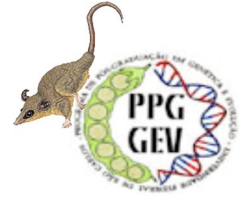


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
EVOLUÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) ATRAVÉS DO MARCADOR  
MITOCONDRIAL D-LOOP NO PARQUE ESTADUAL MORRO  
DO DIABO E EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA  
ADJACENTES**

**Pedro de Queiroz Cattony Neto**

**SÃO CARLOS  
2009**



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

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) ATRAVÉS DO MARCADOR  
MITOCONDRIAL D-LOOP NO PARQUE ESTADUAL MORRO  
DO DIABO E EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA  
ADJACENTES**

**Pedro de Queiroz Cattony Neto**

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

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

**SÃO CARLOS  
2009**

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

C369ad

Cattony Neto, Pedro de Queiroz.

Avaliação da diversidade e estrutura genética de *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) através do marcador mitocondrial d-loop no Parque Estadual Morro do Diabo e em fragmentos de Mata Atlântica adjacentes / Pedro de Queiroz Cattony Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 50 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética de populações. 2. *Micoureus paraguayanus*. 3. Marcadores genéticos. 4. Estrutura genética. 5. Fragmentos florestais. I. Título.

CDD: 575.15 (20<sup>a</sup>)

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

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) ATRAVÉS DO  
MARCADOR MITOCONDRIAL D-LOOP NO PARQUE  
ESTADUAL MORRO DO DIABO E EM FRAGMENTOS DE MATA  
ATLÂNTICA ADJACENTES**

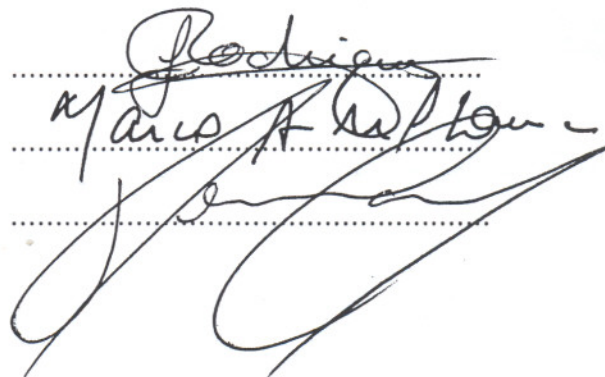
Dissertação de Mestrado de Pedro de Queiroz Cattony Neto

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Renato Caparroz

Handwritten signatures of the examiners: Fernando Pacheco Rodrigues, Marco Antonio Del Lama, and Renato Caparroz. The signatures are written in black ink over three horizontal dotted lines.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Dr. Fernando Pacheco pela orientação, ao Prof. Dr. Pedro Galetti por disponibilizar seu laboratório para este trabalho, ao Gledson Vigiano Bianconi pelas amostras vindas do Paraná, à Capes pela bolsa concedida e, também, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução.

Além destes, não posso deixar de mencionar minha família e meus amigos, que sempre me deram apoio incondicional nas decisões que tenho tomado. Em especial, gostaria de citar meu pai, Bernardino J. Q. Cattony, minha mãe, Maria Tereza M. Cattony e amigos que hoje também fazem parte da minha família como Otávio Lino, Giovana Cruz Corsi, Marcelo Balestrin, Marina Loeb, Lia Sabinson, Camila Rizek, Luciana Jatobá, Natália Cerântola, Valéria Iared, Raquel Negrão Fernanda Jafet, Iderval Jr. e Beatriz Bianchi.

## Resumo

A dinâmica de uso da terra em áreas urbanas e rurais tem levado à fragmentação de ecossistemas e suas conseqüências têm sido relacionadas ao aumento da susceptibilidade de populações naturais à extinção devido à redução do tamanho populacional e ao aumento do isolamento por distância entre populações.

