



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

Análise da diversidade e estrutura genético-populacional de *Didelphis albiventris* no Parque Estadual Morro do Diabo e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes.

ELIANA MICHELLE PAVIOTTI FISCHER

SÃO CARLOS, SP

2012

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

Análise da diversidade e estrutura genético-populacional de *Didelphis albiventris* no Parque Estadual Morro do Diabo e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes.

ELIANA MICHELLE PAVIOTTI FISCHER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

SÃO CARLOS, SP

2012

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

F529ad

Fischer, Eliana Michelle Paviotti.

Análise da diversidade e estrutura genético-populacional de *Didelphis albiventris* no Parque Estadual Morro do Diabo e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes. / Eliana Michelle Paviotti Fischer. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
46p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Conservação. 2. Diversidade genética. 3. Microssatélites. 4. Habitat (Ecologia) - fragmentação. 5. Gambá. I. Título.

CDD: 574.5247 (20^a)

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

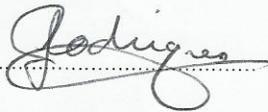
“Análise da diversidade e estrutura genético-populacional de *Didelphis albiventris* no Parque Estadual Morro do Diabo e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes”

ELIANA MICHELLE PAVIOTTI FISCHER

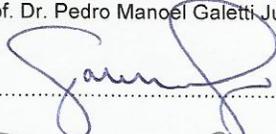
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Submetida à defesa pública no dia 17/02/2012, tendo sido
aprovada

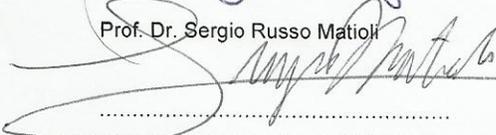
Presidente: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues



Membros: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior



Prof. Dr. Sergio Russo Matoli

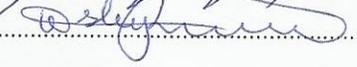


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 260 Reunião Ordinária da CPG, em 08/03/2012

Presidente: 

Membros: 

.....

.....

.....

SÃO CARLOS – SP
2012

Dedico esse trabalho ao meu
marido Marcelo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Fernando Pacheco Rodrigues, pela oportunidade, paciência e orientação.

Ao Professor Pedro Manoel Galetti Jr. pelo suporte para que este trabalho fosse realizado.

À Professora Patrícia Domingues de Freitas pelo apoio nos momentos difíceis.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus companheiros de laboratório pela amizade, por compartilharem seus conhecimentos e por fazerem do nosso ambiente de trabalho um verdadeiro lar. Gostaria de agradecer a cada um de vocês individualmente, mas como somos muitos, deixo aqui o meu muito obrigada!

À Karen por ter sido a melhor companheira de disciplina que eu poderia ter, e acima de tudo, minha grande amiga.

À Carol por ter me ensinado os primeiros passos de uma área que pretendo seguir por toda a minha vida. Carol, levarei seu jeitinho de preparar PCRs para sempre!

À Alline Braga e à Niara pela disposição em ajudar. Este trabalho tem um pouco da lógica de cada uma de vocês!

À minha família por terem me ensinado a amar os animais. À minha mãe pelos mimos, ao meu pai por ter me ensinado a valorizar as coisas simples da vida e a minha irmã pela companhia em todos os momentos.

Por fim, à família que escolhi, ou seja, meu marido Marcelo, por abrir mão da minha companhia, muitas vezes de sua própria felicidade para que eu pudesse seguir em frente. Obrigada meu amor!

*Tenho em mim a explosão de ser Bióloga
A admiração e gratidão pelos animais
Que fazem por mim
Muito mais do que posso fazer por eles.
Sou Bióloga de mar, de ar, de terra.
Sou bióloga de canto, de comportamento, de sentimento.
Sou de alma e dor pela arrogância humana.
Sou a fé, porque dos olhos de pequenos indivíduos,
Aprendo a amar e sentir a perda sem nem mesmo sabê-la.
Sou a incoerência de ser humana e vergonha por sê-la,
Porque no ser que sou, ainda me resta ser menos
Do que tudo que prometi proteger.*

Camila Silveira de Paula

RESUMO

A destruição dos ecossistemas e sua fragmentação representam grandes problemas ambientais, sendo a conservação da biodiversidade um dos maiores desafios da atualidade. Tais processos resultam na redução e isolamento das populações, podendo colocar em risco a fauna e a flora, já que nesta situação suas populações tornam-se mais suscetíveis aos efeitos negativos de uma série de fenômenos ambientais, demográficos e genéticos. Diante disso, para que ações efetivas de conservação sejam realizadas é necessário considerar a biodiversidade em todos os seus níveis, desde o nível genético, até o de espécies e de ecossistema. Para auxiliar nos programas de conservação, a Genética da Conservação utiliza métodos moleculares em estudos de padrões de variação genética, indicando não apenas quais espécies merecem maiores esforços de preservação, mas também contribuindo para a avaliação da viabilidade de uma população. Este estudo avaliou a diversidade e estrutura genética do marsupial *Didelphis albiventris* no Parque Estadual do Morro do Diabo e em fragmentos de Mata Atlântica adjacentes. Para isso, utilizamos um conjunto de oito locos microssatélites polimórficos desenvolvidos para a espécie *D. virginiana*, em um total de 120 indivíduos amostrados. Os resultados indicaram altos índices de diversidade genética, com valores médios iguais à 10,87 alelos por loco, heterozigosidade observada de 0,823 e esperada de 0,798. Não foi detectada a presença de alelos nulos. O valor médio de F_{IS} foi -0,033, e todos os locos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Análises sobre a estruturação populacional através dos cálculos de F_{ST} indicaram uma leve estruturação entre a maioria das populações amostradas, o que foi corroborado através da utilização do programa STRUCTURE, o qual apontou a existência de 4 agrupamentos genéticos. Diante destes resultados, acreditamos que na área amostrada, *D. albiventris* constitui uma metapopulação.

ABSTRACT

The destruction of ecosystems and their fragmentation are major environmental problems, being biodiversity conservation one of the biggest challenges today. These processes result in the reduction and isolation of populations, threatening the fauna and flora, since in this situation as their populations become more susceptible to negative effects caused by a series of environmental, demographic and genetic factors. Therefore, it is necessary to consider the biodiversity in all its levels, from the genetic level, to the species and ecosystem for effective actions in conservation. To assist in conservation programs, conservation genetics uses molecular methods in studies of patterns of genetic variation, indicating not only which species deserve greater efforts in conservation, but also contributing to the assessment of the variability of a population. This study evaluated the genetic diversity and structure of the marsupial *Didelphis albiventris* at the Morro do Diabo State Park and six adjacent forest fragments. We utilize a set of eight polymorphic microsatellite loci developed for the species *D. virginiana*, for a total of 120 individuals sampled. The results indicated high levels of genetic diversity, with values equal to 10,87 alleles per locus, observed heterozygosity of 0,823 and heterozygosity expected of 0,798. We did not detect presence of null alleles. The average value of F_{is} was -0,033 and all loci were in Hardy-Weinberg equilibrium. Analyses on the population structure through calculations of F_{ST} indicated a slight structure in the populations sampled, which was corroborated by the program STRUCTURE, which indicated the existence of four populations. Given these results, we believe that in the area sampled, *D. albiventris* constitutes a metapopulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das áreas amostradas, com o seu tamanho e distância em relação ao Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), e o número total de amostras de <i>D. albiventris</i> disponíveis em cada uma das áreas avaliadas.....	21
Tabela 2 – Características dos locos utilizados nos estudos populacionais. Faixa de tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de base, pb), temperatura de anelamento (Ta) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC).....	24
Tabela 3 – Frequência dos alelos encontrados em <i>Didelphis albiventris</i> por localidade e por loco. Os alelos estão designados de acordo com o seu tamanho em pares de base.....	25
Tabela 4 – Medidas de diversidade genética para 8 locos microssatélites em população estudada de <i>Didelphis albiventris</i>	28
Tabela 5 – Diversidade genética de populações de <i>Didelphis albiventris</i> , obtida através de oito locos microssatélites.....	32
Tabela 6 - Valores de F_{ST} (abaixo à esquerda) e de p (acima à direita) entre os pares de subpopulações de <i>Didelphis albiventris</i>	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Didelphis albiventris</i>	16
Figura 2 - Distribuição original da Mata Atlântica e seus remanescentes.....	18
Figura 3 - Mapa do Brasil evidenciando o estado de São Paulo e a região do Pontal do Paranapanema em verde.	19
Figura 4 - Mapa confeccionado com base na imagem do satélite Landsat-5 (1997) mostrando o Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) e os fragmentos florestais remanescentes na região do Pontal do Paranapanema. As áreas amostradas estão numeradas de 1 a 9.	20
Figura 5 - Distribuição das frequências alélicas para cada loco.....	29
Figura 6 - Resultado da análise de estruturação populacional em <i>D. albiventris</i> obtido com o programa Structure para $k=4$	33
Figura 7 - Resultados das estimativas de $\ln(p(x k))$ versus o número de agrupamentos k	33
Figura 8 - Estimativa do número de agrupamentos (k) de acordo com o método de Evanno <i>et al.</i> (2005).	33

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	13
1.1.	Consequências genéticas da fragmentação de habitats	13
1.2.	Marcadores microssatélites	15
1.3.	<i>Didelphis albiventris</i> (Lund, 1841) (Marsupialia, Didelphidae).....	15
1.4.	A Mata Atlântica	17
1.5.	O Pontal do Paranapanema	18
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3.	Material e métodos	19
3.1.	Área de estudo e obtenção das amostras	20
3.2.	Extração de DNA	21
3.3.	Padronização das reações	21
3.4.	Análise dos dados.....	22
3.4.1.	Diversidade genética.....	22
3.4.2.	Estrutura populacional	23
4.	Resultados	24
4.1.	Transferência dos <i>primers</i> heterólogos	24
4.2.	Desequilíbrio de ligação e diversidade genética	24
4.3.	Diversidade genética populacional.....	31
4.4.	Estrutura populacional.....	32
5.	Discussão.....	33
5.1.	Transferência de <i>primers</i> heterólogos	33
5.2.	Diversidade genética	34
5.3.	Estrutura populacional.....	34
5.4.	Efeitos genéticos da fragmentação em populações de marsupiais com diferentes histórias de vida	36
5.5.	Implicações para a conservação	37
6.	Conclusões	38
7.	Referências bibliográficas	38
	Apêndice A. Sequência dos <i>primers</i> utilizados, tipo de repetição do microssatélite flanqueado (em pares de base, pb). Fike et al. 2009 (Modificado).....	46

1. Introdução

Nos últimos anos, muito tem se discutido sobre o valor da biodiversidade e a necessidade de preservá-la (Alho, 2008). Atividades antrópicas provocaram a destruição e fragmentação de habitats, resultando na descontinuidade de recursos e condições ambientais, e em última análise, na grande perda de diversidade biológica.

Para direcionar os esforços conservacionistas, a IUCN, União Internacional para Conservação da Natureza, propõe a conservação da biodiversidade em três níveis: (i) diversidade de genes; (ii) diversidade de espécies; e (iii) diversidade de ecossistemas (McNeely *et al.*, 1990). Estes se relacionam de forma que a diversidade de um nível contribui com aquele dos demais. A diversidade de genes, por exemplo, influencia o nível de espécie através da perda de variabilidade genética, reduzindo a capacidade de adaptação das espécies diante de alterações ambientais, podendo levá-las à extinção (Frankham, 2005); da mesma forma, impactos na diversidade genética atuam no nível ecossistêmico, influenciando a sobrevivência, função e diversidade dos ecossistemas (Reusch *et al.*, 2005; Crutsinger *et al.*, 2006).

Neste cenário, a Genética da Conservação surge como uma ciência aplicada, que usa a teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção de espécies ameaçadas, tendo como objetivo de longo prazo preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2008). Essa ciência, relativamente nova, utiliza métodos moleculares em estudos de padrões de variação genética para auxiliar nos programas de conservação, indicando não apenas quais espécies merecem maiores esforços de preservação, mas também contribuindo para a avaliação da viabilidade de uma população natural (Johnson *et al.*, 2001).

