, os locos isolados por nós potencialmente poderão ser utilizados em outras espécies geneticamente próximas à *Clyomys bishopi*. A amplificação cruzada entre espécies reduz o custo relacionado ao desenvolvimento de marcadores microssatélites para as espécies que não apresentam marcadores específicos disponíveis ou que possuem baixa frequência de microssatélites em seu genoma, dificultando o seu isolamento. Os marcadores microssatélites aqui descritos serão úteis para o estudo de diversos aspectos relacionados à história de vida de *C. bishopi*, incluindo a análise da estrutura genética populacional e social apresentada por essa espécie em suas populações (ver capítulo 3).

## **Capítulo 3**

**Avaliação da estrutura genético-populacional e genético-social de *Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos cerrados do estado de São Paulo**

## Avaliação da estrutura genético-populacional e genético social de *Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos cerrados do estado de São Paulo

### Abstract

Though little information is found in the literature about *C. bishopi*, some authors indicate the existence of colonial and social behavior among individuals of this species. To assess its spatial genetic structure and social structure, we used a set of ten polymorphic microsatellite loci and a mitochondrial marker to analyze 40 individuals collected in EE Itirapina, SP. The results shows high levels of genetic variation, with average values of 10 alleles per locus, and observed and expected heterozygosity of 0.76 and 0.80, respectively. There was detected no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and neither excess of homozygotes. For the mitochondrial marker we found three haplotypes, with haplotype diversity of 0.16 and nucleotide diversity of 0.017. The Bayesian clustering analysis indicated no genetic structure, suggesting the occurrence of gene flow between the studied areas. Analyses of relatedness indicated generally low levels of relatedness between individuals (0.05), with slightly larger values when individuals within a small geographic scale are considered. The average relatedness by sex indicated no significant differences, suggesting a similar dispersion between males and females. Results suggest that colonies of *C. bishopi* are composed largely by unrelated individuals, and present genetic structure compatible to that showed by species with solitary habits.

### Resumo

Apesar de poucas informações serem encontradas na literatura sobre *C. bishopi*, alguns autores indicam a existência de comportamento social e colonial entre os indivíduos desta espécie. Para avaliar a sua estrutura genética espacial e estruturação social, utilizamos um conjunto de dez locos microsatélites polimórficos e um marcador mitocondrial para analisar 40 indivíduos coletados na EE de Itirapina, SP. Os resultados indicam altos índices de variação genética, com valores médios iguais à 10 alelos por loco, heterozigosidade observada de 0,76 e esperada de 0,80. Não foram detectados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem excesso de homozigotos. Já para o marcador mitocondrial, foram encontrados 3 haplótipos, com diversidade haplotípica igual à 0,16 e diversidade nucleotídica de 0,017. A análise de agrupamento bayesiano não indicou estruturação genética espacial, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre as áreas estudadas e a existência um contínuo genético entre elas. As análises de parentesco indicaram, em geral, baixos coeficientes de parentesco entre os indivíduos analisados (0,05), levemente maiores quando se considera indivíduos amostrados em uma pequena escala geográfica. O parentesco médio por sexo não indicou diferenças significativas, o que sugere a existência dispersão similar entre machos e fêmeas. Os resultados sugerem que as colônias de *C. bishopi* são formadas por indivíduos em sua maioria não aparentados, apresentando estrutura genética compatível com a de espécies que apresentam hábitos solitários.



### 3.1. Introdução

A genética da conservação é uma das principais ferramentas para se obter informações necessárias para a conservação das espécies. Informações como sexo, tamanho populacional, história demográfica, sistemas de acasalamento, estrutura populacional, fluxo gênico, parentesco, sítios para reintrodução e translocação são essenciais para a elaboração de projetos de conservação. Muitas dessas informações são difíceis de serem obtidas de forma direta, principalmente no caso de espécies que apresentam hábitos elusivos, como as espécies noturnas ou fossoriais. Sendo assim, as ferramentas da genética molecular e os métodos de análises têm se mostrado de grande importância nestes casos (FRANKHAM, 2010).

Vários marcadores moleculares nucleares e mitocondriais estão disponíveis para a obtenção das informações listadas acima. Podemos encontrar, entre outros, estudos de estruturação genética em diferentes escalas espaciais (FAULKES *et al.*, 1997), análises de estrutura de parentesco e sistema de acasalamento (PATZENHAUEROVÁ *et al.*, 2010) e estudos de ocorrência de dispersão diferencial entre sexos (MEYER *et al.*, 2009).

No que tange ao estudo da estrutura social, os marcadores genéticos têm se mostrado uma ferramenta extremamente útil, já tendo sido utilizados em várias espécies de mamíferos terrestres (elefantes: FERNANDO; LANDE, 2000; primatas: DI FIORE; FLEISCHER, 2005; roedores: FAULKES *et al.*, 1997; ISHIBASHI *et al.*, 1998; LACEY; WIECZOREK, 2004; GRANJON; COSSON, 2008), mamíferos aquáticos (golfinhos: GASPARI *et al.*, 2007) e mamíferos voadores (morcegos: BURLAND *et al.*, 2001). Estes estudos vêm confirmando que, para a maioria das espécies sociais, os indivíduos pertencentes a um grupo são proximamente relacionados e constituem grupos familiares.

A estruturação social dentro de uma população estabelece o “cenário” onde a busca por alimentos, a defesa, a disseminação de doenças, a transferência de informações, o acasalamento e a reprodução se realizam (AXELROD; HAMILTON, 1981). Essa estruturação pode ter um efeito significativo sobre as características genéticas de uma população, seja em nível local ou global (SUGG *et al.*, 1996). A estruturação genética decorrente da formação desses grupos sociais ocorre em função da associação coincidente ou ativa de indivíduos aparentados. A associação entre parentes é observada com frequência em espécies sociais e, em geral, envolve uma limitação na dispersão (HAMILTON, 1964). Muitas espécies apresentam dispersão diferencial entre os sexos sendo que, no caso dos mamíferos, em geral as fêmeas são filopátricas (GREENWOOD, 1980). Este é o motivo pelo qual as fêmeas adultas de mamíferos geralmente apresentam uma estrutura de parentesco mais

forte do que os machos adultos (ZEYL *et al.*, 2009). Desta forma, espécies que apresentam hábitos sociais acrescentam um nível adicional de estruturação nas populações através da associação de indivíduos em grupos que permanecem juntos por curto ou longo prazo (GASPARI *et al.* 2007). O parentesco entre indivíduos é considerado o principal fator evolutivo favorecendo a formação de grupos sociais já que, além de aumentar o *fitness* individual (através da detecção mais fácil de predadores, por exemplo), a cooperação entre os membros de um grupo aumenta o seu *fitness* inclusivo (HAMILTON, 1964).

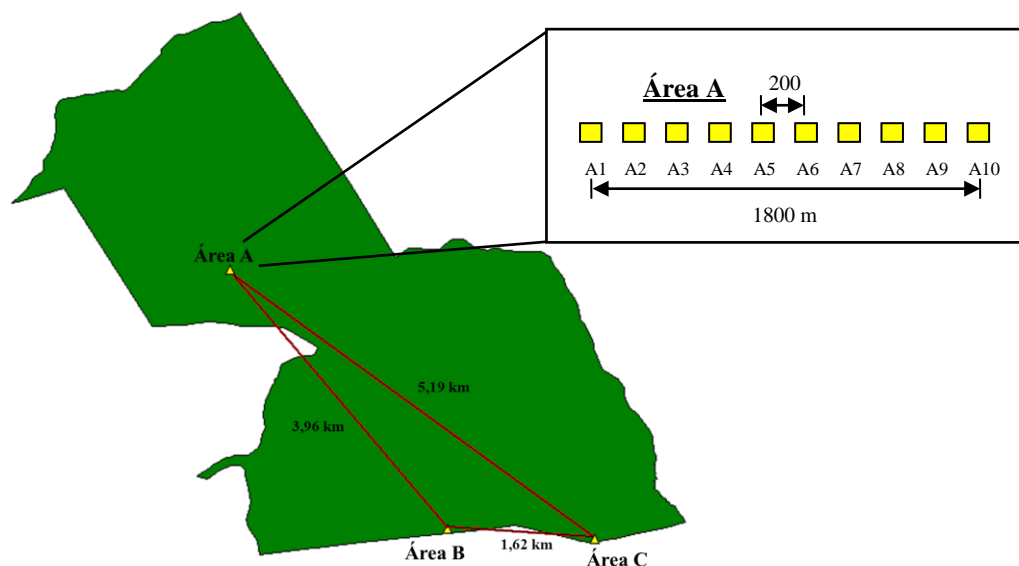
Apesar das poucas informações disponíveis na literatura sobre os hábitos de *Clyomys bishopi*, alguns autores a descrevem como uma espécie que apresenta hábitos sociais e coloniais (BUENO *et al.*, 2004; BURDA *et al.*, 2000). Diante da dificuldade de se avaliar de forma direta o seu comportamento, os marcadores moleculares tornam-se uma ferramenta importante no estudo destas características. Marcadores moleculares microssatélites e mitocondriais vêm sendo utilizados com sucesso na determinação do comportamento social de diversas espécies de roedores ao possibilitar que a análise do sistema social seja realizada com base na estrutura genética de suas populações (FAULKES *et al.* 1997; CUTRERA *et al.* 2005; FREDSTED *et al.* 2005). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos avaliar, através da análise de marcadores nucleares e mitocondriais, a diversidade e estrutura genética populacional e social de *Clyomys bishopi*, bem como a possível ocorrência de dispersão diferencial entre sexos, em indivíduos amostrados em um dos principais remanescente de cerrado do estado de São Paulo.