Para avaliar os efeitos que a fragmentação recente de habitat possui sobre a diversidade genética das populações naturais, nós analisamos a diversidade e estrutura genética do marsupial *Micoureus paraguayanus* em fragmentos remanescentes de Floresta Estacional Semi-Decidual na região do Pontal do Paranapanema (SP) através da análise da região controle (D-Loop) do DNA mitocondrial.

Foram encontrados valores baixos para as diversidades haplotípica e nucleotídica quando comparados à outros valores citados na literatura para populações de outras espécies de marsupiais em declínio. Nós encontramos valores de diversidades haplotípica e nucleotídica de 0.28 e 0.0022% respectivamente. Além disso, foi encontrada uma correlação entre a distancia agropastoril contínua e o numero de haplótipos exclusivos nos fragmentos amostrados para este estudo.

O teste AMOVA não detectou estruturação genética entre fragmentos, todavia, os valores de  $F_{st}$  mostram diferenciação significativa dos fragmentos Santa Tereza e Ponte Branca em relação aos demais. Estes estão entre os menores e mais alterados fragmentos avaliados e a sua diferenciação indica que o processo recente de fragmentação (cerca de 60 anos) já pode ter sido o responsável por mudanças na composição genética da população.

**Palavras-chave:** Marsupialia; região controle (D-Loop); estrutura genética e fragmentação florestal.

## Abstract

The dynamics of use of land in urban and agricultural areas has led to destruction and fragmentation of ecosystems. It has been related to the increase of susceptibility of natural populations to extinction due to increase of isolation between populations and reduction of population size. To evaluate the effect of the recent habitat fragmentation on the genetic diversity of natural populations, we will analyze the diversity and genetic structure of populations of the woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia: Didelphimorphia) in the Parque Estadual Morro do Diabo (SP) and in bush fragments in its surroundings. For this purpose, we used the control region (D-Loop) to examine population structure and dynamics in fragmented forest habitats.

We found low values of haplotypic and nucleotidic diversity when compared to values from previous works with marsupials in fragmented areas. We found values of diversity of 0.28 and 0.0022% respectively. Besides that, there was a correlation between continuous cultivated lands distance and number of exclusives haplotypes.

The AMOVA test showed no genetic structure between fragments, however,  $F_{st}$  values indicated significant genetic differentiation to Santa Tereza and Ponte Branca when compared with all the others fragments. These are between the smallest areas evaluated in this study and the differentiation indicates that the recent fragmentation suffered by these patches could be responsible for the changes in the genetic composition of these populations.

**Key words:** Marsupialia; control region (D-Loop); genetic structure and forest fragmentation.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Características das áreas amostradas e número de indivíduos de <i>Micoureus paraguayanus</i> coletados	19
<b>Tabela 2.</b> Características dos primers desenvolvidos	28
<b>Tabela 3.</b> Diversidades haplotípica e nucleotídica calculada para cada fragmento florestal	31
<b>Tabela 4.</b> Número de indivíduos seqüenciados e valores de $F_{ST}$ com probabilidades aceitas para $\alpha=0.005$ discriminadas por * e para $\alpha=0.010$ por **	33
<b>Tabela 5.</b> Teste hierárquico de variância molecular (AMOVA) e índice de estruturação genética $\Phi_{ST}$ para os grupos testados	33