1.1. Consequências genéticas da fragmentação de habitats

A fragmentação de habitats consiste na transformação de uma área natural contínua em uma paisagem formada por manchas do habitat original, envoltas por áreas modificadas de várias formas, denominadas matrizes.

Como atualmente áreas fragmentadas são as únicas disponíveis para muitos organismos, é preciso entender como diferentes espécies respondem ao processo de fragmentação, pois a reposta dependerá de características particulares das mesmas. Enquanto algumas espécies são impactadas negativamente pela fragmentação de habitat, outras são até favorecidas pelo processo. Animais de grande porte, por exemplo, principalmente os predadores de topo de

cadeia alimentar, necessitam de grandes áreas de vida para suprirem uma alta demanda energética, sendo frequentemente os primeiros a desaparecerem em ambientes perturbados (Lovejoy et al., 1986; Chiarello, 1999). Por outro lado, fragmentos de habitat exercem função importante na conservação de organismos que se locomovem amplamente pela paisagem e para uma gama de espécies que toleram algum nível de perturbação humana (Schelhas, 1996; Viana & Tabanez, 1996; Daily *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003). Além dos fragmentos, as matrizes são essenciais para a permanência das espécies em ambientes fragmentados, atuando de forma seletiva, permitindo ou dificultando o movimento de indivíduos de diferentes espécies entre os fragmentos (Laurence, 1994; Gascon & Lovejoy, 1998). As matrizes alteram a distribuição de recursos, limitando a conectividade entre populações (Kindlmann & Burel, 2008). A ausência da conectividade, por sua vez, leva à redução e isolamento dessas populações, tornando-as mais suscetíveis aos efeitos negativos dos seguintes fenômenos: (i) ambientais: relacionados às flutuações no ambiente, como secas prolongadas e incêndios; (ii) demográficos: referentes às alterações nas taxas de natalidade, mortalidade e de reprodução ou das razões sexuais; e (iii) genéticos: referentes às alterações genéticas populacionais, como mudanças nas frequências alélicas e genotípicas (Frankham *et al.*, 2002; Fahrig, 2003).

Dentre os fenômenos genéticos, um dos mais preocupantes é a perda de diversidade genética, sendo a deriva genética sua principal causa. A deriva genética é caracterizada pela variação aleatória das frequências alélicas ao longo das gerações, podendo provocar a eliminação ou fixação casual de um alelo, independentemente de seu coeficiente seletivo (Allendorf & Luikart, 2007).

Além disso, a redução do tamanho populacional em ambientes fragmentados aumenta a probabilidade de acasalamentos endogâmicos, promovendo alteração das frequências genotípicas. Nestas populações o número de indivíduos homozigotos aumenta em detrimento ao número de heterozigotos. O aumento de homozigose ocorre inclusive para alelos deletérios, podendo levar à diminuição dos valores fenotípicos médios dos caracteres ligados à capacidade reprodutiva ou à eficiência fisiológica, fenômeno conhecido como depressão endogâmica (Falconer & Mackay, 1996).

Para amenizar os efeitos da deriva genética e do endocruzamento é preciso que ocorra a troca de genes entre populações, promovendo a homogeinização das mesmas (Seoane *et al.*, 2000). Dessa forma, o fluxo gênico, além da mutação, ajuda a manter a diversidade genética das populações naturais, tornando-as mais aptas diante de alterações ambientais.

1.2. Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites são ferramentas bastante robustas para se medir a diversidade genética de uma espécie em estudos de conservação (Selkoe & Toonen, 2006). Estes são chamados também de Sequências Simples Repetidas (“SSR – Simple Sequence Repeats”) (Litt & Luty, 1989), consistindo de sequências pequenas com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidas lado a lado (Chambers & MacAvoy, 2000). São hipervariáveis, codominantes e revelam variações de comprimento entre os alelos (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000). Como possuem elevado conteúdo de informação de polimorfismo, são ideais para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A metodologia de utilização de marcadores microssatélites baseia-se na amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) das sequências simples repetidas utilizando-se um par de *primers* de sequências complementares àquelas que as flanqueiam, sendo o desenvolvimento e isolamento dos locos para a construção dos *primers* a maior limitação ao uso desses marcadores (Zane *et al.*, 2002).

No entanto, além dos *primers* espécie-específico, a utilização de *primers* heterólogos é uma alternativa para a amplificação de microssatélites na falta de *primers* desenvolvidos para a espécie estudada. Os *primers* heterólogos são marcadores desenvolvidos para determinada espécie, mas que funcionam adequadamente em espécies filogeneticamente próximas. Em alguns casos, entretanto, o uso de *primers* heterólogos pode levar a uma redução no número de *loci* polimórficos e presença de alelos nulos (não amplificados devido a mutações nas regiões flanqueadoras) (Dakin & Avise, 2004).

Para o gênero *Didelphis*, 21 marcadores microssatélites polimórficos foram isolados para a espécie *Didelphis virginiana* (Fike *et al.*, 2009) e 10 locos para a espécie *Didelphis marsupialis* (Lavergne *et al.*, 1999). Como não foram desenvolvidos, até o momento, *primers* para a espécie *Didelphis albiventris*, neste trabalho, utilizamos *primers* heterólogos desenvolvidos para a espécie *Didelphis virginiana*.

1.3. *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) (Marsupialia, Didelphidae)

Nome comum: gambás, saruês ou cassacos



Figura 1: *Didelphis albiventris*. (Foto: Flávia S. Rocha)

Os animais popularmente conhecidos como gambás são representados por seis espécies pertencentes à família Didelphidae: *D. albiventris*, *D. imperfecta*, *D. pernigra*, *D. aurita*, *D. marsupialis* e *D. virginiana* (Wilson & Reeder, 2005). Destas, apenas *D. virginiana* ocorre na América do Norte, enquanto as demais se distribuem pela América do Sul (Gardner, 1973, Cerqueira & Lemos, 2000; Lemos & Cerqueira, 2002; Brown, 2004; Gardner, 2005).

Dentre as espécies citadas, *D. albiventris*, conhecida como gambá-de-orelha-branca, representa uma das espécies mais comuns de marsupiais, sendo encontrada com frequência em áreas antropizadas (Cerqueira, 1985). Amplamente distribuída pela região neotropical, há registros da espécie nas porções leste e centro-oeste do Brasil, no Paraguai, Uruguai, regiões norte e central da Argentina e no sul da Bolívia (Lemos & Cerqueira, 2002). Embora *D. marsupialis* seja a espécie substituta de *D. albiventris* na Floresta Amazônica, estudos relatam a presença desta última na Floresta Amazônica peruana (Brown, 2004, Díaz, 2004). Na Mata Atlântica do litoral, *D. albiventris* é substituída por *D. aurita* (Cerqueira, 1985).

Espécimes de *D. albiventris* pesam entre 500 e 2750 gramas, com comprimento do corpo entre 305 e 437 mm e comprimento da cauda entre 290 e 430 mm (Emmons & Feer, 1997; Cáceres & Monteiro-Filho, 1999; Rossi *et al.*, 2006); a pelagem do dorso e das laterais é preta com a base branca evidenciando pelos brancos sobressalentes; o ventre é branco, cinza ou amarelado; a cabeça é branca com faixas negras que se estendem da orelha através dos olhos em direção ao focinho, com uma coroa negra que se afila na altura dos olhos; as orelhas possuem a base preta e a ponta branca e a cauda, usualmente menor do que o comprimento do corpo e cabeça, é bicolorida e coberta de pelos em sua porção basal (Emmons & Feer, 1997) (Fig. 1). As fêmeas possuem uma bolsa bem desenvolvida (Nowak, 1999) na qual os recém-nascidos permanecem lactando por 70 a 100 dias, após cerca de 13 dias de gestação (Rossi *et al.* 2006). O tamanho médio das ninhadas varia entre 7 e 11 filhotes (Cáceres, 2000).

Possuem hábito solitário, exceto na época reprodutiva, que ocorre pelo menos uma vez ao ano, são noturnos, e a alimentação frugívora-onívora (Fonseca, *et al.*,1996) é composta basicamente por insetos, vermes, pequenos vertebrados e frutos; é principalmente terrestre, utilizando com razoável frequência tanto o solo quanto o sub-bosque e o subdossel/dossel das florestas (Vieira, 2006); habita florestas decíduas e abertas e áreas montanhosas (Cerqueira, 1985), florestas úmidas, cerrado, caatinga, chaco, matas de galeria, áreas de agricultura e áreas urbanas (Emmons & Feer, 1997), parecendo preferir as formações que apresentam algumas árvores. Além disso, é o único marsupial a ocorrer na floresta de eucaliptos, mostrando-se generalista e pioneiro, bem adaptado a ambientes instáveis e de matas secundárias (Charles-Dominique, 1983), estando presentes em fragmentos de habitat de tamanhos e graus variados de perturbação, conforme revisado por Fernandez & Pires (2006).

1.4. A Mata Atlântica

A Mata Atlântica é uma das formações florestais com maior biodiversidade e grau de endemismo do planeta, compondo um dos cinco principais *hotspots* mundiais (Myers *et al.*, 2000).

Cobrindo originalmente a faixa litorânea desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Fig. 2), é o ecossistema mais severamente afetado pela fragmentação (Brown & Brown, 1992), sendo considerada uma das grandes prioridades para a conservação da biodiversidade (Tabarelli *et al.* 2005).

Atualmente restam apenas 12% de sua cobertura original (Ribeiro *et al.* 2009), e destes, 13% se encontra concentrada em apenas três fragmentos nos estados das regiões Sul e Sudeste, recobrando parte da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Gomiero & Braga 2007), enquanto cerca de 83% dos demais fragmentos possuem tamanho inferior a 50 ha (Ribeiro *et al.*, 2009).

Dentre as fitofisionomias da Mata Atlântica, as Florestas Estacionais Semidecíduais foram as mais devastadas em toda a sua área de ocorrência natural, que abrange os estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Bahia (Durigan *et al.*, 2000). Esta formação vegetal é caracterizada por possuir altura média do estrato arbóreo entre 15 e 25 metros, apresentando uma cobertura arbórea de 70 a 95% na época da chuva, com graus variados de caducifolia na estação relativamente seca (Ribeiro & Walter, 1998).

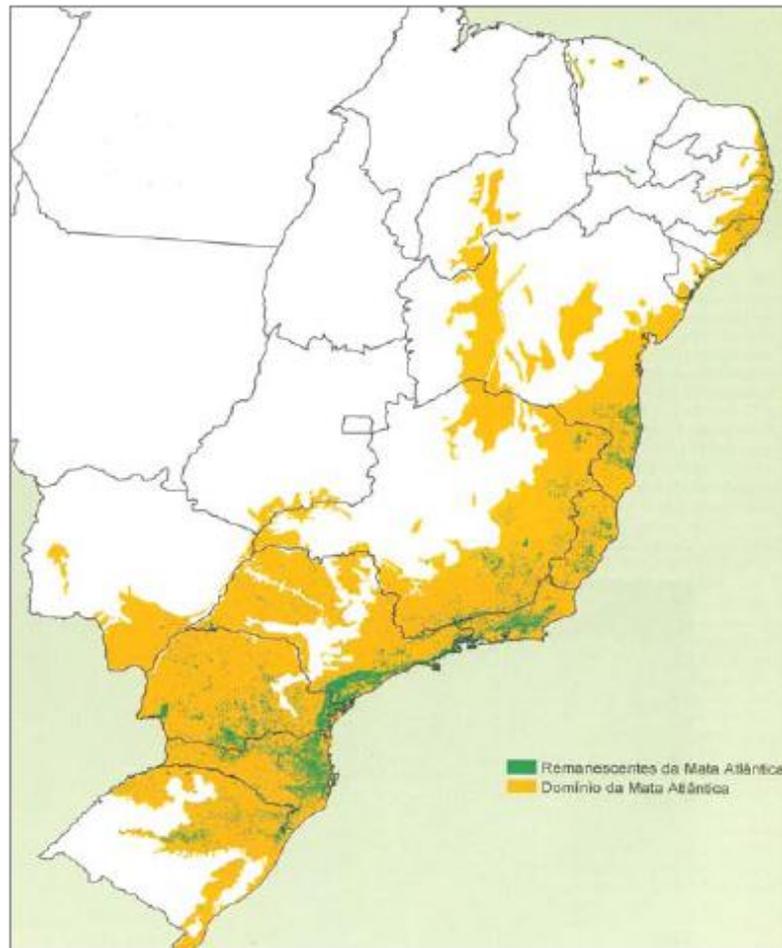


Figura 2 - Distribuição original da Mata Atlântica e seus remanescentes.
 Fonte: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar (2008).