### 3.2. Material e Métodos

#### *Obtenção das amostras e extração do DNA*

Amostras de 40 indivíduos de *C. bishopi* foram obtidas de animais capturados em três áreas (A, B e C) localizadas no interior da Estação Ecológica de Itirapina (EEI). Na área A foram delimitados 10 sítios medindo 0,25 hectares cada (sítios A<sub>1</sub> a A<sub>10</sub> – Figura 3.1), na qual foram montadas 4 armadilhas de interceptação e queda (*pitfall*) e 6 armadilhas do tipo Tomahawk (gaiolas de arame medindo 35 x 20 x 20 cm). Nesta área foram coletadas amostras de 32 indivíduos entre agosto de 2007 e janeiro de 2008, sendo que o número de indivíduos capturados em cada uma das áreas variou de 1 a 6. Nas áreas B e C foram utilizadas 50 armadilhas do tipo Tomahawk distribuídas de acordo com a localização das tocas dos animais. Nestas áreas foram coletados, entre junho e agosto de 2010, seis e dois indivíduos, respectivamente. As amostras, constituídas por um pequeno fragmento de tecido retirado da

orelha dos animais, foram armazenadas em tubos de polipropileno contendo etanol absoluto e estocadas à -20°C até o seu processamento em laboratório.



**Figura 3.1.** Distribuição das áreas de coleta dentro da Estação Ecológica de Itirapina. Área A (A<sub>1</sub>-A<sub>10</sub>) = 32 amostras; Área B = 6 amostras e C = 2 amostras.

A extração de DNA das amostras foi realizada através do método de fenol:clorofórmio de acordo com protocolo baseado em Sambrook e Russel (2001). Após a extração as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e diluídas em água numa solução de uso contendo aproximadamente 20 ng/μl de DNA.

### *Sexagem molecular (SRY)*

O sexo dos indivíduos coletados foi determinado através da amplificação de um segmento de aproximadamente 200 pb do gene SRY, utilizando-se os *primers* descritos por Pomp e colaboradores (1995). O SRY é um gene sexo-específico localizado no cromossomo Y, e é responsável pela determinação sexual dos machos. A amplificação deste gene foi realizada através de reações multiplex, nas quais o gene SRY foi co-amplificado com o primeiro domínio da região D-loop do DNA mitocondrial (*primers* mt-U1 e mt-U2 – NAKAMURA *et al.*, 2009), utilizado como controle positivo para a PCR (650 pb em machos e fêmeas).

Foram feitas reações de amplificação (PCR) com volume final de 10μl, contendo 80ng de DNA, solução tampão 1X, 0,4mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,4μM de cada um dos *primers* para a região do gene SRY, 0,2 μM

de cada *primer* para a região D-loop e 0,08mg/ml de BSA. O ciclo das PCRs foi iniciado com uma etapa de desnaturação a 94°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1min, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, sendo finalizado com uma extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualizado em transluminador de luz UV.

Os indivíduos que apresentaram duas bandas (D-Loop e SRY) no gel foram determinados como machos e aqueles com apenas uma banda (D-Loop) como fêmeas.

#### *Avaliação da diversidade genética nuclear*

Dez locos de microssatélites desenvolvidos para *Clyomys bishopi* foram utilizados para avaliar a diversidade genética da população de Itirapina. As informações básicas referentes à cada um desses locos e aos *primers* desenvolvidos para sua amplificação, assim como as condições utilizadas para a realização das PCRs e os procedimentos utilizados para a genotipagem, são descritas no Capítulo 3.

A diversidade genética encontrada na população estudada foi avaliada utilizando-se os softwares Genepop 4.1 (ROUSSET, 2008) e Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2001), através dos quais foram obtidos diversos índices como o número de alelos por loco ( $N_A$ ), a heterozigosidade observada ( $H_O$ ), a diversidade gênica ( $H_E$ ) (NEI, 1987), e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) (WEIR; COCKERHAM, 1984), também utilizado aqui para avaliar a ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg através de um teste exato para a detecção de deficiência de heterozigotos. Estimamos ainda a frequência de alelos nulos ( $fA_N$ ) para cada um dos locos analisados, utilizando para tanto o programa Freena (CHAPUIS; STOUP, 2007). Quando necessário, a significância estatística dos resultados obtidos foi avaliada após a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

#### *Avaliação da diversidade genética mitocondrial*

A diversidade genética mitocondrial foi avaliada através da análise da região hipervariável do DNA mitocondrial (D-loop), sítio onde se inicia o processo de replicação desta molécula. Para amplificação dessa região, foram feitas PCRs utilizando os *primers* mt-U<sub>1</sub> e mt-U<sub>2</sub> descritos por Nakamura e colaboradores (2009). Tratam-se de *primers* universais que flanqueiam o primeiro domínio da região hipervariável do DNA mitocondrial (região HV-1 do D-loop) em mamíferos, amplificando um segmento de DNA de aproximadamente 650pb.

Foram feitas reações de amplificação (PCR) com volume final de 25µl, contendo 30ng de DNA, solução tampão 1X, 0,2mM de dNTPs, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 0,2µM de cada um dos *primers*. O ciclo das PCRs foi iniciado com uma etapa de desnaturação a 94°C por 11 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1min, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, sendo finalizado com uma extensão a 72°C por 6 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz UV.

Os produtos da amplificação da região D-loop foram purificados a partir da precipitação diferencial com polietilenoglicol (PEG) (LIZ; SCHLEIF, 1975) e enviados para sequenciamento em sequenciador automático ABI3730XL na empresa Macrogen (Coreia do Sul).

O software BioEdit (HALL, 1999) foi utilizado para analisar a qualidade do sequenciamento do DNA mitocondrial, através da visualização dos eletroferogramas, e para a realização do alinhamento múltiplo das sequências através da ferramenta Clustal W. Após o alinhamento e edição das sequências, estas foram analisadas utilizando-se o programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009). Através desse programa foram determinados o número de sítios variáveis, o número de haplótipos encontrados nas amostras analisadas, e os índices de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica.

#### *Avaliação da estrutura genética espacial e gargalo populacional*

O programa Structure 2.3.1 (PRITCHARD, 2000), foi utilizado para inferir o número de agrupamentos genéticos (K) existentes na amostragem. O software usa o método bayesiano de agrupamento e o algoritmo MCMC (Cadeias de Markov e Montecarlo) para realizar testes de atribuição de indivíduos a grupos que estejam sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação. A partir destes testes, o número de agrupamentos (K) é definido de forma que os desequilíbrios sejam mínimos (Hardy-Weinberg e de ligação). Foram realizadas 6 simulações independentes para K variando de 1 a 12, cada uma delas com 1.000.000 de repetições da MCMC realizadas após um período de “*burn-in*” de 500.000 repetições. Foi utilizado o modelo *admixture* que é adequado para populações onde os indivíduos possam ter frações do seu genoma herdadas a partir de ancestrais de mais de uma população. Junto à este modelo, utilizou-se também o modelo de alelos correlacionados (FALUSH *et al.*, 2003), no qual a deriva genética é considerada a responsável por causar divergência das frequências alélicas das populações que tiveram um ancestral comum. As

análises foram realizadas duas vezes, incluindo-se ou não a localização geográfica dos animais coletados como informação *a priori*.

Para determinar o número de agrupamentos existentes na amostragem, foi escolhido o valor de  $K$  que maximiza a probabilidade de os dados pertencerem ao número estimado de grupos, ou seja, o maior valor de  $\ln(P(X|K))$  (probabilidade de observar os dados ( $X$ ) condicionada ao número de agrupamentos ( $K$ )), de acordo com Pritchard (2000). Porém, para Evanno *et al.* (2005) a estimativa  $\ln(P(X|K))$  não fornece o número correto de grupos ( $K$ ) na maioria dos casos em que a dispersão entre as populações não é homogênea. Sendo assim, tais autores sugerem a utilização de delta  $K$ , correspondente à taxa de mudança no  $\ln(P(X|K))$  entre sucessivos valores de  $K$ .

Para verificar a possibilidade de ocorrência de eventos demográficos recentes (gargalos populacionais) utilizou-se o programa Bottleneck (PIRY *et al.*, 1999). Neste programa foram escolhidos o teste de Wilcoxon, que se adequa a análises realizadas com menos de 20 locos, e o Modelo Mutacional em Duas-Fases (*Two-Phase Model* - TPM), que mais se adequa aos estudos realizados com microssatélites por abrigar uma variação entre dois modelos mutacionais, o Modelo de Alelos Infinitos (*Infinite Alleles Model* - IAM) e o Modelo de Mutação Passo-a-Passo (*Stepwise Mutation Model* - SMM). Para contornar a incerteza relacionada à proporção das mutações passo-a-passo no Modelo de Duas-Fases (TPM), nós realizamos análises onde as mutações devido ao modelo SMM correspondiam à 75, 82 e 95% do total de mutações. Para a variância no tamanho dos alelos utilizamos  $s^2 = 12$ , indicado pelo autor do programa como adequado para análises feitas com marcadores microssatélites.

#### *Análises de parentesco genético*

Os locos microssatélites analisados foram utilizados para estimarmos a probabilidade de exclusão de paternidade e para a determinação do parentesco genético entre os indivíduos estudados.

A probabilidade de exclusão de paternidade ( $P_E$ ) quando não se conhece nenhum dos pais de um indivíduo foi calculada para cada um dos locos analisados e para a combinação de todos os locos através do software GenAIEx 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

O coeficiente de parentesco entre todos os pares de indivíduos analisados, independentemente da área de coleta, foi calculado utilizando-se a estimativa baseada em máxima verossimilhança implementada no programa ML-Relate (KALINOWSKI *et al.*, 2006). A partir dessa análise foram obtidos, além dos coeficientes de parentesco par-a-par, os

valores médios para o conjunto total de indivíduos (machos + fêmeas), apenas para as fêmeas e apenas para os machos. O coeficiente de parentesco par-a-par e médio também foi calculado para cada uma das áreas e sítios de coleta separadamente, agrupando-se machos e fêmeas de cada área, ou separando-se os sexos quando possível (quando mais de um indivíduo de cada sexo estava presente). O programa BioStat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007) foi utilizado para determinar se as comparações de parentesco nos diversos níveis apresentavam suporte estatístico significativo, através do Teste U para dados não paramétricos.