## Lista de Figuras

- Figura 1.** Remanescentes florestais de Mata Atlântica e localização do Parque estadual Morro do Diabo 10
- Figura 2.** Mapas de intensidade de pressão antrópica (a) e áreas prioritárias para conservação de mamíferos (b) confeccionados pelo PROBIO através de um consórcio de entidades (Consevação Internacional, SOS Mata Atlântica, IPE, SMA-SP, e IEF/SEMADS-MG) no workshop “A Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos” de 1999 11
- Figura 3.** *Micoureus paraguayanus*, mais conhecido popularmente como cuíca 13
- Figura 4.** Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) e fragmentos adjacentes. Os fragmentos marcados e nomeados são os respectivos locais de coleta das amostras utilizadas para a extração de 20
- Figura 5.** Visualização de gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo das bandas separadas através do corte e eluição do produto de PCR do conjunto II de primers descritos por FUMAGALLI et al., 1997 22
- Figura 6.** Síntese do desenvolvimento do conjunto de primers MpaF1-MpaR1 27
- Figura 7.** Resultado para o alinhamento das seqüências obtidas com o conjunto de primers descrito com seqüências de marsupiais encontradas no GenBank 28
- Figura 8.** Representação gráfica da quantidade e posição das mutações encontradas nos 25 haplótipos amplificados e representados por letras com os respectivos números de indivíduos por haplótipo (n) 29

**Figura 9.** Histograma com a porcentagem de haplótipos por fragmento florestal amostrado 30

**Figura 10.** Correlação entre distancia agropastoril contínua entre fragmentos e número de haplótipos exclusivo 32

# Sumário

## 1. Introdução

1.1 O Bioma Mata Atlântica	01
1.2 Fragmentação dos habitats e suas conseqüências	03
1.3 Genética da conservação	04
1.4 Genoma mitocondrial e detecção de variabilidade genética	07
1.5 Parque Estadual Morro do Diabo (SP)	09
1.6 Considerações gerais sobre o gênero <i>Micoreus</i>	12

## 2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15

## 3. Justificativa

16

## 4. Materiais e métodos

4.1 Áreas de estudo	17
4.2 Obtenção das amostras	19
4.3 Extração do DNA	21
4.4 Amplificação da região D-loop	21
4.5 Desenvolvimento do novo <i>primer</i>	23
4.6 Amplificação do novo <i>primer</i>	23
4.7 Análise dos dados	24

## **5. Resultados**

5.1 Desenvolvimento do novo <i>primer</i>	26
5.2 Seqüenciamento e diversidade genética	29
5.3 Estrutura populacional	32

## **6. Discussão**

6.1 Desenvolvimento do novo <i>primer</i>	34
6.2 Diversidade genética	35
6.3 Estrutura populacional	37
6.4 Implicações da diversidade e estrutura populacional e genética	38

## **7. Conclusões**

<b>Referencias Bibliográficas</b>	41
-----------------------------------	----

# 1. Introdução

## 1.1 O Bioma Mata Atlântica

Nos domínios da Mata Atlântica começou a História do Brasil. Nessa área, vivem hoje cerca de 120 milhões de habitantes em 3.408 municípios (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007), onde se distribuem os maiores pólos industriais, portuários, petroquímicos, turísticos e grande parte das áreas agropastoris do país, concentrando mais de 70% do PIB Nacional.

Na época da chegada dos portugueses, em 1500, esta floresta ocupava uma área de 1.306.421km<sup>2</sup>, aproximadamente 15% do território brasileiro, distribuídos em 17 estados (PI,CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA, ES, RJ, MG, GO, MS, SP, PR, SC e RS) e adentrava em direção ao interior na Região Sudeste, Sul e Centro-Oeste, onde cruzava as fronteiras com o Paraguai e a Argentina (DEAN, 2002).

Na Mata Atlântica iniciou-se o primeiro ciclo econômico da colonização portuguesa com a exploração do pau-brasil, que oferecia matéria prima para construção de naus, além da essência tintorial cor de brasa característica desta espécie. Essa madeira preciosa serviu também na reconstrução de Lisboa, que sucumbiu a um grande terremoto no século XVIII. Ainda hoje, embora esteja seriamente ameaçada de extinção, a madeira do pau-brasil, endêmica da Mata Atlântica, é matéria prima de grande valor na fabricação de arcos de violino e outros produtos nobres (DEAN, 2002).

Tendo a colonização se concentrado até meados do século XX na faixa costeira, e Mata Atlântica foi de todos os ecossistemas brasileiros o mais destruído. Ali desenvolveram-se os ciclos econômicos da cana-de-açúcar, do algodão e do café, seguidos por intensos processos de urbanização e expansão agrícola nos séculos XIX e XX (DEAN, 2002).