1.5. O Pontal do Paranapanema

A região do Pontal do Paranapanema encontra-se dentro do domínio da Mata Atlântica e possui formação vegetal classificada como Floresta Estacional Semidecídua, também conhecida como “Mata Atlântica do Interior” (Ditt, 2002). O Pontal do Paranapanema está localizado no extremo oeste do estado de São Paulo, estando limitado ao norte pelo rio Paraná e ao sul pelo rio Paranapanema (Fig. 3). Essa região foi ocupada de forma desordenada a partir da década de 1950, resultando na drástica redução de sua cobertura florestal original (Valladares-Padua *et al.*, 2002). A implantação de latifúndios para a criação de gado e outras propriedades agrícolas de menor porte, de grandes usinas hidrelétricas, como Taquaruçu, Rosana e Porto Primavera, e a atuação do MST pela Reforma Agrária no Pontal do Paranapanema, dentre outros motivos, transformaram esta área originalmente homogênea em um mosaico de paisagens e feições regionais com marcantes diferenciações antrópicas (Passos, 2004).

Atualmente restam apenas 18,5% formação florestal original da área (Valladares-Pádua *et al.*, 2002), dos quais 36.000 ha estão protegidos pelo Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD), e aproximadamente 21000 ha encontram-se como fragmentos florestais distribuídos pela região. Os fragmentos remanescentes encontram-se cercados por uma matriz constituída principalmente por áreas de pastagens (58,0%) e agricultura (18,5%), como a cana-de-açúcar e algodão (Meneguette, 2001).



Figura 3 - Mapa do Brasil evidenciando o estado de São Paulo e a região do Pontal do Paranapanema em verde.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a diversidade genética e verificar a estrutura genético-populacional de *Didelphis albiventris* em habitat fragmentado.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de *primers* heterólogos na amplificação de marcadores do tipo microssatélites em *Didelphis albiventris*.
- Avaliar o efeito da fragmentação de habitat sobre a diversidade e estrutura genética de *Didelphis albiventris*, levando-se em consideração o tamanho dos fragmentos estudados e a distância em relação a uma área florestal contínua (Parque Estadual Morro do Diabo).

3. Material e métodos

3.1. Área de estudo e obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de tecido de orelha de 117 indivíduos da espécie *Didelphis albiventris*, entre os anos de 2002 e 2003 no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) e em mais seis fragmentos de mata do seu entorno: Ponte Branca (PB), Tucano (Tu), Santa Maria (SMa), Santa Mônica (SMo), Santa Tereza (STe) e São Sebastião (SSe) (Fig. 4). As áreas amostradas apresentam diferentes tamanhos (entre 30 e 1.990 hectares) e estão localizadas a distâncias que variam de 320 a 23.000 metros do PEMD (em linha reta), conforme apresentado na Tabela 1.

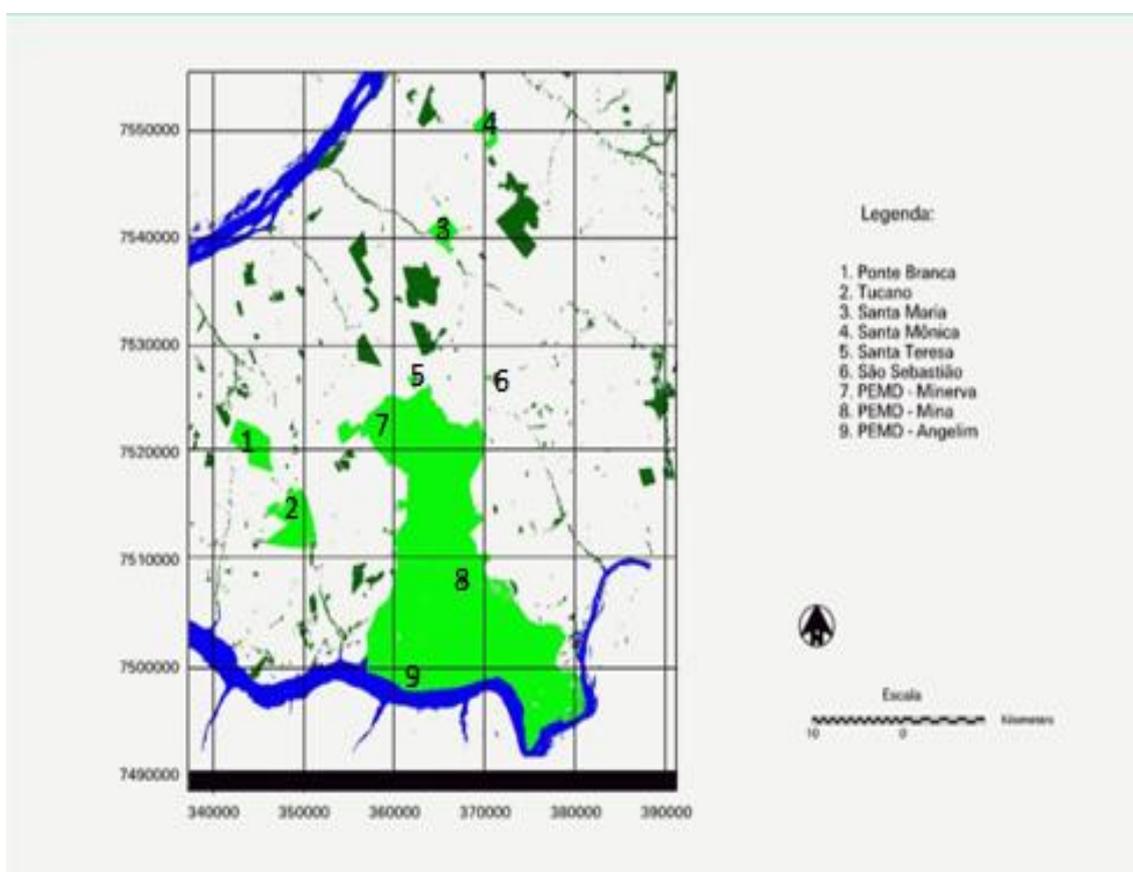


Figura 4 - Mapa confeccionado com base na imagem do satélite Landsat-5 (1997) mostrando o Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) e os fragmentos florestais remanescentes na região do Pontal do Paranapanema. As áreas amostradas estão numeradas de 1 a 9.

Áreas	Nº de Amostras	Tamanho (ha)	Distância (km)
01 – Ponte Branca	17	1195	7,9
02 – Tucano	14	1990	9
03 – Santa Maria	19	441	13,2
04 – Santa Mônica	18	584	23
05 – Santa Tereza	15	82,9	0,32
06 – São Sebastião	19	30,2	3
07 – PEMD – Minerva	5	---	---
08 – PEMD – Mina	4	---	---
09 – PEMD – Angelim	6	---	---
Total	117		

ha = hectare; km = quilômetros

Tabela 1 - Relação das áreas amostradas, com o seu tamanho e distância em relação ao Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), e o número total de amostras de *D. albiventris* disponíveis em cada uma das áreas avaliadas.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando-se o kit comercial “Quiagen DNeasy Extraction Kit”, seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria e diluídas em água numa solução de uso contendo aproximadamente 10 ng/μl de DNA.

3.3. Padronização das reações

Os pares de *primers* utilizados neste trabalho estão disponíveis na literatura e foram desenvolvidos para a espécie *Didelphis virginiana* por Fike *et al.* (2009) (Apêndice A). Foram testados 13 pares de *primers*, sendo a triagem e seleção dos marcadores realizada através da análise de 10 indivíduos. Os marcadores avaliados foram amplificados através da técnica de PCR utilizando-se a metodologia descrita por Schuelke (2000), a qual permite a obtenção de fragmentos marcados com fluorescência (FAM, HEX e TET). Para se determinar a temperatura de anelamento adequada para cada um dos locos testados, as PCRs realizadas durante a triagem foram feitas utilizando-se um gradiente de temperatura variando de 52°C à 64°C.

Após a triagem dos *primers* e determinação da temperatura de anelamento, os marcadores foram amplificados e utilizados para a análise das amostras selecionadas. Para as reações de PCR foram utilizados solução tampão 1x *Taq Buffer*, 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,06 μM de *primer forward*, 0,25 de *primer reverse*, 0,25 μM do *primer M13*,

0,75 U *Taq* Polimerase (Invitrogen-Platinum) e 30ng de DNA em um volume final de 15µl de reação.

O programa para a amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 3 ciclos de 30s à 94°C, 45s à temperatura de anelamento mais 3°C (*touch-down*—diminuição de 1°C a cada ciclo), 45 s à 72°C; 35 ciclos de 30 s à 94°C, 45 s à temperatura de anelamento (Tab. 2) de cada loco, 45 s à 72°C; 10 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 s, 45 s à 53°C (temperatura de anelamento do *primer* M13 marcado), 45 s à 72°C, finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 20 min.

Os fragmentos gerados nas reações de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para se estimar o tamanho aproximado dos fragmentos observados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1kb *Plus* (Invitrogen).

O processo de genotipagem foi realizado em sequenciador *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* de 96 capilares (*Amersham Biosciences*), utilizando-se o *software Fragment Profiler* versão 1.2 de mesmo fabricante.

3.4. Análise dos dados

3.4.1. Diversidade genética

A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foi testada utilizando-se o teste exato para desequilíbrio genotípico implementado pelo programa GENEPOP 4.0.7 (Rousset 2008). Este mesmo programa, juntamente com o FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) foi utilizado para calcular os índices de diversidade genética para o conjunto global de dados e por área amostrada. Calculamos o número de alelos por loco (A) e a sua média, a heterozigosidade esperada (diversidade gênica H_E) (Nei 1987), a heterozigosidade observada (H_O), a riqueza alélica (RA: estimativa do número de alelos por loco padronizado para amostras de tamanho desigual entre locais) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) (Weir and Cockerham, 1984). O conteúdo de informação polimórfica PIC (*Polymorphism Information Content*) (Botstein *et al.*, 1980) para cada loco foi calculado através do programa CERVUS 3.0.3 (Marshall, 1998, Kalinowski *et al.*, 2007). Segundo Botstein *et al.* (1980), marcadores com PIC superior a 0,50 são considerados muito informativos, com valor entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valor inferior a 0,25, pouco informativos.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados com o programa GENEPOP utilizando o algoritmo Cadeia de Markov e Montecarlo (MCMC) para deficiência de

heterozigotos. A correção de Bonferroni (Rice, 1989) foi realizada para corrigir o nível de significância estatística de nossas análises.

A ocorrência de alelos nulos, *allelic dropout* e *stutters bands* foi avaliada utilizando-se o *software Micro-Checker*, versão 2.2.3 (Oosterterhout *et al.*, 2004), enquanto a frequência de alelos nulos (r) para cada loco e população foi calculada utilizando a estimativa de máxima verossimilhança (Dempster *et al.*, 1977) implementada pelo programa FREENA (Chapuis & Stoup, 2007).

Para testar reduções recentes no tamanho efetivo populacional utilizamos o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996, Piry *et al.*, 1999). Com este programa calculamos a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de mutação-deriva (H_{eq}) para cada loco considerando o modelo de mutação *two-phase* (TPM), uma vez que tem sido demonstrado que a maioria dos microssatélites se encaixa melhor neste modelo de mutação em vez do modelo de alelos infinitos (IAM) ou o modelo de mutação *stepwise* (SMM) (Di Rienzo *et al.*, 1994, Piry *et al.*, 1999). A fim de lidar com a incerteza relacionada com a proporção de mudanças *stepwise* no TPM nós realizamos análises com mutações *stepwise* respondendo por 70, 75, 80, 90 e 95% de todas as mutações. Utilizamos o teste de Wilcoxon nas análises, já que este é adequado para análises com menos de 20 locos.