O programa ML-Relate foi ainda utilizado para se estabelecer em qual categoria de relacionamento os pares de indivíduos, consistentemente com os dados genéticos apresentados, melhor se enquadravam (não relacionados – U; meio-irmãos – HS; irmãos-completos – FS e pai-filho – PO).

### 3.3. Resultados

#### *Diversidade Genética Nuclear*

As informações relacionadas à diversidade genética nuclear da população de *Clyomys bishopi* existente na EE de Itirapina são apresentadas na Tabela 3.1, e em certa medida são idênticas ao que já foi apresentado no Capítulo 2. Através da análise de 10 locos de microssatélites foi possível detectar um total de 100 alelos, sendo que o número de alelos por loco variou de 5 a 17, com uma média de 10 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou de 0,615 a 0,875, com média de 0,759 e a heterozigosidade esperada (diversidade gênica, NEI 1987) variou de 0,604 a 0,921, com média de 0,799. O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) variou de -0,123 a 0,189, sendo o valor multiloco obtido para o conjunto total de amostras igual a 0,051. A realização do teste exato para a detecção de deficiência de heterozigotos mostrou que apenas o loco Cbi 15 apresenta valores significativos para esse teste, corroborando assim o teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentado no Capítulo 2, o qual indicava que este loco encontrava-se fora do equilíbrio. A causa provável para esse fato, conforme indicado pela análise realizada através do programa Microchecker, talvez seja a ocorrência de alelos nulos nesse loco, estimada em 0,083. Apesar de relativamente baixa, esta é a maior frequência encontrada entre todos os locos analisados, sendo o valor médio para todos os locos igual à 0,027 (Tabela 3.1).

Diante dos resultados obtidos, o loco Cbi 15 foi retirado das análises seguintes, já que a presença de locos que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e que apresentam alta frequência de alelos nulos pode violar as premissas necessárias para a análise de estruturação

genética, ocorrência de gargalos populacionais ou avaliação do parentesco genético entre os indivíduos em uma população. Desta forma, os resultados das análises apresentadas a seguir foram obtidos utilizando-se os 9 locos microssatélites restantes.

**Tabela 3.1.** Caracterização da diversidade genética encontrada em *Clyomys bishopi* na EE de Itirapina, através da análise de 10 locos microssatélites.

Loco	$N_A$	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$	$P_{FIS}$	$fA_N$
<i>Cbi 06</i>	17	0,875	0,921	0,050	0,200	0,020
<i>Cbi 07</i>	9	0,789	0,839	0,059	0,245	0,027
<i>Cbi 08</i>	9	0,846	0,754	-0,123	0,985	0,000
<i>Cbi 11</i>	9	0,675	0,816	0,173	0,010	0,062
<i>Cbi 12</i>	5	0,675	0,604	-0,117	0,915	0,000
<i>Cbi 14</i>	7	0,615	0,759	0,189	0,030	0,075
<i>Cbi 15</i>	17	0,744	0,915	0,187	<b>0,005</b>	0,083
<i>Cbi 16</i>	13	0,850	0,874	0,027	0,360	0,030
<i>Cbi 17</i>	5	0,750	0,714	-0,051	0,805	0,000
<i>Cbi 18</i>	9	0,769	0,804	0,043	0,310	0,000
<b>Média</b>	10	0,759	0,799	0,051	0,015	0,027

$N_A$ : número de alelos;  $H_o$ : heterozigosidade observada;  $H_E$ : diversidade gênica (NEI, 1987);  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia;  $P_{FIS}$ : valores de  $p$  para o teste de deficiência de heterozigotos;  $fA_N$ : frequência de alelos nulos. Em negrito, valores significativos após a correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0,005$ ).

#### *Diversidade Genética Mitocondrial*

Das 40 amostras coletadas na EE de Itirapina, obtivemos sucesso na amplificação do primeiro domínio da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) em 24 delas. No total foram analisados 436 sítios nucleotídicos, dos quais 74 eram variáveis. O número de haplótipos encontrado foi igual a 3 ( $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ ), sendo que entre os haplótipos  $H_1$  e  $H_2$  existem 56 passos mutacionais, entre  $H_1$  e  $H_3$  são 34 passos e entre  $H_2$  e  $H_3$  podemos encontrar 62 pontos de mutação. Analisando-se a variação existente na população, verificamos uma diversidade haplotípica ( $H_D$ ) igual a 0,163 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) igual a 0,017.

A distribuição dos haplótipos entre as áreas de coleta é apresentada na Tabela 3.2. O haplótipo  $H_1$ , o mais freqüente dos três, foi encontrado em 22 indivíduos distribuídos por todas as áreas de coleta, sendo 16 na área de coleta A (sítios  $A_1 - A_{10}$ ), 4 na área B e 2 na área C. Já os haplótipos  $H_2$  e  $H_3$  foram encontrados em apenas um único indivíduo cada, localizados nos sítios de coleta  $A_4$  e  $A_5$ , respectivamente.



**Tabela 3.2.** Distribuição dos haplótipos de DNA mitocondrial entre as áreas de coleta. Os números apresentados referem-se à quantidade de indivíduos com um determinado haplótipo em cada uma das áreas.

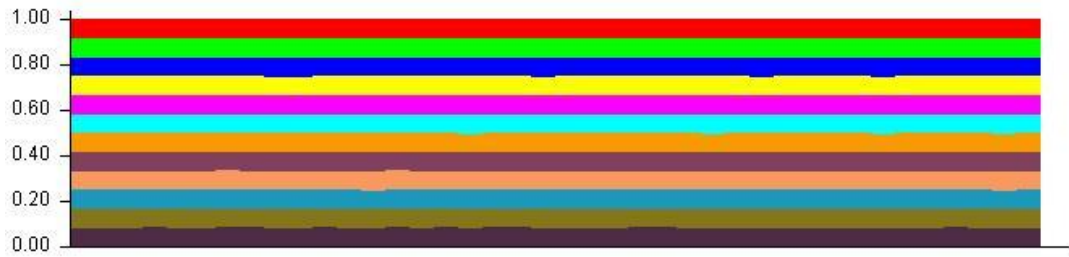
Haplótipo	Área de Coleta											
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>10</sub>	B	C
H <sub>1</sub>	1	2	1	3	1	1	2	1	3	1	4	2
H <sub>2</sub>				1								
H <sub>3</sub>					1							

### *Estrutura genética espacial e gargalo populacional*

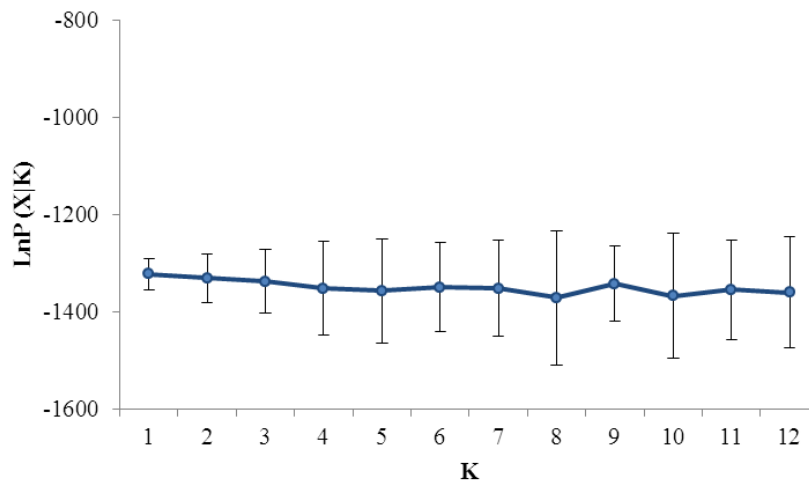
Realizamos duas análises de agrupamento bayesiano através do programa Structure (PRITCHARD, 2000), incluindo todos os 9 locos analisados que encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na primeira análise não utilizamos nenhuma informação prévia sobre as amostras, enquanto que na segunda análise informamos ao programa dados sobre a localização geográfica dos indivíduos. Os resultados das duas análises foram similares e nos indicam que o número mais provável de agrupamentos genéticos dentro da EE de Itirapina é 1, ou seja, as amostras analisadas formam um único agrupamento genético e as áreas de coleta não apresentam diferenciação entre si. Nas Figuras 3.2 e 3.3 podemos visualizar a ausência de estruturação genética entre as áreas de amostragem (aqui mostradas para as simulações realizadas com  $K = 2$  e  $K = 12$ ). O valor de  $\text{LnP}(X|K)$  obtido pela média das seis simulações realizadas para cada  $K$  também é maximizado quando  $K = 1$  (valor médio = -1322,43; Figura 3.4). A estimativa do número de agrupamentos ( $K$ ) pelo método de Evanno *et al.* (2005) também confirma que não há grupos geneticamente diferenciados dentro da amostragem ( $K=1$ ) (Figura 3.5).



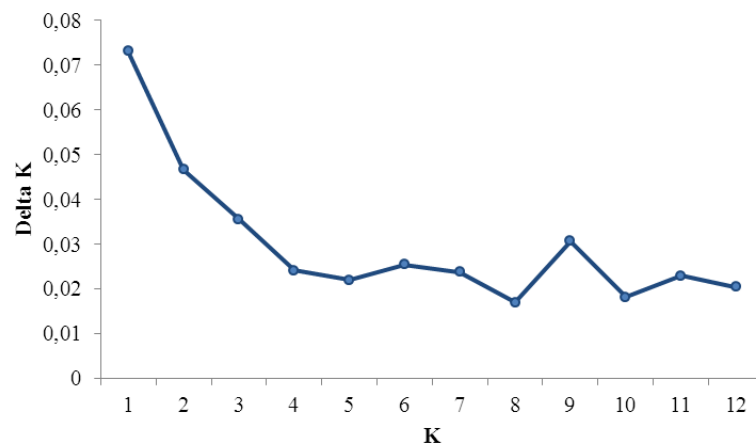
**Figura 3.2.** Resultado obtido com o programa Structure para  $K=2$ , representando a população não estrutura de *C. bishopi*.