3.4.2. Estrutura populacional

Para as análises de estrutura populacional verificamos a diferenciação global e par-a-par entre áreas amostradas através das estimativas de F_{ST} (θ) de Weir & Cockerham (1984) utilizando o programa GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). A significância estatística dos valores obtidos foi avaliada utilizando-se o teste exato G para diferenciação genotípica implementado no mesmo software.

O programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.* 2000) também foi utilizado para detectar a estrutura genética populacional, e inferir o número provável de agrupamentos genéticos (K) existentes na amostragem. Este programa utiliza o método bayesiano de agrupamento, juntamente com o algoritmo Cadeia de Markov e Montecarlo (MCMC), tendo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações como premissa para a inferência do número de populações. Para as análises utilizamos o modelo *admixture*, que é adequado para populações que apresentam ou já apresentaram fluxo gênico, realizando seis corridas independentes para $K=1-7$ com 1.000.000 repetições da MCMC após um período de *burn-in* de 500.000 para cada corrida. O número provável de agrupamentos K foi identificado usando o valor máximo de $\ln(P(X|K))$ (probabilidade de

observar os dados (X) condicionada ao número de populações (K) retornado pelo programa. Além disso, avaliamos a distribuição de delta K , que se baseia na taxa de mudança no $\ln(P(X|K))$ entre sucessivos valores de K , como proposto por Evanno *et al.* (2005).

A ocorrência de isolamento por distância (IBD) foi avaliada utilizando o programa Genalex (Peakall & Smouse, 2006). A distância mínima entre áreas foi medida utilizando o Google Earth 5.0.1 (<http://earth.google.com>).

4. Resultados

4.1. Transferência dos *primers* heterólogos

Dos 13 locos inicialmente utilizados durante a triagem, 11 apresentaram produtos de amplificação consistentes quando visualizados em gel de agarose. No entanto, apenas nove locos amplificaram quando submetidos à metodologia descrita por Schuelke (2000), sendo que 8 destes foram utilizados para a condução dos estudos populacionais. Os valores de PIC calculados para estes oito locos variaram de 0,735 (OP36) a 0,899 (OP18). Todos os valores de PIC foram considerados muito informativos, uma vez que apresentaram valores superiores a 0,50. Na tabela 2 são listados os oito locos selecionados na triagem, com o tamanho dos fragmentos gerados, temperatura de anelamento e valores de PIC.

Tabela 2 - Características dos locos utilizados no estudo populacional. Faixa de tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de base, pb), temperatura de anelamento (T_a) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC).

Loco	Tamanho (pb)	T_a (°C)	PIC
OP18	267-319	54	0,899
OP19	234-256	60	0,849
OP34	220-264	56	0,757
OP36	162-190	54	0,735
OP39	227-283	52	0,819
OP42	257-289	54	0,835
OP46	179-215	52	0,771
OP48	203-247	54	0,740

4.2. Desequilíbrio de ligação e diversidade genética

Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os locos analisados. O número de alelos variou de oito (OP36) a 17 (OP18), com uma média de 10,87 alelos por loco. A tabela 3 apresenta a frequência de alelos por loco e população, destacando a presença de alelos exclusivos em todas as populações. Estes dados podem ser melhor visualizados na figura 5. A

heterozigosidade observada variou de 0,733 (OP46) a 0,910 (OP18), enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,744 (OP36) a 0,888 (OP18). Não foi detectado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum dos locos (Tab. 4). Os dados globais obtidos para diversidade genética foram: H_o : 0,827; H_e : 0,800; r : 0,010; F_{IS} : -0,033.

Tabela 3 - Frequência dos alelos encontrados em *Didelphis albiventris* por localidade e por loco. Os alelos estão designados de acordo com o seu tamanho em pares de base. Em negrito: alelos exclusivos.

Locus	Allele/n	PB	Tu	SMA	SMo	STe	SSe	PEMD
OP18	N	17	13	19	18	15	19	15
	267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,158	0,000
	269	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,033
	271	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000
	273	0,029	0,000	0,026	0,000	0,033	0,000	0,033
	275	0,000	0,038	0,000	0,028	0,200	0,000	0,067
	279	0,029	0,077	0,105	0,194	0,133	0,000	0,067
	281	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000
	283	0,147	0,154	0,158	0,222	0,100	0,026	0,067
	287	0,029	0,115	0,026	0,028	0,000	0,026	0,000
	291	0,000	0,000	0,079	0,056	0,067	0,053	0,100
	295	0,029	0,077	0,158	0,056	0,167	0,263	0,033
	299	0,294	0,077	0,132	0,000	0,100	0,053	0,200
	303	0,176	0,269	0,132	0,139	0,000	0,105	0,233
	307	0,118	0,038	0,053	0,111	0,033	0,158	0,000
	311	0,088	0,115	0,079	0,028	0,100	0,053	0,133
	315	0,029	0,038	0,000	0,083	0,000	0,026	0,000
	319	0,029	0,000	0,053	0,056	0,033	0,000	0,033
OP19	N	17	14	19	18	15	19	15
	234	0,000	0,000	0,079	0,028	0,033	0,000	0,000
	236	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,000
	238	0,029	0,000	0,105	0,000	0,033	0,000	0,033
	240	0,000	0,000	0,184	0,222	0,033	0,000	0,100
	242	0,059	0,214	0,000	0,000	0,167	0,105	0,067
	244	0,118	0,179	0,421	0,056	0,033	0,211	0,067
	246	0,235	0,179	0,105	0,194	0,067	0,211	0,367
	248	0,088	0,214	0,079	0,083	0,133	0,158	0,233
	250	0,294	0,071	0,026	0,278	0,333	0,237	0,067
	252	0,059	0,143	0,000	0,056	0,100	0,000	0,000
	254	0,059	0,000	0,000	0,083	0,067	0,000	0,067
	256	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 3 (continuação) - Frequência dos alelos encontrados em *Didelphis albiventris* por localidade e por loco. Os alelos estão designados de acordo com o seu tamanho em pares de base. Em negrito: alelos exclusivos.

Locus	Allele/n	PB	Tu	SMa	SMo	STe	SSe	PEMD
OP34	N	17	14	19	18	15	19	15
	220	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
	228	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000
	232	0,029	0,143	0,053	0,000	0,000	0,184	0,100
	236	0,265	0,071	0,132	0,389	0,100	0,211	0,167
	240	0,294	0,179	0,368	0,222	0,533	0,342	0,333
	244	0,265	0,429	0,211	0,250	0,167	0,105	0,200
	248	0,088	0,071	0,132	0,139	0,100	0,053	0,100
	252	0,059	0,071	0,079	0,000	0,033	0,026	0,067
	256	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,026	0,000
	264	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,033
OP36	N	17	14	19	18	15	19	15
	162	0,176	0,143	0,026	0,083	0,100	0,053	0,067
	166	0,029	0,036	0,000	0,083	0,000	0,053	0,000
	170	0,118	0,071	0,132	0,139	0,167	0,000	0,267
	174	0,441	0,143	0,447	0,528	0,367	0,368	0,133
	178	0,235	0,393	0,158	0,139	0,233	0,500	0,233
	182	0,000	0,107	0,132	0,000	0,100	0,026	0,167
	186	0,000	0,071	0,079	0,028	0,033	0,000	0,133
	190	0,000	0,036	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
OP39	N	17	14	19	18	15	19	15
	227	0,059	0,071	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000
	231	0,176	0,071	0,237	0,000	0,333	0,263	0,200
	235	0,118	0,179	0,184	0,278	0,000	0,132	0,167
	239	0,235	0,250	0,211	0,306	0,167	0,132	0,267
	243	0,059	0,214	0,368	0,222	0,167	0,000	0,133
	247	0,324	0,107	0,000	0,111	0,267	0,158	0,100
	251	0,000	0,036	0,000	0,056	0,000	0,184	0,067
	255	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,033
	267	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	279	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,033
	283	0,029	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000

Tabela 3 (continuação) - Frequência dos alelos encontrados em *Didelphis albiventris* por localidade e por loco. Os alelos estão designados de acordo com o seu tamanho em pares de base. Em negrito: alelos exclusivos.

Locus	Allele/n	PB	Tu	S _{Ma}	S _{Mo}	S _{Te}	S _{Se}	PEMD
OP42	N	17	14	19	18	15	19	15
	257	0,176	0,107	0,184	0,194	0,167	0,316	0,200
	261	0,118	0,214	0,105	0,139	0,000	0,026	0,033
	265	0,353	0,321	0,000	0,222	0,033	0,237	0,033
	269	0,000	0,071	0,026	0,028	0,200	0,026	0,067
	273	0,206	0,107	0,263	0,111	0,367	0,211	0,233
	277	0,000	0,107	0,211	0,083	0,033	0,184	0,100
	281	0,029	0,071	0,053	0,139	0,000	0,000	0,167
	285	0,118	0,000	0,158	0,056	0,100	0,000	0,167
	289	0,000	0,000	0,000	0,028	0,100	0,000	0,000
OP46	N	17	14	19	18	15	19	15
	179	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000
	183	0,029	0,000	0,000	0,028	0,100	0,000	0,000
	187	0,029	0,071	0,053	0,111	0,133	0,211	0,100
	191	0,118	0,179	0,105	0,222	0,067	0,053	0,167
	195	0,559	0,429	0,316	0,278	0,333	0,132	0,367
	199	0,088	0,179	0,368	0,111	0,100	0,474	0,100
	203	0,000	0,071	0,053	0,111	0,267	0,132	0,133
	207	0,176	0,036	0,105	0,056	0,000	0,000	0,100
	211	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
	215	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000
OP48	N	17	14	19	18	15	19	15
	203	0,294	0,036	0,132	0,056	0,233	0,105	0,033
	207	0,471	0,250	0,421	0,444	0,433	0,500	0,400
	211	0,029	0,107	0,132	0,028	0,033	0,184	0,067
	215	0,000	0,000	0,026	0,028	0,000	0,000	0,033
	219	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
	231	0,000	0,143	0,079	0,167	0,100	0,053	0,000
	235	0,000	0,179	0,000	0,028	0,000	0,053	0,167
	239	0,147	0,179	0,211	0,139	0,100	0,105	0,167
	243	0,029	0,071	0,000	0,111	0,100	0,000	0,067
	247	0,029	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033

O programa Microchecker não apontou a presença de alelos nulos *allelic dropout* ou *stutters*. A ausência de alelos nulos foi confirmada utilizando-se o programa FREENA através do qual obtivemos estimativas da frequência de alelos nulos (r) por loco variando de zero (OP46) a 0,029 (OP48) (Tab. 4).

Tabela 4 – Medidas de diversidade genética para oito locos microssatélites em população estudada de *Didelphis albiventris*.

Loco	Ponte Branca (n=17)								Tucano (n=14)								Santa Maria (n=19)							
	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r
OP18	17	11	9,577	0,882	0,859	-0,028	0,7680	0,000	14	10	10,000	0,929	0,826	-0,130	1,000	0,000	19	11	10,118	0,947	0,909	-0,043	0,841	0,000
OP19	17	10	9,134	0,706	0,848	0,102	0,192	0,016	14	6	5,997	1,000	0,849	-0,186	1,000	0,000	19	7	6,619	0,790	0,774	-0,021	0,117	0,028
OP34	17	6	5,705	0,824	0,784	-0,052	0,199	0,009	14	7	6,921	0,786	0,775	-0,014	0,413	0,000	19	7	6,561	1,000	0,797	-0,264	1,000	0,000
OP36	17	5	4,763	0,588	0,725	0,194	0,217	0,036	14	8	7,852	0,929	0,810	-0,154	0,978	0,000	19	7	6,339	0,842	0,752	-0,123	0,938	0,000
OP39	17	7	6,663	0,706	0,811	0,133	0,276	0,008	14	8	7,921	1,000	0,862	-0,167	1,000	0,000	19	4	4,000	0,526	0,750	0,304	0,007	0,131
OP42	17	6	5,762	0,882	0,797	-0,111	0,914	0,000	14	7	6,995	0,857	0,836	-0,026	0,635	0,000	19	7	6,583	0,895	0,835	-0,074	0,856	0,000
OP46	17	6	5,519	0,765	0,652	-0,178	0,965	0,000	14	7	6,852	0,786	0,767	-0,025	0,753	0,000	19	6	5,799	0,632	0,757	0,169	0,049	0,081
OP48	17	6	5,294	0,647	0,688	0,061	0,456	0,000	14	8	7,854	0,857	0,865	0,010	0,556	0,000	19	6	5,655	0,684	0,757	0,098	0,188	0,035
Média		7,125	6,552	0,750	0,771	0,018	0,442	0,009	8	7,549	0,893	0,824	-0,088	0,9963	0,000		7	6,459	0,789	0,791	0,002	0,273	0,034	
Loco	Santa Mônica (n=18)								Santa Teresa (n=15)								São Sebastião (n=19)							
	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r
OP18	18	11	9,931	0,833	0,887	0,063	0,191	0,015	15	11	10,450	0,933	0,906	-0,032	0,779	0,000	19	12	10,354	0,842	0,879	0,043	0,493	0,000
OP19	18	8	7,546	1,000	0,828	-0,200	1,000	0,000	15	10	9,438	0,867	0,848	-0,022	0,566	0,000	19	6	5,967	0,895	0,835	-0,074	0,840	0,000
OP34	18	4	3,999	0,833	0,738	-0,133	0,778	0,000	15	6	5,851	0,867	0,685	-0,277	0,998	0,000	19	9	7,636	0,790	0,809	0,025	0,236	0,006
OP36	18	6	5,687	0,722	0,687	-0,052	0,255	0,008	15	6	5,865	0,800	0,789	-0,015	0,328	0,003	19	5	4,496	0,842	0,624	-0,362	0,987	0,000
OP39	18	6	5,647	0,944	0,786	-0,209	0,961	0,000	15	5	4,986	0,733	0,784	0,067	0,359	0,007	19	7	6,674	0,947	0,848	-0,121	0,842	0,000
OP42	18	9	8,351	0,944	0,875	-0,082	0,913	0,000	15	7	6,731	0,733	0,802	0,089	0,400	0,000	19	6	5,368	0,790	0,785	-0,006	0,451	0,000
OP46	18	9	8,291	0,944	0,852	-0,112	0,954	0,000	15	6	5,984	0,600	0,802	0,259	0,061	0,090	19	5	4,903	0,737	0,713	-0,035	0,694	0,000
OP48	18	8	7,091	0,833	0,759	-0,102	0,908	0,000	15	6	5,864	0,667	0,752	0,117	0,391	0,000	19	6	5,799	0,737	0,707	-0,043	0,367	0,000
Média		8	7,068	0,882	0,802	-0,102	0,982	0,003	7	6,896	0,775	0,796	0,027	0,337	0,012		7	6,400	0,822	0,775	-0,063	0,848	0,001	
PEMD (n=18)																								
Loco	N	A	RA	H _o	H _e	F _{IS}	P	r																
OP18	15	11	10,424	0,933	0,888	-0,051	0,577	0,000																
OP19	15	8	7,811	0,800	0,810	0,012	0,577	0,000																
OP34	15	7	6,851	1,000	0,817	-0,224	1,000	0,000																
OP36	15	6	5,986	0,867	0,833	-0,040	0,707	0,000																
OP39	15	8	7,719	0,867	0,855	-0,014	0,335	0,029																
OP42	15	8	7,719	0,933	0,860	-0,086	0,538	0,000																
OP46	15	7	6,864	0,667	0,821	0,188	0,090	0,032																
OP48	15	9	8,439	0,800	0,798	-0,003	0,481	0,000																
Média	8	7,727	0,858	0,835	-0,028	0,618	0,008																	

N: tamanho da amostra; A: número de alelos; RA: riqueza alélica; H_o: heterozigosidade observada; H_e: diversidade gênica (Nei 1987); F_{IS}: coeficiente de endogamia; P: valores de significância de F_{IS}; r: frequência de alelos nulos. Em negrito, valores não significativos após a correção de Bonferroni ($\alpha = 0.006$).

Não foi encontrada evidência de gargalo populacional.

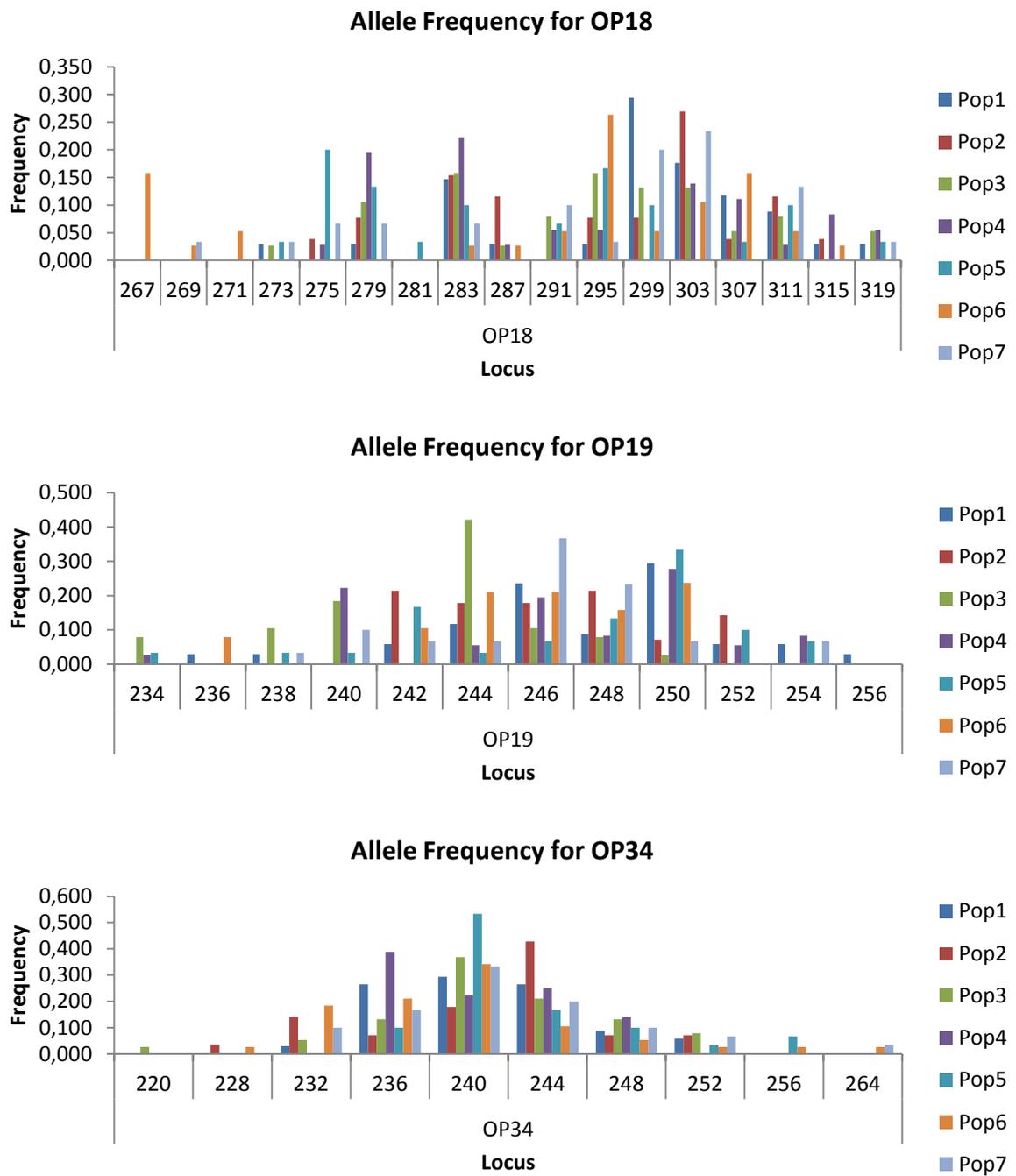


Figura 5 - Distribuição da frequência alélica para cada loco.

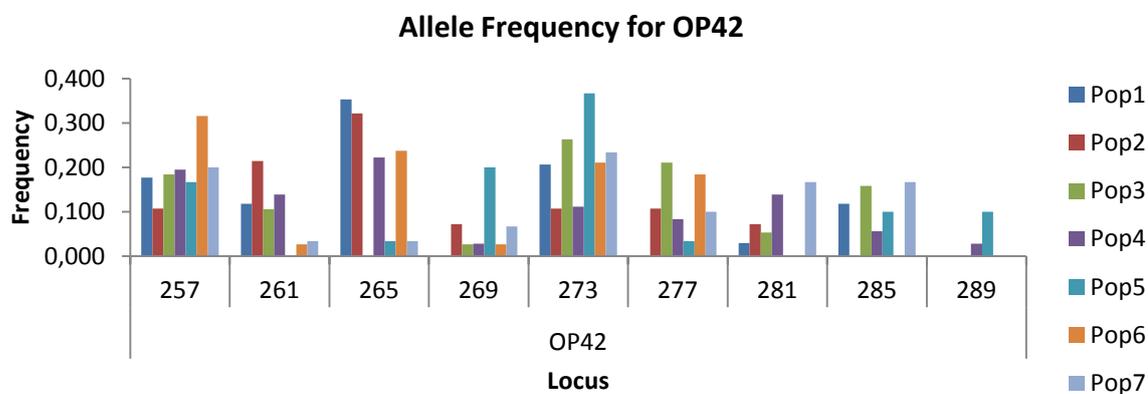
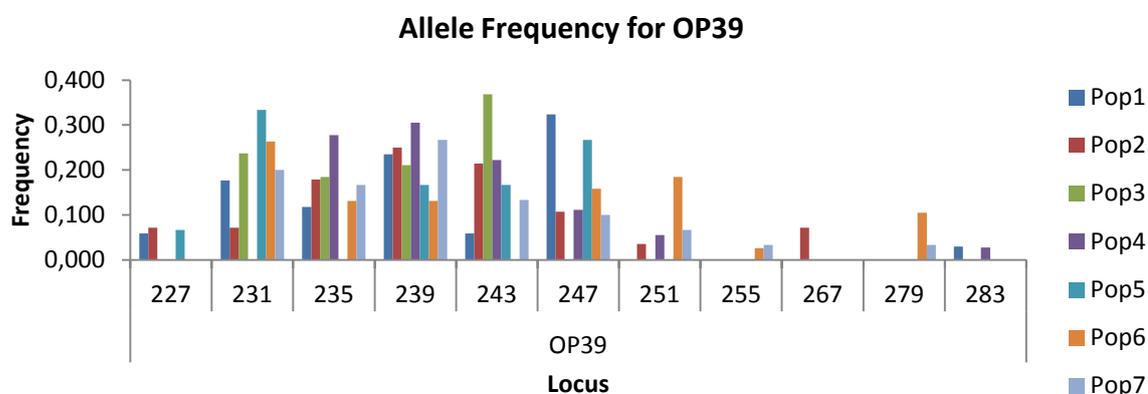
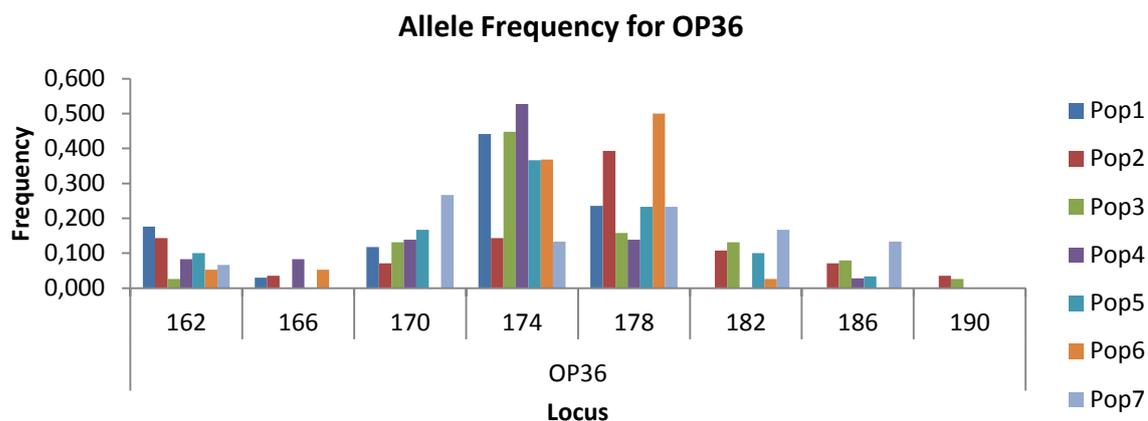


Figura 5 (continuação) - Distribuição da frequência alélica para cada loco.