**Figura 3.3.** Resultado obtido com o programa Structure para  $K=12$ , representando a população não estrutura de *C. bishopi*.



**Figura 3.4.** Resultados das estimativas de  $\ln(P(X|K))$  versus o número de agrupamentos  $K$ . Os pontos são médias entre 6 corridas independentes com 1.000.000 repetições da MCMC e 500.000 repetições de “burn-in”.



**Figura 3.5.** Estimativa do número de agrupamentos ( $K$ ) de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005).

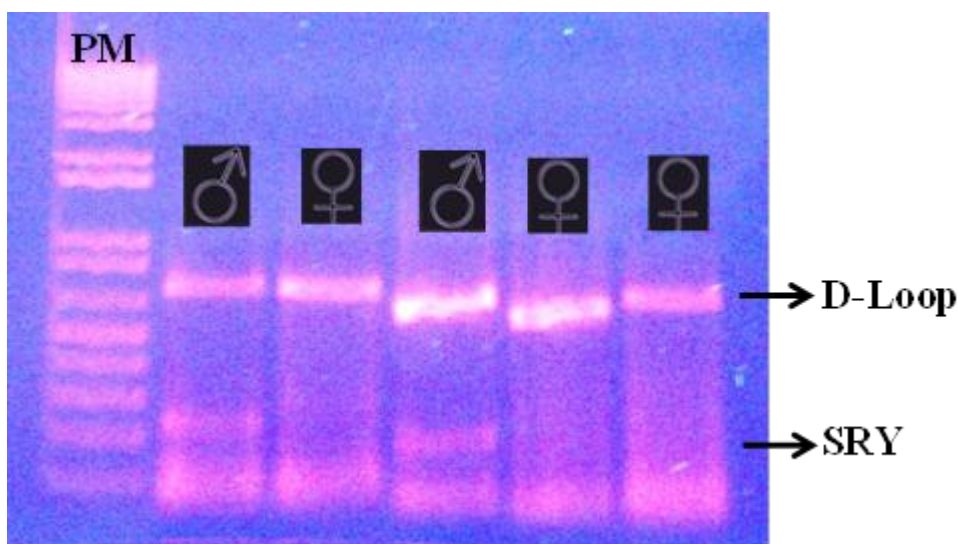
Para análise de ocorrência de eventos demográficos recentes, também utilizamos apenas os 9 locos que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O programa Bottleneck não indicou ocorrência de gargalo populacional em nenhuma das análises realizadas (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3.** Valores de  $p$  para análise de gargalo populacional.

Porcentagem de SMM	Valor de $p$
75	0,02441
82	0,12500
95	0,75195

#### *Determinação do sexo e análise do parentesco genético*

A sexagem molecular dos indivíduos analisados foi realizada com sucesso a partir de reações de amplificação multiplex (*primers* para região do D-loop e gene SRY) (Figura 3.6). Dos 40 indivíduos analisados, 18 foram sexados como machos e 22 como fêmeas. O número de machos e fêmeas encontrados em cada uma das áreas de coleta (A, B e C) e nos diferentes sítios dentro da área A ( $A_1 - A_{10}$ ) são mostrados na Figura 3.7.



**Figura 3.6.** Gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) mostrando a sexagem de 5 indivíduos (2 machos e 3 fêmeas); PM = Marcador de peso molecular.

Sexo	A	B	C	Total
Fêmeas	16	5	1	22
Machos	16	1	1	18

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>10</sub>
Fêmeas	2	2	3	1	1	---	2	1	2	2
Machos	1	1	1	3	2	2	1	---	4	1

**Figura 3.7.** Ilustração representando o número de indivíduos machos e fêmeas em cada uma das áreas de coleta, conforme determinado através da sexagem molecular.

O conjunto de locos utilizado mostrou-se altamente informativo e adequado para se determinar o grau de relacionamento entre os diferentes indivíduos analisados. A probabilidade de exclusão de paternidade obtida com cada um dos 9 locos variou de 52 a 95%, com valor combinado para os 9 locos de 100% (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4.** Valores de probabilidade de exclusão ( $P_E$ ) por loco e combinado para todos os locos.

<i>Loco</i>	$P_E$
Cbi 06	0,95
Cbi 07	0,84
Cbi 08	0,75
Cbi 11	0,80
Cbi 12	0,52
Cbi 14	0,74
Cbi 16	0,89
Cbi 17	0,65
Cbi 18	0,80
Total	1,00

O coeficiente de parentesco foi estimado por máxima verossimilhança para todos os pares de indivíduos analisados. Considerando o total de indivíduos nas três áreas de coleta ( $n = 40$ ), foram realizadas 780 comparações par-a-par. Através das comparações realizadas, os pares de indivíduos foram alocados dentro de categorias pré-estabelecidas de relacionamento (PO, FS, HS e U) (Apêndice C).

A Tabela 3.5 apresenta o valor médio do coeficiente de parentesco obtido para o conjunto total de amostras (Geral = áreas A + B + C) e para cada uma das áreas e sítios

isoladamente, separando-se ou não os indivíduos de acordo com o sexo. Para as análises ao nível de sítios ( $A_1$  a  $A_{10}$ ) foram obtidas ainda as médias de parentesco dentro deles.

**Tabela 3.5.** Valores médios de parentesco e erro padrão para as diferentes áreas e sítios de coleta, separados ou não de acordo com o sexo, e valores percentuais de pares de indivíduos relacionados (PO, FS ou HS).

Área	Média de parentesco (máxima verossimilhança)			Porcentagem de indivíduos relacionados
	Fêmeas + Machos	Fêmeas	Machos	
<b>Geral (40 indivíduos)</b>	0,054 ( $\pm 0,003$ )	0,056 ( $\pm 0,006$ )	0,054 ( $\pm 0,004$ )	13,6
<b>A (32 indivíduos)</b>	0,055 ( $\pm 0,004$ )	0,056 ( $\pm 0,009$ )	0,052 ( $\pm 0,008$ )	13,7
<b>B (6 indivíduos)</b>	0,020 ( $\pm 0,012$ )	0,015 ( $\pm 0,011$ )	-	20,0
<b>C (2 indivíduos)</b>	0 ( $\pm 0$ )	-	-	0
$A_1$	0,180 ( $\pm 0,160$ )	0,500 ( $\pm 0$ )	-	33,3
$A_2$	0,150 ( $\pm 0,021$ )	0,160 ( $\pm 0$ )	-	33,3
$A_3$	0,112 ( $\pm 0,049$ )	0,070 ( $\pm 0,036$ )	-	16,7
$A_4$	0,182 ( $\pm 0,074$ )	-	0,310 ( $\pm 0,100$ )	16,7
$A_5$	0,167 ( $\pm 0,167$ )	-	0 ( $\pm 0$ )	33,3
$A_6$	0 ( $\pm 0$ )	-	0 ( $\pm 0$ )	0
$A_7$	0,037 ( $\pm 0,037$ )	0 ( $\pm 0$ )	-	0
$A_8$	-	-	-	-
$A_9$	0,100 ( $\pm 0,033$ )	0 ( $\pm 0$ )	0,115 ( $\pm 0,035$ )	33,3
$A_{10}$	0,147 ( $\pm 0,147$ )	0,440 ( $\pm 0$ )	-	33,3
<b>Média dentro dos sítios</b>	0,123 ( $\pm 0,024$ )	0,164 ( $\pm 0,070$ )	0,147 ( $\pm 0,045$ )	

Valores médios por sítio calculados apenas para aqueles com número amostral suficiente.

Devido à diferença no número de amostras e à diferença nas datas de sua obtenção, não realizamos comparações estatísticas entre os valores médios do coeficiente de parentesco obtidos para cada uma das áreas. Entretanto foi possível avaliar, através do Teste U, a significância estatística das diferenças observadas nos coeficientes de parentesco médios obtidos considerando toda a área A *versus* os coeficientes de parentesco médios dentro dos sítios em A. Para a comparação dos valores de parentesco envolvendo machos + fêmeas na área A ( $0,055 \pm 0,004$ ) *versus* parentesco de machos + fêmeas dentro dos sítios na área A ( $0,123 \pm 0,024$ ) obteve-se valor de  $p$  igual a 0,0023. Na comparação do parentesco de apenas fêmeas na área A ( $0,056 \pm 0,009$ ) *versus* parentesco de apenas fêmeas dentro dos sítios da área A ( $0,164 \pm 0,070$ ) o valor de  $p$  foi de 0,1149. Para a comparação dos valores de parentesco de apenas machos na área A ( $0,052 \pm 0,008$ ) *versus* parentesco de machos dentro dos sítios da área A ( $0,147 \pm 0,045$ ), o valor de  $p$  foi de 0,0165. Quando comparamos o parentesco de fêmeas dentro dos sítios ( $0,164 \pm 0,070$ ) *versus* parentesco de machos dentro dos sítios ( $0,147 \pm 0,045$ ), obtivemos valor de  $p$  igual a 0,4195.

Considerando o coeficiente de parentesco calculado para cada uma das áreas de coleta separadamente, 69 pares de indivíduos (de um total de 512 comparações) foram alocados nas

três categorias de relacionamento (PO, FS e HS). Para a área A, os pares de indivíduos relacionados foram contabilizados dentro e entre sítios. Destes, 57 (83,8%) são constituídos por indivíduos amostrados em diferentes sítios de coleta, e 11 (16,2%) são pares de indivíduos amostrados dentro do mesmo sítio de coleta (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6.** Distribuição dos pares de indivíduos relacionados dentro e entre sítios e áreas de coleta.