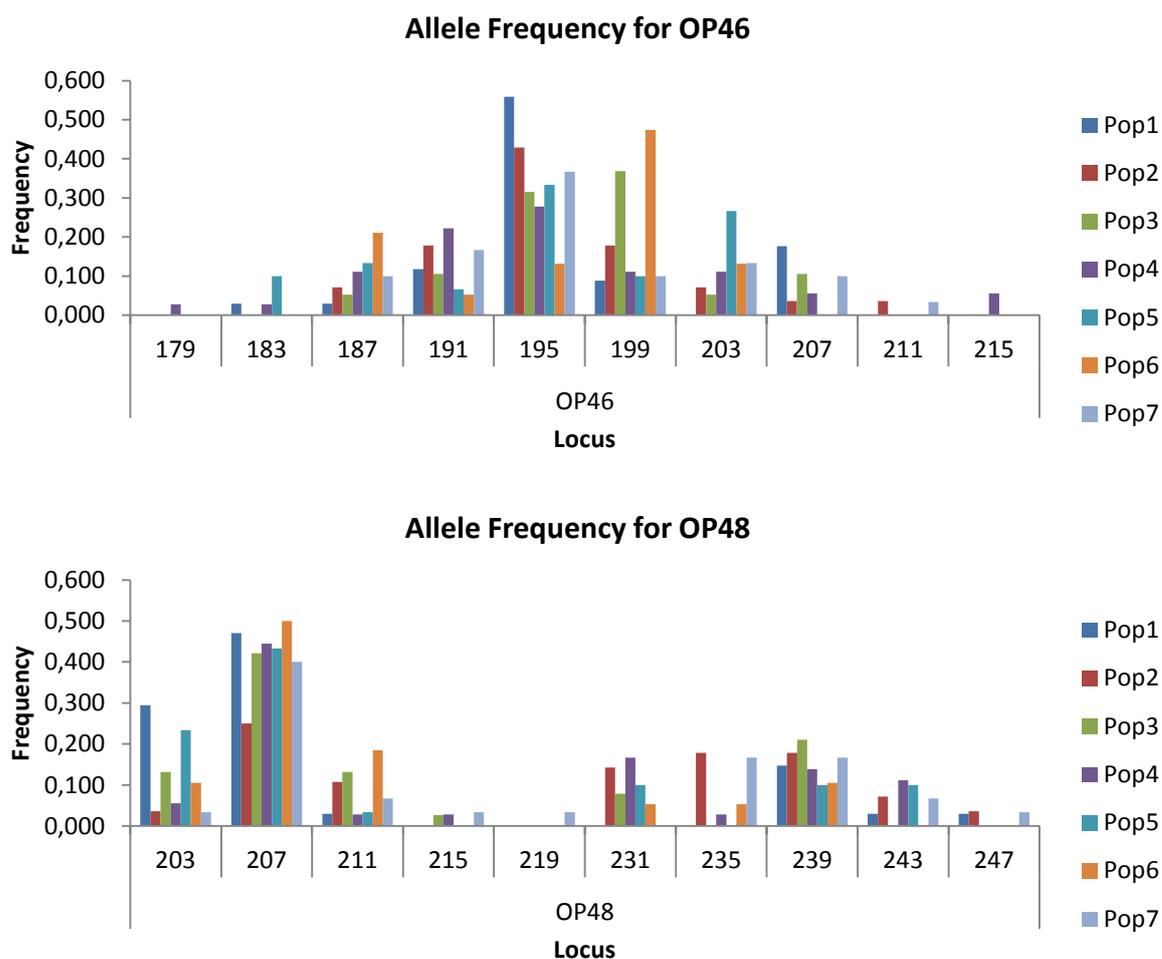


Figura 5 (continuação) - Distribuição da frequência alélica para cada loco.

4.3. Diversidade genética populacional

Considerando os oito locos, as análises realizadas por população revelaram que todas as áreas amostradas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tab. 6). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) variou entre -0,102 (SMo) a 0,027 (STe). A heterozigosidade observada variou de 0,750 (PB) a 0,893 (Tu), enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,771 (PB) a 0,835 (PEMD). A média estimada da frequência de alelos nulos variou de zero (Tu) a 0,034 (SMa). Outros valores de diversidade genética podem ser visualizados na tabela abaixo:

Tabela 5 - Diversidade genética de *Didelphis albiventris* nas áreas amostradas.

Área	A	RA	H_o	H_e	F_{IS}	P	r
Ponte Branca	7,125	6,552	0,750	0,771	0,018	0,442	0,009
Tucano	8,000	7,549	0,893	0,824	-0,088	0,996	0,000
Santa Maria	7,000	6,459	0,789	0,791	0,002	0,273	0,034
Santa Mônica	8,000	7,068	0,882	0,802	-0,102	0,982	0,003
Santa Teresa	7,000	6,896	0,775	0,796	0,027	0,337	0,012
São Sebastião	7,000	6,400	0,822	0,775	-0,063	0,848	0,001
PEMD	8,000	7,727	0,858	0,835	-0,028	0,618	0,008

A: número médio de alelos observado; RA: riqueza alélica; H_o : heterozigosidade observada; H_e : diversidade gênica (Nei 1987); F_{IS} : coeficiente de endogamia; P: valores de significância de F_{IS} ; r: frequência de alelos nulos.

4.4. Estrutura populacional

Os valores de F_{ST} variaram de 0,0131 (entre o PEMD e o fragmento Tucano) à 0,0582 entre os fragmentos Santa Mônica e São Sebastião. Os valores de significância (p) gerados pelo programa FSTAT apontam que a maioria das populações apresentam-se diferenciadas, apesar dos baixos valores de F_{ST} obtidos. O valor de F_{ST} não foi significativo apenas entre o PEMD e o fragmento Tucano. Os valores de F_{ST} e p para todos os pares de populações estão apresentados na tabela 7.

Tabela 6 - Valores de F_{ST} (abaixo à esquerda) e de p (acima à direita) entre os pares de subpopulações de *Didelphis albiventris*.

	1-PB	2-Tu	3-SMa	4-SMo	5-STe	6-SSe	7-PEMD
1-PB	----	0.0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0.0001
2-Tu	0,0300	---	0,0000	0.0001	0,0000	0,0000	0.0237
3-SMa	0,0473	0,0399	---	0,0000	0,0000	0,0000	0.0026
4-SMo	0,0251	0,0341	0,0343	---	0,0000	0,0000	0.0000
5-STe	0,0297	0,0527	0,0393	0,0449	---	0,0000	0,0004
6-SSe	0,0540	0,0500	0,0455	0,0582	0,0465	---	0,0000
7-PEMD	0,0266	0,0131	0,0234	0,0299	0,0251	0,0474	---

Valores significativos de F_{ST} ($\alpha = 0.006$ – após correção de Bonferroni).

Não foi encontrada correlação entre distância genética e geográfica (R=0,141, P=0,360).

Para as análises de estrutura populacional, consideramos, ainda, os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE. Apesar de visualmente podermos verificar uma baixa diferenciação entre a maioria das áreas estudadas (Fig. 6), o maior valor médio de LnP(D) fornecido por

este programa ($\text{LnP}(D) = -3776,23$), assim como a análise proposta por Evanno *et al.* (2005), indicam a existência de quatro agrupamentos genéticos entre as áreas amostradas (Fig. 7 e 8).

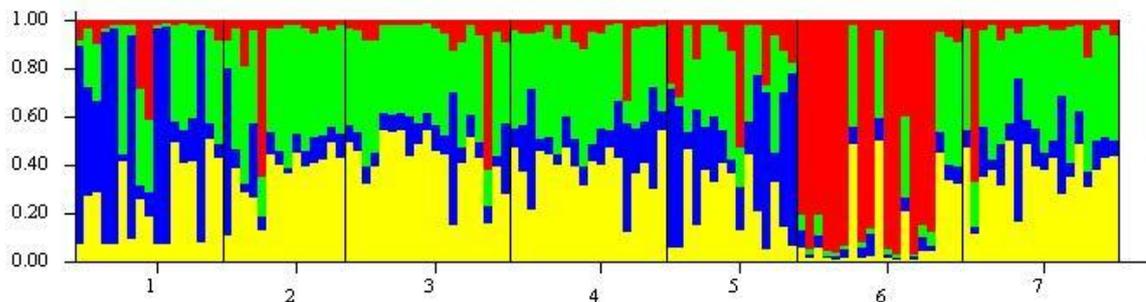


Figura 6 - Resultado da análise de estrutura populacional em *D. albiventris* obtido com o programa Structure para $K=4$.

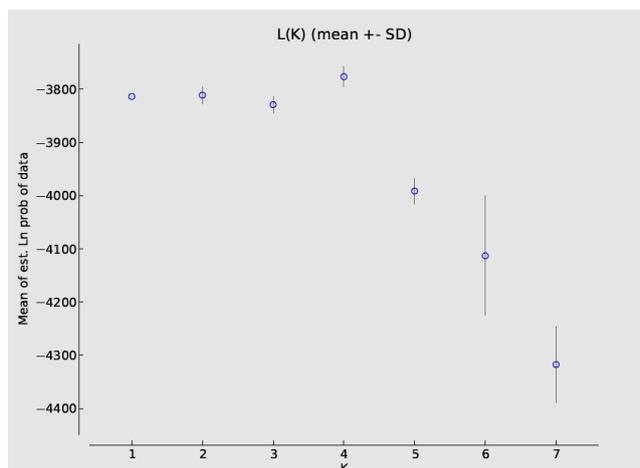


Figura 7 - Resultados das estimativas de $\text{Ln}(P(X|K))$ versus o número de agrupamentos K .

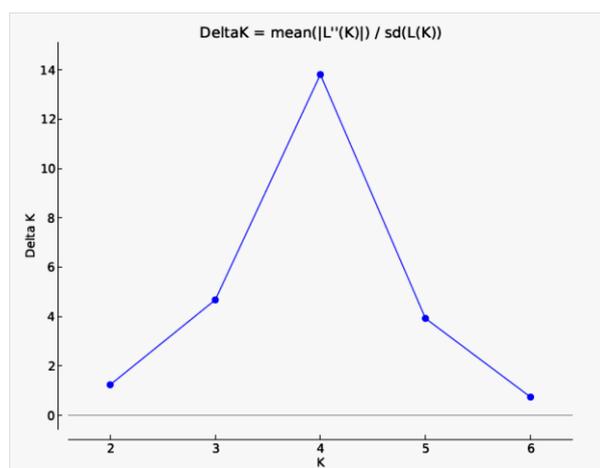


Figura 8 - Estimativa do número de agrupamentos (K) de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005).

5. Discussão

5.1. Transferência de *primers* heterólogos

O sucesso na transferência dos *primers* heterólogos obtido neste trabalho foi condizente com os resultados encontrados por Dias *et al.*, 2009 em um estudo sobre a amplificação cruzada entre espécies da família Didelphidae. Da mesma forma, Gentile (2000) obteve êxito na transferência de *primers* de espécie de gambá *D. marsupialis* para *D. aurita*. Estes resultados podem ser justificados pela proximidade filogenética dos táxons envolvidos, pois em geral o índice de sucesso de amplificação cruzada mostra-se diretamente relacionado com a distância

genética entre a espécie da qual o microssatélite foi isolado e a espécie para qual se pretende obter a amplificação do loco (Primmer *et al.*, 2005).

5.2. Diversidade genética

Atualmente são poucos os estudos sobre a diversidade genética para o gênero *Didelphis* (Gentile, 2000; Kajin, 2008; Assis, 2011), principalmente para a espécie *D. albiventris* (Souza *et al.*, no prelo). A escassez de dados sobre a genética do gênero, associada ao diferente número e tipo de marcadores utilizados nesses estudos, dificultam a comparação dos nossos resultados com outros trabalhos.