	Categorias			Total
	PO	FS	HS	
Área A - dentro de sítios ( $A_1$ a $A_{10}$ )	3	2	6	11
Área A - entre sítios ( $A_1$ a $A_{10}$ )	4	3	50	57
Dentro da área B	-	-	1	1
Dentro da área C	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>57</b>	<b>69</b>

Na Tabela 3.7, estão sumarizados os dados dos pares de indivíduos classificados como parentes de primeira ordem (PO e FS) dentro da área de coleta A.

**Tabela 3.7.** Identificação dos pares de indivíduos apresentando parentesco de primeira ordem na área A, relacionando o sexo (F=fêmea, M=macho), sítio de coleta e distâncias entre os sítios.

Categoria de Relacionamento	Pares de Indivíduos	Sexo	Sítio de Coleta	Distância entre sítios (m)
PO	1 x 2	F x F	$A_1$ x $A_1$	---
	13 x 14	M x M	$A_4$ x $A_4$	---
	16 x 17	M x F	$A_5$ x $A_5$	---
	2 x 20	F x M	$A_1$ x $A_6$	1.000
	8 x 26	F x F	$A_3$ x $A_9$	1.200
	10 x 26	M x F	$A_3$ x $A_9$	1.200
	10 x 20	M x M	$A_3$ x $A_6$	600
FS	27 x 31	M x F	$A_9$ x $A_9$	---
	33 x 34	F x F	$A_{10}$ x $A_{10}$	---
	3 x 26	M x F	$A_1$ x $A_9$	1.600
	8 x 12	F x F	$A_3$ x $A_4$	200
	8 x 14	F x M	$A_3$ x $A_4$	---

### 3.4. Discussão

Os dados genéticos básicos obtidos para a população de *C. bishopi* na EE de Itirapina, analisada com o uso de 10 locos microssatélites ( $N_A = 5$  a  $17$ ;  $H_E = 0,604$  a  $0,921$  e  $H_O = 0,615$  a  $0,875$ ), apresentam valores maiores do que para outros roedores relatados na

literatura. El Jundi e Freitas (2004), avaliando a estrutura genética de 88 indivíduos de *Ctenomys lami* (espécie de tuco-tuco) utilizando oito locos microssatélites, encontraram valores menores para número de alelos (1 a 3), heterozigosidade esperada (0,391 a 0,654) e heterozigosidade observada (0,215 a 0,636) do que os valores encontrados no presente trabalho.

Lacey (2001) avaliou os dados genéticos básicos para duas espécies de roedores, *Ctenomys haigi*, uma espécie de tuco-tuco solitário e *Ctenomys sociabilis*, espécie de hábito colonial. A autora discutiu em seu trabalho como as informações básicas relacionadas ao número de alelos e heterozigosidades podem ser úteis para se conhecer a história de vida das espécies. *C. sociabilis* apresentou número de alelos (1 a 3) e heterozigosidades médias ( $H_O = 0,18$  e  $H_E = 0,18$ ) muito inferiores aos valores apresentados por *C. haigi* ( $N_A = 3$  a 13;  $H_O = 0,67$  e  $H_E = 0,70$ ), indicando que hábitos sociais fazem com que a variação genética natural da espécie seja menor do que a observada em espécies solitárias. Nossas análises com 40 indivíduos de *C. bishopi* apresentaram número de alelos e heterozigosidades médias ( $N_A = 5$  a 17;  $H_O = 0,76$  e  $H_E = 0,80$ ) mais semelhantes, e até mesmo superiores, aos valores descritos para *C. haigi*, a espécie de hábito solitário.

Apesar dos elevados níveis de diversidade genética nuclear mostrado pelos locos microssatélites, as análises com a região controladora do DNA mitocondrial mostraram baixo número de haplótipos (3 em 24 indivíduos) e nenhum padrão significativo da localização desses haplótipos com relação à distribuição geográfica dos indivíduos. Mora *et al.* (2006), estudando relações filogeográficas em *Ctenomys australis*, encontraram 24 haplótipos em 70 animais analisados, valores muito superiores aos nossos. Já a diversidade haplotípica foi similar à nossa (0,154 para *C. australis* e 0,163 para *C. bishopi*), sendo considerada uma diversidade moderada. Com relação à diversidade nucleotídica, nossos valores se mostraram bastante superiores (0,0055 para *C. australis* e 0,017 para *C. bishopi*), o que explicaria a grande quantidade de passos mutacionais encontrados entre os 3 haplótipos (56, 34 e 62 eventos mutacionais).

As análises de agrupamento espacial dos indivíduos estudados na EE de Itirapina mostraram que não há diferenciação genética entre as áreas amostradas, mesmo diante do fato da espécie habitar um ambiente espacialmente heterogêneo, associado à distribuição dos recursos alimentares por ela utilizada, principalmente a palmácea *Attalea geraensis*. Gauffre *et al.* (2008) estudando o roedor *Microtus arvalis*, realizaram análises bayesianas com uma ampla amostragem de indivíduos coletados em um ambiente altamente heterogêneo, espacial e temporalmente. Ao contrário do esperado, tais autores encontraram uma única unidade genética englobando toda a área de estudo e sugeriram que os principais responsáveis por este

cenário foram a intensa dispersão em pequena escala dos animais e o grande tamanho efetivo da população. Tais eventos podem também estar sendo os responsáveis pelos resultados obtidos no presente trabalho, pois por mais que o Cerrado da EE de Itirapina apresente um complexo de fitofisionomias variadas e os animais sejam dependentes da existência de solo adequado para construção de tocas e da disponibilidade de recursos alimentares, esses fatores parecem não impedir o deslocamento dos indivíduos em pequenas e grandes distâncias, o que resultaria na distribuição da diversidade genética conforme o observado e a formação de uma única unidade genética populacional. As informações obtidas pela análise do parentesco genético entre os indivíduos analisados, discutidas a seguir, reforçam esta possibilidade.

Nas análises de parentesco realizadas com os indivíduos da EE de Itirapina foram obtidos baixos índices de parentesco entre eles. Valores próximos à 0,05 foram encontrados tanto nas análises envolvendo os 40 indivíduos, como nas que envolveram separadamente os indivíduos das áreas A, B e C, agrupando-se ou não os animais de acordo com o sexo. Estudos realizados por Patzenhauerová *et al.* (2010) com três populações de *Heliophobius argenteocinereus*, espécie de roedor africano subterrâneo e de hábito solitário, revelaram estimativas de parentesco por máxima verossimilhança similares às estimativas aqui apresentadas (0,09). Por outro lado, níveis elevados de parentesco são apresentados por Burland *et al.* (2002) em estudo com uma espécie de roedor africano que apresenta hábitos sociais. Os autores mostraram valores médios iguais à 0,40 ( $\pm 0,02$ ), 0,54 ( $\pm 0,04$ ) e 0,51 ( $\pm 0,02$ ) dentro de colônias de *Cryptomys damarensis*. Em um outro estudo, Reeve *et al.* (1990) apresentaram médias de parentesco atingindo 0,81 ( $\pm 0,10$ ) em *Heterocephalus glaber*, um roedor africano que apresenta comportamento eusocial. Os valores de parentesco médio para *C. bishopi* mostram-se ligeiramente maiores apenas quando reduzimos as análises para uma escala geográfica menor, ao nível de sítios. Neste caso, os valores médios de parentesco dentro dos sítios são iguais à 0,123 ( $\pm 0,024$ ) (machos e fêmeas juntos), 0,164 ( $\pm 0,070$ ) (apenas fêmeas) e 0,147 ( $\pm 0,045$ ) (apenas machos) mostrando que, em uma escala geográfica reduzida (dentro dos sítios), os animais são mais aparentados entre si do que quando olhamos uma escala geográfica maior (toda a área A). Com exceção do valor apresentado na análise considerando-se apenas as fêmeas, a diferença entre os valores de parentesco dentro dos sítios e os valores de parentesco para toda a área A é estatisticamente significativa. Para a comparação realizada apenas com fêmeas, a significância estatística não foi atingida provavelmente pelo reduzido tamanho amostral, apesar da diferença observada entre os valores de parentesco médio ( $0,056 \pm 0,009$  na área A e  $0,164 \pm 0,070$  dentro dos sítios).

Os estudos com *Heliophobius argenteocinereus* também envolveram análises das diferenças no coeficiente de parentesco médio entre machos e fêmeas, a fim de se avaliar a



ocorrência de dispersão diferencial entre sexos. Os valores obtidos para essa espécie mostraram maior coeficiente de parentesco entre fêmeas (0,06 para fêmeas e 0,00 para machos), o que levou esses autores a sugerirem um maior nível de filopatria em fêmeas de *H. argenteocinereus*. Cutrera *et al.* (2005), analisando populações de *Ctenomys talarum* (espécie solitária de roedor subterrâneo), encontraram maior estruturação de parentesco entre fêmeas (0,10 para fêmeas e 0,01 para machos), indicando também maior dispersão dos machos. Os resultados de parentesco por sexo dentro dos sítios da área A para *C. bishopi* indicam a existência de uma leve diferença na taxa de dispersão entre machos e fêmeas (média de  $0,164 \pm 0,070$  para fêmeas e  $0,147 \pm 0,045$  para machos), contudo esta não é estatisticamente significativa ( $p=0,8391$ ), indicando uma capacidade de dispersão similar para machos e fêmeas. Este resultado é reforçado pelos dados de parentesco apresentados na Tabela 3.7, onde podemos verificar que tanto as fêmeas quanto os machos apresentam significativa capacidade de deslocamento. Como ilustração podemos chamar a atenção, por exemplo, para o par de fêmeas categorizadas como mãe e filha coletadas a 1.200m de distância uma da outra. Os resultados de coeficiente de parentesco médio e categorias de relacionamento aqui apresentados mostram que, apesar de geralmente as fêmeas de mamíferos apresentarem maiores níveis de filopatria que machos, para *C. bishopi* parece haver uma similaridade na capacidade de dispersão entre os sexos.