O número de alelos encontrados no presente trabalho para *D. albiventris*, através da análise de oito locos microssatélites (8 a 17), foram superiores aos encontrados por Paiva *et al.* (2004) (6 a 9) em um trabalho realizado para a espécie *D. aurita*, no qual foram utilizados apenas 3 locos microssatélites. O menor número de alelos encontrados no trabalho citado pode ser justificado pelo número reduzido de marcadores. No entanto, os valores de heterozigosidade observada e esperada por nós encontrados para os locos analisados (H_o : 0,733 a 0,910; H_e : 0,744 a 0,888) foram semelhantes aos encontrados por estes autores (H_o : 0,76 a 0,83; H_e : 0,70 a 0,91).

De forma geral, não observamos diferença no nível de diversidade genética (A , H_o e H_E – Tabela 6) encontrada nas diferentes áreas estudadas. A baixa variação dos valores de diversidade genética entre as populações pode estar ocorrendo devido ao tempo recente de fragmentação dessa região do Pontal do Paranapanema, de forma que a deriva genética ainda não tenha atuado na perda de alelos. Dessa forma, os altos valores de diversidade genética encontrados em todos os fragmentos podem representar a retenção de polimorfismo ancestral. Além disso, a existência de fluxo gênico entre as áreas, mesmo que restrito, pode estar atuando na manutenção dessa diversidade, contrabalanceando os efeitos negativos da deriva genética e da endogamia, caso estes processos estejam ocorrendo nas populações presentes nas áreas estudadas.

5.3. Estrutura populacional

A capacidade de atravessar matrizes de diferentes tipos (Pires *et al.*, 2002; Prevedello & Vieira 2010) e os hábitos generalistas dos gambás, permitem que estes marsupiais explorem ambientes diversos, inclusive ambientes altamente antropizados (Cáceres, 2000). Oliveira *et al.* (2010) relatam a presença de *D. albiventris* em áreas de entorno de um fragmento, evidenciando o deslocamento desses animais por áreas agrícolas. Estes autores relatam, ainda,

a presença de indivíduos em uma sede de fazenda, sendo que um dos animais amostrados havia sido capturado anteriormente na área do fragmento. O deslocamento mínimo desse indivíduo macho do fragmento até a sede foi de 454m. Essa distância é superior à do fragmento Santa Tereza ao PEMD (320m), a menor distância encontrada entre os pares de área, e que, ainda assim, apresentaram diferenciação (apesar de baixo valor de F_{ST} [=0,029] e baixa estruturação no Structure [populações 5 e 7, Fig. 6]). Supondo que os indivíduos dessa espécie consigam atravessar a distância entre esses dois fragmentos, este fato pode indicar que a capacidade de deslocamento entre as áreas não é o fator decisivo na diferenciação populacional dessa espécie. Por outro lado, o fragmento Santa Tereza é uma das menores áreas estudadas, o que sugere que talvez o tamanho populacional seja o fator preponderante guiando a estruturação e diferenciação populacional observada em nossos dados.

A não diferenciação apontada pelos valores de F_{ST} entre o PEMD e o fragmento Tucano pode ser consequência da qualidade desse fragmento, assim como do seu tamanho (é o maior fragmento estudado, com 1990 ha), os quais podem estar contribuindo para manter populações suficientemente grandes capazes de minimizar os efeitos da deriva genética e da endogamia. O mesmo podemos inferir quando analisamos apenas o resultado apresentado pelo programa Structure (Fig. 6), no qual as maiores populações (2-Tu, 3-SMa, 4-SMo e 7-PEMD - com exceção de 1-PB) aparecem não diferenciadas e são designadas como um único agrupamento genético. Como já citado anteriormente, entre as áreas diferenciadas geneticamente pelo programa Structure encontram-se os fragmentos Santa Tereza, que possui cerca de 80 ha, e o fragmento São Sebastião (população 6, Fig. 6), com cerca de 30 ha, os menores fragmentos estudados.

Segundo Frankham (2002), valores de F_{ST} acima de 0,15 são considerados indicativos de diferenciação moderada entre populações, enquanto que valores próximos a 0,07 podem indicar um baixo grau de diferenciação. Dessa forma, os valores de F_{ST} encontrados em nosso trabalho indicam uma baixa diferenciação populacional entre as áreas estudadas. Baixos valores de estruturação também foram encontrados por Kajim (2008) e por Gentile (2000) para a espécie *D. aurita*. Estes autores utilizaram um marcador mitocondrial e cinco marcadores microssatélites, respectivamente, em estudos realizados em uma mesma área fragmentada de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. A diferenciação observada por Kajim (2008) utilizando o marcador mitocondrial sugere que a diferenciação pode ser histórica, podendo ser reflexo de características comportamentais inerentes da espécie, como a permanência de fêmeas em determinadas áreas, já que este marcador é predominantemente de origem materna. Estudos sobre a ecologia do gênero mostram, ainda, que os machos tendem a

se deslocarem mais que as fêmeas. Pires *et al.* (2002) detectaram movimento entre fragmentos apenas de machos de *D. aurita*. Além disso, Sunquist *et al.* (1987) observaram que machos da espécie *D. marsupialis* apresentam uma área de vida muito superior às fêmeas, variando de 120 ha para machos à 12 ha para fêmeas.

Levando-se em consideração o que se conhece sobre a capacidade de deslocamento de indivíduos pertencentes ao gênero *Didelphis*, e a baixa diferenciação populacional observada em nosso estudo e nos estudos de outros autores citados anteriormente, podemos levantar a hipótese de que na paisagem aqui estudada a estrutura populacional de *D. albiventris* se assemelha à de uma metapopulação onde, mesmo que em baixa frequência, as populações que compõem a metapopulação estão conectadas entre si pelo trânsito de migrantes entre elas. No entanto, é preciso ter cautela ao usar este termo, uma vez que em seu conceito clássico, proposto por Levins (1969), todas as subpopulações têm uma chance aproximadamente igual de extinção, não sendo considerada a variação em tamanho das manchas, suas localizações espaciais nem as dinâmicas individuais dentro das manchas. Begon *et al.* (2007) recomenda que diante da expansão do uso do termo, os usuários tenham ao menos o cuidado de confirmar se a extinção e recolonização de manchas são demonstradas. No entanto, todas as manchas podem ter uma chance desprezível de extinção, ao menos em escalas de tempo observáveis. Isto significa que suas dinâmicas podem ser influenciadas por natalidade, mortalidade, imigração e emigração, mas não em um grau significativo por extinção e recolonização. Esta última definição se aproxima de uma verdadeira metapopulação (Begon *et al.*, 2007).

5.4. Efeitos genéticos da fragmentação em populações de marsupiais com diferentes histórias de vida

A comparação de dados genéticos populacionais entre espécies com hábitos de vida divergentes pode propiciar uma melhor compreensão dos efeitos genéticos da fragmentação de habitats na biota como um todo. Sendo assim, nossos resultados foram comparados com os de Rodrigues *et al.* (dados não publicados), os quais realizaram um estudo com o marsupial *Micoureus paraguayanus*, utilizando 8 locos microssatélites. Foram avaliadas as mesmas áreas estudadas no presente trabalho, com exceção do fragmento São Sebastião, onde *M. paraguayanus* parece ter sido extinto.

A diversidade genética encontrada para *M. paraguayanus* ($A: 4,08$; $H_o: 0,520$; $H_e: 0,537$) foi inferior à encontrada para *D. albiventris* ($A: 10,87$; $H_o: 0,827$; $H_e: 0,800$), enquanto que os valores de F_{IS} foram maiores ($0,041$ vs $-0,033$). Em relação à estruturação observada através da análise do índice de F_{ST} , observamos uma maior estruturação entre as populações de *M.*

paraguayanus. Para esta espécie o valor de F_{ST} global foi igual à 0,063 ($p=0,000$), com valores variando de 0,00 à 0,11, enquanto que para *D. albiventris* o F_{ST} global foi igual à 0,039 ($p=0,000$), com valores variando de 0,013 à 0,058. Quando comparamos a estruturação obtida através da análise bayesiana (software Structure), encontramos cinco agrupamentos genéticos para *M. paraguayanus* (Tu + PEMD/PB/SMA/SMo/STe), enquanto que para *D. albiventris* encontramos 4 agrupamentos (PB/Tu+SMA+SMo+PEMD/STe/SSe). Se desconsiderarmos para *D. albiventris* a população SSe, não analisada no estudo com *Micoureus paraguayanus*, observamos para essa espécie a existência de três agrupamentos genéticos na área estudada. Condizente com os maiores valores de F_{ST} observados para *M. paraguayanus*, também a estruturação verificada no software Structure é maior e mais marcante para essa espécie, com cada agrupamento genético apresentando-se composição bastante distinta e característica no resultado gráfico apresentado pelo programa.

Enquanto *M. paraguayanus* usa preferencialmente os estratos arbóreos e arbustivos das florestas, sendo raramente encontrado no solo (Vieira & Monteiro-Filho, 2003; Vieira, 2006), *D. albiventris* é principalmente terrestre, utilizando com razoável frequência tanto o solo quanto o sub-bosque e o subdossel/dossel das florestas (Vieira, 2006). Além disso, como já citado anteriormente, *Didelphis albiventris* apresenta hábitos generalistas, sendo frequentemente encontrado em ambientes antropizados. Tais características podem influenciar diferencialmente a capacidade de dispersão destas espécies, dando origem às diferenças observadas entre elas nesse estudo.

5.5. Implicações para a conservação

Como os recursos destinados à conservação são limitados, a maioria dos trabalhos desenvolvidos em genética da conservação é destinada a espécies com algum nível de ameaça. No entanto, estudos realizados com diferentes espécies possibilitam uma melhor compreensão dos efeitos da fragmentação na biota como um todo.

Neste trabalho observamos que a divergência genética e a estruturação populacional podem ocorrer inclusive com espécies generalistas e com grande capacidade de dispersão, como os gambás pertencentes à espécie *D. albiventris*. Além disso, observamos que, apesar de algumas alterações genéticas decorrentes da fragmentação de habitat serem previsíveis, a extensão desses efeitos em diferentes espécies nem sempre podem ser facilmente generalizadas, evidenciando a necessidade de estudos com espécies com diferentes histórias de vida.

Como recomendações para a manutenção da diversidade e estruturação genética naturalmente encontradas nas espécies selvagens, é importante que o fluxo gênico seja mantido entre suas populações. Assim, tornam-se necessárias medidas que visem à recomposição da vegetação original e a reconexão dos fragmentos estudados, bem como medidas que evitem a degradação ainda maior das áreas florestais remanescentes. O plantio de florestas em sistemas *stepping-stones*, corredores ecológicos e zonas tampão podem ser importantes ferramentas nesse sentido. Apenas dessa forma populações geneticamente “saudáveis” poderão ser mantidas em longo prazo, diminuindo assim o seu risco de extinção e a manutenção de toda a biodiversidade.

6. Conclusões

- A transferência de *primers* heterólogos entre *D. virginiana* e *D. albiventris* foi realizada com sucesso, sendo possível a obtenção de marcadores do tipo microssatélites suficientes para a realização de estudos populacionais.
- Os locos microssatélites selecionados foram informativos e adequados para a condução dos estudos populacionais de *D. albiventris*.
- Através do índice F_{ST} foi observado uma estruturação genética baixa mas significativa entre todas as áreas estudadas, com exceção entre o PEMD e o fragmento Tucano.
- Através da análise bayesiana foi observado a estruturação em 4 agrupamentos genéticos, fracamente distintos um dos outros.
- As análises de diversidade indicam a existência de uma alta diversidade genética em todos os fragmentos estudados, independentemente do tamanho do fragmento e da distância destes em relação à área florestal contínua (PEMD).
- Os resultados de diversidade e estruturação genética sugerem a existência de uma estrutura populacional compatível com um sistema de metapopulações.

7. Referências bibliográficas

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing Ltda, 2007. 642 p.

ALHO, CJR. The value of biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n.4, p. 1115-1118, 2008. Suplemento.

ASSIS, A. P. A. **Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita* (Didelphidae, Didelphimorphia): investigando a biogeografia da**

Floresta Atlântica. 2011. 185p. Dissertação (Mestrado em Biologia)- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. **Ecologia**: de Indivíduos a ecossistemas. 4 ed. Blackwell: Oxford, 2007. 739p.

BOTSTEIN, D. ET AL. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BROWN JUNIOR, K. S.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORES, T.C.; SAVER, J.A. (Eds.). **Tropical deforestation and species extinction**. London: Chapman & Hall, 1992. p.119-142.

BROWN, B. E. **Atlas of new world marsupials**. Fieldiana Zoology: New Series. v. 102, 2004. 108 p.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Tamanho corporal em populações naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 461-469, 1999.

CÁCERES, N. C. Population ecology and reproduction of the white-eared opossum *Didelphis albiventris* (Mammalia, Marsupialia) in an urban environment of Brazil. **Ciência e Cultura**. v. 52, p. 171-174, 2000.

CÂMARA I. G. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo-Leal C., Câmara I. G. (Eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: CABS and Island Press, 2003. p. 31-42.

CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). **Journal of Biogeography**, v. 12, p. 135-145, 1985.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, n 3, p 319-327, 2000.

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.

CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 126, p. 455-476, 2000.

CHARLES-DOMINIQUE, P. Ecology and social adaptations in didelphid marsupials: comparison with eutherians of similar ecology. In: EISENBERG, J. F. & KLEIMAN, D. G. (Eds.). **Advances in the study of Mammalian Behavior**. Shippensburg: American Society Mammalogists, Special Publication, n. 7, 1983. p. 395-422.

CHIARELLO, A. G. Effects of fragmentation of the Atlantic Forest on mammal communities in south-eastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 89, p 71-82, 1999.

- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- CRUTSINGER, G.M. *et al.* Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. **Science**, v. 313, p. 966–968, 2006.
- DAILY, G.C.; G. CEBALLOS; J. PACHECO; G. SUSÁN & A.SÁNCHEZ-AZOFEIFA. Countryside biogeography of neotropical mammals: conservation opportunities in agricultural landscapes of Costa Rica. **Conservation Biology**, v. 17, n. 6, p. 1814-1826, 2003.
- DAKIN, E.E. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, p. 504-509, 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 B**, v. 39, p. 1-38, 1977.
- DIAS, I. M. G. *et al.* Isolation, characterization and cross-species amplification of new microsatellite markers for three opossum species of the Didelphidae family. **Conservation Genetics Resource**, v. 1, p. 405–410, 2009.
- DÍAZ, M. M.; WILLIG, M, R. Nuevos registros de *Glironia venusta* y *Didelphis albiventris* (didelphimorphia) para Perú. **Mastozoología Neotropical**, v. 11, n. 2, p. 185-192, 2004.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Mutational processes of simple-sequence repeat in human populations. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 91, p. 3166-3170, 1994.
- DITT, E. H. **Fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema**. São Paulo: Annablume/IPÊ/IIEB, 2002, 140p.
- DURIGAN, G. *et al.* Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 23, p. 369-381, 2000.
- EARL, D. A.; VonHoldt, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** DOI: 10.1007/s12688-011-9548-7 version: v0.6.91 February 2012.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals**. 2 ed. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1997. 307 p.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetic data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487-515, 2003.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Benjamim Cummings, 1996, 480 p.

FERNANDEZ, F. A. S.; PIRES, A. S. Perspectivas para a sobrevivência dos marsupiais brasileiros em fragmentos florestais: o que sabemos e o que ainda precisamos aprender. In: Cáceres, N. C.; Monteiro-Filho, E. L. A. (Org.). **Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução**. Campo Grande, MS: Ed. UFMS, p. 191-201, 2006.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, 220 p.

FIKE, J. A.; BEASLEY, J. C.; RHODES Jr, O. E. Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). **Permanent Genetics Resource Note**, p. 1200-1202, 2009.

FONSECA, G. A. B. *et al.* Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. Occasional Papers. **Conservation Biology**, v. 4, p. 1-38, 1996.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., Briscoe, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, 2002. 617 p.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, p. 131–140, 2005.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: Editora SBG, 2008. 280 p.

GARDNER, A. L. The systematics of the genus *Didelphis* (marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. **Special Publications**, The Museum of Texas Tech University. v. 1, p 1-81, 1973.

_____. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal species of the world; a taxonomic and geographic reference**. 3. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. v 1, p 3-18.

GASCON, C., LOVEJOY, T. E. Ecological impacts of forest fragmentation in central Amazonia. **Zoology**, v. 101, p: 273-280, 1998.

GENTILE, R. Biologia de populações de *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae): dinâmica e variabilidade genética de populações na floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro. 2000. 61p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2000.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Reproduction of Pirapitinga do Sul (*Brycon opalinus* Cuvier, 1819) in the Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Santa Virgínia, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 3, p. 541-549, 2007.

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).

JOHNSON, W.E. *et al.* Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. In: GITTLEMAN, J.L. *et al.* (Eds.). **Carnivore conservation**. Cambridge: Cambridge, University Press / The Zoological Society of London, 2001. P.335-358.

KAJIN, M. **Demografia, dinâmica e genética de populações de *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphidae) na Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro**. 2008. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Blackwell Publishing Ltd Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KINDLMANN, P. & BUREL, F. Connectivity measures: a review. **Landscape Ecology**, v. 23, p. 879-890, 2008.

LAVERGNE, A.; DOUADY, C.; CATZEFLIS, F. M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae). **Molecular Ecology**, v. 8, n. 3, p. 517–518, 1999.

LAURENCE, W. F. Rainforest fragmentation and the structure of small mammal communities in tropical Queensland. **Biological Conservation**, v. 69, p. 23-32, 1994.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morphological differentiation in the white-eared opossums group (didelphidae: *Didelphis*). **Journal of Mammalogy**. v. 83, n. 2, p. 354-369, 2000.

LEMOS, B.; CERQUEIRA, R. Morfológica differentiation in the White-eared opossum group (didelphidae: *Didelphis*). **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 2, p. 354–369, 2002.

LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 15, p. 237-240, 1969.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hipervariável microsatélite revelado por in vitro amplificação de um dinucleotídeo repetido dentro do gene da actina muscular cardíaca. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p.397–401, 1989.

LOVEJOY, T. E. *et al.* Edge and other effects of isolation on Amazon Forest fragments. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1986. p.257-85.

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

MCNEELY, J. A. *et al.* **Conserving the World's Biological Diversity**. IUCN, World Resources Institute, IUCN, WWF-US and the World Bank, Conservation International, Washington, DC, 1990. 127p.

MENEGUETTE, A. A. C. Atlas interativo do Pontal do Paranapanema: uma contribuição à educação ambiental. 2001. 89f. Tese (Livre –Docência em Cartografia) – FCT – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2001.

MYERS N. *et al.* Biodiversity Hotspots For conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. Johns Hopkins University Press, 6. ed., 1999. 836p.

OOSTERHOUT, V. C. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

PAIVA, A. L. B. *et al.* Variabilidade genética em *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphidae) no Parque Estadual do Rio Doce. In: Congresso Brasileiro de Genética, 50, 2004, Florianópolis. **Anais...** <Disponível em: http://www.sbg.org.br/CongressoAnterior/Resumo/IndexGA_50.html>. Acesso em: mai. 2011.

PARKER, P. G. *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n.2, p. 361-382, 1998.

PASSOS, M. M. A paisagem do Pontal do Paranapanema – uma apreensão geofotográfica. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 1, p. 177-189, 2004.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

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

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PREVEDELLO, J.A. & VIEIRA, M.V. Plantation rows as dispersal routes for small mammals: a test with didelphid marsupials in the Atlantic Forest, Brazil. **Biological Conservation**, v. 143, p. 131-135, 2010.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Gráfica e Editora Planta, 2008. 328 p.

PRIMMER, C. R. *et al.* Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v. 36, p. 348-360, 2005.

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

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicist. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REUSCH, T.B.H. *et al.* Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 102, p. 2826–2831, 2005.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T.. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: S.M. Sano & S.P. Almeida (Eds.). **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: EMBRAPA, 1998, p. 89-166.

RIBEIRO, M.C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?: implications for conservation. **Biology Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

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

RODRIGUES, F. P. Análise da estrutura genética em populações naturais de pequenos mamíferos, no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes. 2004. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R. *et al.* (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina:Edfurb, 2006. p.27-66.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, Divisão de Reservas e Parques Estaduais. São Paulo: SMA, 2008, 441p.

SCHELHAS, J.; GREENBERG, R. Introduction: The Value of Forest Patches. In: _____. **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington, DC: Island Press, 1996. p.15-36.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

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

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p. 199-203, 2000.

TABARELLI, M. *et al.* Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695–700, 2005.

VALLADARES-PÁDUA, C.; CULLEN Jr., L.; PÁDUA, S. M.; MARTINS, C. S.; LIMA, J. Assentamentos de reforma agrária e conservação de áreas protegidas no Pontal do Paranapanema. In: BENSUSAN, N. (org). **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade – como, para que, por quê?** Brasília: Editora Universidade de Brasília e Instituto Socioambiental. 252 p. 2002.

VIANA, V. & A.A. TABANEZ. Biology and conservation of Forest fragments in the Brazilian Atlantic Moist Forest. In: SCHELHAS & GREENBERG (Eds). **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington, DC: Island Press, 1996. p. 151-167.

VIEIRA, E.M. Padrões de uso vertical do hábitat por marsupiais brasileiros. In: N.C. CÁCERES & E.L.A. MONTEIRO-FILHO. (Eds.). **Os Marsupiais do Brasil**: Biologia, Ecologia e Evolução. Campo Grande: Editora da UFMS, 2006. p. 217-228.

VIEIRA, E. M.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Vertical stratification of small mammals in the Atlantic rain forest of south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 501-507, 2003.

VIVEIRO de CASTRO, E. B. & FERNANDEZ, F. A. S. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, v. 9, p. 73-80, 2004.

WEIR B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the world**. Johns Hoptkins University press, 2005. 2142 p.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

Apêndice A. Sequência dos *primers* utilizados, tipo de repetição do microssatélite flanqueado (em pares de base, pb). Fike *et al.* 2009 (Modificado)

Loco	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Repetição
OP08	F: AAGTTGCCAAACATAGATAATAAGC R: TCACTTCTATTGTCAGATGACTTACC	(GT) ₁₉
OP09	F: ATTCTATTTCTTTATTCTTACACTG R: ATTCCAAAATGATTCAAAC	(AC) ₁₇ (AG) ₁₁
OP18	F: CACATCACTCTTGTGGCAATTC R: CCTAAAATGGGGAAGATCCTG	(GATA) ₉
OP19	F: GCAATAGTCCAGGCATGAGG R: AACACCATCCTCTGGTTTGC	(AC) ₂₃
OP21	F: AATTCAGTGGGAAAGCCTCAGC R: GCCAGATGAAGCTCTAATTGC	(GT) ₂₄
OP28	F: CCATGCCATAACTCCTTGC R: TGTGACTATGAACAAACAAAATGC	(CT) ₂₇
OP30	F: CTCAGACACTGAGTGGGAAGG R: GCCACAATGTTAGATAACAAATTCC	(AG) ₃₁
OP34	F: CATCAACTCCTTGAGGACAGG R: TGAATTTCCATAGTATCTTCTGATGC	(GATA) ₉ (GACA) ₁₃ (GATA) ₁₅
OP36	F: CAACCAGGAGCCAGAAAGAG R: GCTCCTTTCAATATAGTACTGTCTG	(GATA) ₁₆
OP39	F: GCCCAGCCACTTTACAGC R: CATGAATCCAAATGACTTCACC	(TACA) ₁₂
OP42	F: GCTTCTTTGAAAGTGAAATGTTG R: CATATACATTGAACAGTTGGCTATTG	(TATC) ₁₁
OP46	F: AGGATAGTGAGAGTTCCTTATTGG R: TTCTAAACAGTTCTGTGTATGTATTCC	(TATC) ₁₅
OP48	F: TGGAAAGATTTGAGCTTCAGG R: GTTAAGGAATTTCTTGCATTTGG	(GATA) ₁₃