Patzenhauerová *et al.* (2010) também incluíram os indivíduos de *H. argenteocinereus* analisados em seu trabalho em categorias de relacionamento, e seus resultados classificaram de 10 a 19% dos pares de indivíduos como relacionados (PO, FS ou HS). Os resultados obtidos para os 40 indivíduos analisados neste trabalho é bastante similar ao descrito por esses autores, já que 13,6% dos possíveis pares se enquadram dentro das categorias de indivíduos relacionados, valores que sobem para 13,7% e 20% nas áreas A e B, respectivamente, quando estas são analisadas separadamente. Ainda com relação às análises de parentesco, a identificação dos pares de indivíduos relacionados na escala de sítios dentro da área A mostrou que 16,2% dos indivíduos aparentados estão presentes dentro dos mesmos sítios, enquanto que a grande maioria, 83,8% dos indivíduos aparentados, são encontrados em sítios de coleta distintos. Esta informação reforça, mais uma vez, os indícios de que esses animais apresentam uma capacidade relativamente grande de deslocamento, o que está de acordo com nossos achados quanto à ausência de estruturação espacial dos indivíduos analisados na EE de Itirapina.

De acordo com Burda *et al.* (2000) os roedores subterrâneos e fossoriais podem ser classificados como solitários, coloniais, sociais comunais, sociais familiares e eusociais. Espécies solitárias são aquelas que apresentam diversos tipos de sistemas de acasalamento,

mas cada toca é ocupada por um único animal, as mães cuidam de seus filhotes sozinhas e a prole dispersa após o desmame. As espécies ditas coloniais também apresentam diversos tipos de sistema de acasalamento, mas os animais, basicamente solitários, constroem suas tocas próximas uns aos outros. Já nas categorias sociais, as tocas são ocupadas ao menos por dois animais. No caso das espécies sociais comunais, mais de uma fêmea se acasala simultaneamente na colônia e os outros indivíduos podem ou não cooperar na criação dos filhotes. Para as espécies sociais familiares, apenas uma fêmea se reproduz no grupo, a dispersão da prole é atrasada, e estes indivíduos, enquanto permanecem no grupo, não se reproduzem mas ajudam no forrageamento, extensão, manutenção e defesa das tocas. No caso extremo de socialidade, os eusociais, apenas uma fêmea se reproduz e a prole nunca se dispersa, passando a vida toda como ajudantes não reprodutores.

Analisando-se as informações disponíveis na literatura e o observado por nós em campo, podemos afirmar que *C. bishopi* apresenta hábitos coloniais devido à agregação de suas tocas em função da disponibilidade de recursos existentes em sua área de ocorrência. Apesar do agrupamento em colônias, os dados genéticos obtidos por nós indicam uma estrutura genética social compatível com aquela encontrada em espécies de hábitos solitários. Para uma avaliação mais precisa da existência ou não de interações sociais em *Clyomys bishopi*, é necessário a realização de mais estudos, como os ecológicos de avaliação direta.

## **Conclusões**

## Conclusões

O gênero *Clyomys* vem sendo alvo de indagações nos últimos anos sobre a diversidade de espécies que abriga. Nossas análises com sequências de citocromo b mostram que os indivíduos de Itirapina-SP constituem um grupo geneticamente coeso que apresenta distâncias genéticas relativamente grandes quando comparados à indivíduos de outras regiões do Brasil. Este resultado reforça a classificação taxonômica proposta por Ávila-Pires e Wutke (1981), os quais descrevem os animais presentes no estado de São Paulo como sendo uma espécie diferente daquela encontrada ao longo do Cerrado central brasileiro (*C. laticeps*). Além disso, nossos dados também mostram uma separação genética significativa entre os animais provenientes da região de Corumbá (MS) e dos estados da BA, DF, GO e MG, sugerindo um possível surgimento, nesta região do Pantanal, de uma unidade com potencial evolutivo único e significativo.

As poucas informações encontradas atualmente sobre *C. bishopi* na literatura sugeriam que esta seria uma das poucas espécies de roedor brasileiro apresentando hábitos sociais. Contudo, até o momento, os trabalhos existentes não apresentavam informações mais detalhadas sobre a estruturação populacional e social desses animais. Os resultados aqui expostos, utilizando técnicas moleculares, mostram uma ausência de estruturação espacial entre os indivíduos e fortes indícios de não haver uma estruturação social significativa entre eles, bem como uma possível capacidade de dispersão similar para ambos os sexos. Assim, os dados apresentados sugerem que nas colônias desta espécie, aparentemente formadas em função da disponibilidade de recursos alimentares em uma determinada área e do tipo de solo existente no local, o agrupamento de animais se dá, em sua maioria, entre indivíduos não aparentados. Essa associação, entretanto, não significa que interações sociais mais profundas ocorram entre os indivíduos presentes em uma colônia. Para uma avaliação dessa natureza, é necessário a realização de estudos que vão além dos realizados em nosso trabalho.

O Cerrado é um dos biomas mais ameaçados do estado de São Paulo, do qual resta atualmente apenas 1% da sua cobertura original, sendo que muito pouco disto encontra-se protegido legalmente. Tendo isto em vista, nossos achados sobre o *status* taxonômico e estruturação genética populacional e social de *C. bishopi* mostram-se de extrema importância, não apenas por chamar a atenção para a necessidade de se dar mais atenção à esta espécie, mas também pela necessidade de se preservar os remanescentes de Cerrado do estado de São Paulo que, conforme já relatado em inúmeros trabalhos, abrigam fauna e flora bastante ricas, com muitas espécies endêmicas desta região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. B.; GALETTI, M. Seed dispersal and spatial distribution of *Attalea geraensis* (Arecaceae) in two remnants of Cerrado in Southeast Brazil. **Acta Oecologica**, v. 32, p. 180-187, 2007.
- ÁVILA-PIRES, F. D.; WUTKE, M. R. C. Taxonomia e Evolução de *Clyomys* Thomas 1916 (Rodentia Echimyidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, n. 3, p. 529-524, 1981.
- AXELROD, R.; HAMILTON, W. D. The evolution of cooperation. **Science**, v. 211, p. 1390-1396, 1981.
- BARCLAY, S. D.; COSTELLO, B.; SHERWIN, W. B. Limite cross-species microsatellite amplification and the isolation and characterization of the new microsatellite markers for the greater stick-nest rat (*Leporillus conditor*). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 882-885, 2006.
- BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2011.
- BEZERRA, A. M. R. Variabilidade Morfológica e Status Taxonômico das Amostras Populacionais do Gênero *Clyomys* (Rodentia: Echimyidae). **Mastozoologia Neotropical**, v. 10, n. 1, p. 185-186, 2003.
- BEZERRA, A. M. R.; OLIVEIRA, J. A. Taxonomic implications of cranial morphometric variation in the genus *Clyomys* Thomas, 1916 (Rodentia: Echimyidae). **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 1, p.260-272, 2010.
- BISHOP, I. R. An annotated list of caviomorph rodents collected in north-eastern Mato Grosso Brazil. **Mammalia**, v. 38, p. 489-502, 1974.
- BITANYL, S.; BJORNSTAD, G.; ERNEST, E. M.; NESJE, M.; KUSILUKA, L. J.; KEYYU, J. D.; MDEGELA, R. H.; ROED, K. H. Species identification of Tanzanian antelopes using DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 442-449, 2011.
- BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 10, p. 503-511, 2003.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, 2008, 120 p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIES, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A test of the genetics concept: cytochrome b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 960-973, 2001.
- BRASILEIRO, C. A.; SAWAYA, R. J.; KIEFER, M. C.; Martins, M. Amphibians of an open Cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, 2005.
- BRYJA, J.; GRANJON, L.; DOBIGNY, G.; PATZENHAUEROVÁ, H.; KONECNY, A.; DUPLANTIER, J. M.; GAUNTHIER, P.; COLYN, M.; DURNEZ, L.; LALIS, A.; NICOLAS, V. Plio-Pleistocene history of West African Sudanian savanna and the phylogeography of the *Praomys daltoni* complex (Rodentia): the environment/geography/genetic interplay. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 4783-4799, 2010.
- BUENO, A. A.; BELENTANI, S. C. S.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Feeding Ecology of the Maned Wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Mammalia: Canidae), in the Ecological Station of Itirapina, São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, p. 1-9, 2002.
- BUENO, A. A. **Vulnerabilidade de pequenos mamíferos de áreas abertas a vertebrados predadores na Estação Ecológica de Itirapina, SP**. 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BUENO, A. A.; LAPENTA, M. J.; OLIVEIRA, F.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Association of the “IUCN vulnerable” spiny rat *Clyomys bishopi* (Rodentia: Echimyidae) with palm trees and armadillo burrows in southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 52, n. 4, p. 1009-1011, 2004.
- BUENO, A. A.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Small Mammal Selection and Functional Response in the Diet of the Maned Wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae), in Southeast Brazil. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 11-19, 2006.

- BURDA, H.; HONEYCUTT, R. L.; BEGAL, S.; LOCKER-GRÜTJEN, O.; SCHARFF, A. Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 47, p. 293-303, 2000.
- BURLAND, T. M.; BARRATT, E. M.; NICHOLS, R. A.; RACEY, P. A. Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1309-1321, 2001.
- BURLAND, T. M.; BENNETT, N. C.; JARVIS, J. U. M.; FAULKES, C. G. Eusociality in African mole-rats: new insights from patterns of genetic relatedness in the Damaraland mole-rat (*Cryptomys damarensis*). **Proceedings of the Royal Society**, v. 269, p. 1025-1030, 2002
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de Evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 51-63.
- CAVALCANTI, R. B.; JOLY, C. A. Biodiversity and Conservation Priorities in the Cerrado Region. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (eds.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 351-367.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.
- COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. Mammal Conservation in Brasil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, 2005.
- CUTRERA, A. P.; LACEY, E. A.; BUSCH, C. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2511-2523, 2005.
- DELGADO, J. M.; BARBOSA, A. F.; SILVA, C. E.; ZANCHETTA, D.; SILVA, D. A.; GIANNOTTI, D.; PINHEIRO, G. S.; DUTRA-LUTGENS, H.; FACHIN, H. C.; DA MOTA, I. S.; LOBO, M. T.; NEGREIROS, O. C.; ANDRADE, W. J. **Plano de Manejo Integrado das unidades de Itirapina – SP**. Instituto Florestal. São Paulo, 2004.
- DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 39, p. 1-38, 1977.
- DI FIORE, A.; FLEISCHER, R. C. Social behavior, reproductive strategies, and population genetic structure of *Lagothrix poeppigii*. **International Journal of Primatology**, v. 26, p. 1137-1173, 2005.
- DIXON, J. D.; OLI, M.; WOOTEN, M. C.; EASON, T. H.; MCCOWN, J. W.; PAETKAU, D. Effectiveness of a Regional Corridor in Connecting Two Florida Black Bear Populations. **Conservation Biology**, v. 20, n. 1, p. 155-162, 2006.
- EL JUNDI, T. A. R. J.; FREITAS, T. R. O. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). **Hereditas**, v. 140, p. 18-23, 2004.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.
- FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1583-1590, 2000.
- FAULKES, C. G.; ABBOTT, D. H.; O'BRIEN, H. P.; LAU, L.; ROY, M. R.; WAYNE, R. K.; BRUFORD, M. W. Micro- and macrogeographical genetic structure of colonies of naked mole-rats *Heterocephalus glaber*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 615-628, 1997.
- FERNANDO, P.; LANDE, R. 2000. Molecular genetics and behavioural analysis of social organization in the Asian elephant (*Elephas maximus*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, p. 84-91, 2000.
- FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1919-1927, 2010.
- FREDSTED, T.; PERTOLDI, C.; SCHIERUP, M. H.; KAPPELER, P. M. Microsatellite analyses reveal fine-scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2363-2372, 2005.

- FREITAS, P. D.; MARTINS, D. S.; GALETTI JR, P. M. CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 107–108, 2008.
- GALETTI JR., P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A. M. *et al.* Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008. 262 p.
- GASPARI, S.; AZZELLINO, A.; AIROLDI, S.; HOELZEL, A. R. Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2922–2933, 2007.
- GAUFFRE, B.; ESTOUP, A.; BRETAGNOLLE, V.; COSSON, J. F. Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4619–4629, 2008.
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Updated from Goudet (1995).
- GRANJON, L.; COSSON, J. F. Social relationships in *Mastomys huberti* as deduced from field and genetic analyses of multiple capture data. **Mammalia**, v. 72, p. 161–168, 2008
- GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 1140–1162, 1980.
- HAAG, T.; MUSCHNER, V. C.; FREITAS, L. B.; OLIVEIRA, L. F. B.; LANGGUTH, A.; MATTEVI, M. S. Phylogenetic relationships among species of the genus *Calomys* with emphasis on South American lowland taxa. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 3, p. 769–776, 2007.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HAMILTON, M. B.; PINCUS, E.L.; DI FIORI, A.; FLEISCHER, R.C. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, v. 27, p. 500–507, 1999.
- HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior. **Journal of Theoretical Biology**, v. 7, p. 1–52, 1964.
- HERRERA, E. A.; CHEMELLO, M. E.; LACEY, E. A.; SALAS, V.; SOUSA, B. F. Characterization of microsatellite markers from capybaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochoeridae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 541–543, 2004.
- HÜLLE, N. L. **Mamíferos de médio e grande porte num remanescente de Cerrado no sudeste do Brasil (Itirapina, SP)**. 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, 2006.
- ISHIBASHI, Y.; SAITOH, T.; ABE, S.; YOSHIDA, M. Kin-related social organization in a winter population of the vole *Clethrionomys rufocanus*. **Researches of Population Ecology**, v. 40, p. 51–59, 1998.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em 09 de maio de 2011.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1006, 2007.
- KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. A.; TAPER, M. L. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 576–579, 2006.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.
- KOCHER, T. D., THOMAS, W. K., MEYER, A., EDWARDS, S. V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F. X., WILSON A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, v. 86, p. 6196–6200, 1989.
- LACEY, E. A. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. **Heredity**, v. 86, p. 628–637, 2001.

- LACEY, E. A.; MALDONADO, J. E.; CLABAUGH, J. P.; MATOCQ, M. D. Inter-specific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomidae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1754-1756, 1999.
- LACEY, E. A.; WIECZOREK, J. R. Kinship in colonial tuco-tucos: evidence from group composition and population structure. **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 6, p. 988-996, 2004.
- LECOMTE, N.; GAUTHIER, G.; GIROUX, J-F.; MILOT, E.; BERNATCHEZ, L. Tug of war between continental gene flow and rearing site philopatry in a migratory bird: the sex-biased dispersal paradigm reconsidered. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 593-602, 2009.
- LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the Star-Phylogeny Hypothesis Revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 455-464, 2002.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DNASP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v. 2, n. 3, p. 383-289, 1975.
- LIST, R.; PERGAMS, O. R. W.; PACHECO, J.; CRUZADO, J.; CEBALLOS, G. Genetic divergence of *Microtus pennsylvanicus chihuahuensis* and conservation implications of marginal populations extinctions. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 5, p. 1093-1101, 2010.
- LOISEAU, A.; KONECNY, A.; GALAN, M.; BRYJA, J.; COSSON, J. F.; BROUAT, C. New polymorphic microsatellite loci for rodents of the genus *Mastomys* using PCR multiplexing, and cross-species amplification in *Myomys* and *Praomys*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 684-687, 2007.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.
- MATOCQ, M. D.; LACEY, E. A. Philopatry, kin clusters, and genetic relatedness in a population of woodrats (*Neotoma macrotis*). **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 4, p. 647-653, 2004.
- MEYER, J.; KOHNEN, A.; DURKA, W.; WÖSTEMEYER, J.; BLAUM, N.; ROSSMANITH, E.; BRANDL, R. Genetic structure and dispersal in a small South African rodent. Is dispersal female-biased? **Mammalian biology**, v. 74, p. 478-487, 2009.
- MITTERMEIER, M. N.; MYERS, N.; MITTERMEIER, G. G. **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Mexico City: CEMEX, 2000. 392P.
- MOOJEN, J. O. A new *Clyomys* from Paraguay (Rodentia: Echimyidae). **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 42, p. 102, 1952.
- MORA, M. S.; LESSA, E. P.; KITTLEIN, M. J.; VASSALO, A. I. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. **Journal of Mammalogy**, v. 87, n. 6, p. 1192-1203, 2006.
- MOTTA-JUNIOR, J. C.; ALHO, C. J. R.; BELANTANI, S. C. S. Food habits of the striped owl *Asio clamator* in South-East Brazil. In: CHANCELOR, R. D.; M, B. U. (Eds.). **Raptors Worldwide**. Berlin: WWGBP/MME, 2004. p. 777-784.
- MOTTA-JUNIOR, J. C.; GRANZINOLLI, M. A. M.; Develey, P. F. Aves da Estação Ecológica de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 207-227, 2008.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAKAMURA, H.; MURO, T.; IMAMURA, S.; YUASA, I. Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, p. 177-184, 2009.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York, USA: Columbia University Press, 1987.
- NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Center, Uppsala University. 2004.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.



- OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina e Sociedade Brasileira de Zoologia. 2006. 437 p.
- OLIVEIRA, L. R.; HORMAN, J. I.; HINGST-ZAHER, E.; MAJLUF, P.; MUELBERT, M. M. C.; MORGANTE, J. S.; AMOS, W. Morphological and genetic evidence for two evolutionary significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus australis*. **Conservation Genetics**, DOI: 10.1007/s10592-007-9473-1, 2008.
- OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.
- ORDÓÑEZ-GARZA, N.; MATSON, J.O.; STRAUSS, R. E.; BRADLEY, R. D.; SALAZAR-BRAVO, J. Patterns of phenotypic and genetic variation in three species of endemic Mesoamerican *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 4, p. 848-859, 2010.
- PATZENHAUEROVÁ, H.; BRYJA, J.; SUMBERA, R. Kinship structure and mating system in a solitary subterranean rodent, the silvery mole-rat. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, p. 757-767, 2010.
- 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.
- PELZ-SERRANO, C. MUNGUIA-VEJA, A.; PIAGGIO, A. J.; NEUBAUM, M.; MUNCLINGER, P.; PÁRTL, A.; VAN RIPER, C.; CULVER, M. Development of new microsatellite loci for the American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia: Castoridae), and cross-species amplification in the European beaver, *Castor fiber*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 551-554, 2009.
- PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (orgs.). **Métodos de estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: Ed. Da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2003. p. 343-380.
- POMP, D.; GOOD, B. A.; GEISERT, R. D.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1408-1415, 1995.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Ameaças à Diversidade Biológica. In: **Biologia da Conservação**. Londrina: Ed. Planta, 2001. p. 69-134.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PURRENHAGE, J. P.; NIEWIAROWSKI, P. H.; MOORE, F. B-G. Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 235-247, 2009.
- PYRI, S.; LUIKART, G.; COURNET, J-M. BOTTLENECK: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. **Journal of Heredity**, v. 4, p. 502-503, 1999.
- REEVE, H. K.; WESTNEAT, D. F.; NOON, W. A.; SHERMAN, P. W.; AQUADRO, C. F. DNA “fingerprinting” reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 2496-2500, 1990.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.
- ROGERS, D. S.; GONZÁLES, M. W. Phylogenetic relationships among spiny pocket mice (*Heteromys*) inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 4, p. 914-930, 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2001. p. 130-136.

- SAKKA, H.; QUÉRÉ, J. P.; KARTAVTSEVA, I.; PAVLENKO, M.; CHELOMINA, G.; ATOPKIN, D.; BOGDANOV, A.; MICHAUX, J. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure. **Biological of Linnean Society**, v. 100, p. 797-821, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 ed., 2001. 999 p.
- SAWAYA, R. J. **História natural e ecologia das serpentes de cerrado da região de Itirapina, SP**. 2003. 145p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.
- SILVA, D. A. Levantamento do meio físico das estações ecológica e experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 1, p. 113-128, 2005.
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservations in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. **Bioscience**, v. 52, n. 3, p. 225-233, 2002.
- SMITH, M. F.; PATTON, J. L. Variation in Mitochondrial Cytochrome b Sequence in Natural Populations of South American Akodontine Rodents (Muridae: Sigmodontinae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 85-103, 1991.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2001. p. 172-192.
- SUGG, D. W.; CHESSER, R. K.; DOBSON, F. S.; HOOGLAND, J. L. Population genetics meets behavioral ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, p. 338-342, 1996.
- SULLIVAN, J.; MARKERT, J. A.; KILPATRICK, C. W. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. **Systematic Biology**, v. 46, n. 3, p. 426-440, 1997.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** (In press), 2011.
- TELLES, M.; DIAS, M. Bird communities in two fragments of Cerrado in Brazil: a qualitative and quantitative survey. **Brazilian Journal of Biology**, (submitted), 2009.
- THOMAS, O. Notes on some South American mammals, with descriptions of new species. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 4, p. 230–242, 1909.
- THOMÉ, M. T. C. **Diversidade de anuros e lagartos em fisionomias de Cerrado na região de Itirapina, Sudeste do Brasil**. Dissertação de mestrado, Ecologia. Universidade de São Paulo, SP, 2006.
- VAN VUUREN, B. J.; KINET, S.; CHOPELET, J.; CATZEFLIS, F. Geographic patterns of genetic variation in four Neotropical rodents: conservation implications for small game mammals in French Guiana. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 81, p. 203–218, 2004.
- VIANNA, J. A.; BONDE, R. K.; CLARK, A.; CABALLERO, S.; GIRALDO, J. P.; LIMA, R. P.; MARMONTEL, M.; MORALES-VELA, B.; SOUZA, M. J.; PARR, L.; RODRÍGUEZ-LOPEZ, M. A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; POWELL, J. A.; SANTOS, F. R. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 433-447, 2006.
- VIEIRA, M. V. Dynamics of a Rodent Assemblage in a Cerrado of Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, n. 1, p. 99-107, 1997.
- VITOUSEK, P. M.; MOONEY, H. A.; LUBCHENCO, J.; MELILLO, J. M. Human domination of earth's ecosystems. **Science**, v. 277, p. 494-499, 1997.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- ZANCHETTA, D.; DINIZ, F. V. Estudo da contaminação biológica por *Pinus* spp. em três diferentes áreas na estação ecológica de Itirapina (SP, Brasil). **Revista do Instituto Florestal**, v. 18, p. 1-14, 2006.

- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16. 2002.
- ZEYL, E.; AARS, J.; EHRICH, D.; WIIG, Ø. Families in space: relatedness in the Barents Sea population of polar bears (*Ursus maritimus*). **Molecular Ecology**, v. 18, p. 735–749, 2009.

## APÊNDICES

### Apêndice A. Distâncias genéticas calculadas através do método K2P (Kimura 2-parameters) no programa Mega 5.0.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	Itirapina_10_SP																					
2	Itirapina_15_SP	0,004																				
3	Itirapina_16_SP	0,000	0,004																			
4	Itirapina_17_SP	0,000	0,004	0,000																		
5	Itirapina_38_SP	0,000	0,004	0,000	0,000																	
6	Itirapina_39_SP	0,004	0,008	0,004	0,004	0,004																
7	Aguas_Emendadas_1200_DF	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041															
8	Aguas_Emendadas_1540_DF	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,000														
9	Fazenda_Jatobá_1624_BA	0,045	0,050	0,045	0,045	0,045	0,050	0,016	0,016													
10	Caldas_Novas_2073_GO	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,008	0,008	0,008												
11	Caldas_Novas_2074_GO	0,041	0,045	0,041	0,041	0,041	0,045	0,012	0,012	0,012	0,004											
12	Caldas_Novas_2075_GO	0,045	0,050	0,045	0,045	0,045	0,050	0,016	0,016	0,016	0,008	0,004										
13	Caldas_Novas_2078_GO	0,045	0,050	0,045	0,045	0,045	0,050	0,016	0,016	0,016	0,008	0,004	0,008									
14	Caldas_Novas_2079_GO	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,008	0,008	0,008	0,000	0,004	0,008	0,008								
15	PN_Emas_2151_GO	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,008	0,008	0,008	0,000	0,004	0,008	0,008	0,000							
16	Serra_Canastra_2352_MG	0,041	0,045	0,041	0,041	0,041	0,045	0,020	0,020	0,020	0,012	0,016	0,020	0,020	0,012	0,012						
17	Pantanal_2_MS	0,045	0,050	0,045	0,045	0,045	0,050	0,041	0,041	0,041	0,033	0,037	0,041	0,041	0,033	0,033	0,037					
18	Pantanal_3_MS	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,032	0,032	0,033	0,024	0,028	0,033	0,033	0,024	0,024	0,028	0,016				
19	Pantanal_4_MS	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,024	0,024	0,024	0,016	0,020	0,024	0,024	0,016	0,016	0,028	0,016	0,008			
20	Pantanal_5_MS	0,037	0,041	0,037	0,037	0,037	0,041	0,024	0,024	0,024	0,016	0,020	0,024	0,024	0,016	0,016	0,028	0,016	0,008	0,000		
21	Pantanal_6_MS	0,041	0,045	0,041	0,041	0,041	0,045	0,024	0,024	0,028	0,020	0,024	0,028	0,028	0,020	0,020	0,033	0,020	0,012	0,004	0,004	
22	<i>Euryzgomatomys spinosus</i>	0,129	0,134	0,129	0,129	0,129	0,134	0,123	0,123	0,139	0,129	0,134	0,139	0,139	0,129	0,129	0,114	0,139	0,138	0,138	0,138	0,133
23	<i>Capromys pilorides</i>	0,185	0,190	0,185	0,185	0,185	0,190	0,174	0,174	0,185	0,180	0,175	0,180	0,180	0,180	0,175	0,196	0,180	0,190	0,190	0,185	
24	<i>Ctenomys haigi</i>	0,227	0,233	0,227	0,227	0,227	0,233	0,232	0,232	0,244	0,238	0,233	0,238	0,238	0,238	0,238	0,239	0,244	0,233	0,244	0,244	0,238
25	<i>Octodon degus</i>	0,211	0,216	0,211	0,211	0,211	0,216	0,238	0,238	0,244	0,238	0,232	0,238	0,238	0,238	0,238	0,238	0,211	0,221	0,227	0,227	0,233

**Apêndice B.** Valores de significância ( $p$ ) para desequilíbrio de ligação entre pares de locos.

<b>Loco #1</b>	<b>Loco #2</b>	<b>Valor <math>p</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>
Cbi06	Cbi07	1,0000	0,0000
Cbi06	Cbi08	0,6218	0,0036
Cbi07	Cbi08	0,0575	0,0010
Cbi06	Cbi11	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi11	0,2642	0,0023
Cbi08	Cbi11	0,8276	0,0015
Cbi06	Cbi12	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi12	0,5529	0,0013
Cbi08	Cbi12	0,9377	0,0005
Cbi11	Cbi12	0,7722	0,0010
Cbi06	Cbi14	0,6054	0,0034
Cbi07	Cbi14	0,7347	0,0016
Cbi08	Cbi14	0,5669	0,0018
Cbi11	Cbi14	0,0512	0,0009
Cbi12	Cbi14	0,5718	0,0011
Cbi06	Cbi15	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi15	0,6999	0,0030
Cbi08	Cbi15	0,6851	0,0026
Cbi11	Cbi15	0,2256	0,0028
Cbi12	Cbi15	0,3148	0,0016
Cbi14	Cbi15	0,1058	0,0016
Cbi06	Cbi16	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi16	0,6026	0,0034
Cbi08	Cbi16	0,5666	0,0029
Cbi11	Cbi16	1,0000	0,0000
Cbi12	Cbi16	0,1000	0,0009
Cbi14	Cbi16	0,5229	0,0028
Cbi15	Cbi16	1,0000	0,0000
Cbi06	Cbi17	0,0909	0,0013
Cbi07	Cbi17	0,9311	0,0006
Cbi08	Cbi17	0,9573	0,0004
Cbi11	Cbi17	0,2088	0,0012
Cbi12	Cbi17	0,1010	0,0005
Cbi14	Cbi17	0,2891	0,0011
Cbi15	Cbi17	0,0431	0,0007
Cbi16	Cbi17	0,9602	0,0005
Cbi06	Cbi18	0,4522	0,0040
Cbi07	Cbi18	0,1633	0,0018
Cbi08	Cbi18	0,0560	0,0009
Cbi11	Cbi18	0,9483	0,0008
Cbi12	Cbi18	0,8930	0,0006
Cbi14	Cbi18	0,8651	0,0012
Cbi15	Cbi18	1,0000	0,0000
Cbi16	Cbi18	1,0000	0,0000
Cbi17	Cbi18	0,9425	0,0005
Cbi06	Cbi07	1,0000	0,0000
Cbi06	Cbi08	0,6218	0,0036
Cbi07	Cbi08	0,0575	0,0010
Cbi06	Cbi11	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi11	0,2642	0,0023
Cbi08	Cbi11	0,8276	0,0015
Cbi06	Cbi12	1,0000	0,0000
Cbi07	Cbi12	0,5529	0,0013
Cbi08	Cbi12	0,9377	0,0005
Cbi11	Cbi12	0,7722	0,0010



## ANEXOS

**Anexo A.** Esquema de amplificação utilizando o *primer* universal M13. Modificado de Schuelke (2000).