Hoje restam menos de 4% de sua área original com matas primitivas e cerca de outros 4% com floresta secundárias, somando aproximadamente 8,0% (99.466 km<sup>2</sup>) (BENSUSAN, 2002; SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2008).

Reduzida a cerca de 0,3% de sua área original na região nordeste do país, a Mata Atlântica continua melhor preservada nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Isso ocorre principalmente devido ao relevo acidentado e à pobreza dos solos das Serras do Mar e da Mantiqueira, uma série de montanhas costeiras com até 2.500 m de altura que caracterizam o litoral sul e sudeste do Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007).

O domínio da Mata Atlântica inclui um diversificado mosaico de formações florestais (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Florestas Estacionais Deciduais e Semi-Deciduais, Brejos de altitude, Encraves do NE e Matas ripárias) e ecossistemas associados (campos de altitude, restingas e manguezais) (TONHASCA, 2005).

A alta diversidade encontrada nesse bioma, considerado patrimônio genético e paisagístico, é resultado, entre outras razões, da distribuição latitudinal dessa floresta, que abrange 38°, e pela existência de consideráveis diferenças geológicas e de altitude com matas que se estendem do nível do mar até 1.800 metros nas serranias costeiras. Isso gera maior variedade de microclimas, temperaturas, exposições à insolação e, também, tipos de solos. A consequência dessa alta variedade de condições é uma maior possibilidade de divergência evolutiva entre espécies.

Em 1988, o ecólogo Norman Myers apresentou o conceito de “Pontos quentes de Biodiversidade” (Biodiversity Hotspots) para produzir um quadro global de áreas que deveriam receber maior atenção e esforços para conservação. Myers (1988) argüiu que, como se trata de áreas com grande concentração de espécies endêmicas e cerca de menos de 30% das áreas originais remanescentes, investimentos nessas regiões poderiam minimizar extinções.

A Mata Atlântica está entre os cinco maiores “hotspots” no planeta, abrigando 185 dos 265 animais listados em 2004 como ameaçados pela extinção, o que representa 69% dos listados e, além disso, com apenas cerca de 8% de sua área original. Isto a torna uma área prioritária para projetos de conservação, manejo e pesquisa (MYERS et al., 2000).

## 1.2 Fragmentação dos habitats e suas conseqüências

A ação antrópica sobre florestas tropicais tem aumentado dramaticamente em décadas recentes e quatro processos principais podem ser considerados: (1) Super exploração de espécies por caça e pesca; (2) Deterioração ambiental; (3) Introdução de espécies exóticas e (4) Fragmentação de habitats.

O processo de fragmentação e a perda de habitat representam sérias ameaças quanto à persistência de biodiversidade no planeta e estão entre as principais causas de perda de diversidade nos trópicos (WILCOX; MURPHY, 1985; BURKEY, 1995; TURNER, 1996; FAHRIG, 1997 e 2001; GRELLÉ et al., 1999).

A fragmentação dos ecossistemas está diretamente ligada ao aumento da população humana e à dinâmica de uso da terra em áreas rurais e urbanas e é direcionada por fatores econômicos, sociais, culturais, institucionais e tecnológicos (DALE; PEARSON, 1997; CINCOTTA et. al., 2000).

De uma forma geral, o processo de fragmentação é uma ruptura da continuidade de padrões e processos ecológicos (LORD; NORTON, 1990). Ecossistemas adjacentes experimentam fluxos de energia, nutrientes e espécies a por suas fronteiras mútuas. Ao ser fragmentada, a linha de contato entre o habitat e o novo ambiente sofre alterações que podem influenciar a sua estrutura, a composição de espécies e os processos ecológicos da borda.

Juntamente com a diminuição da área e de sua qualidade, a redução da conectividade entre habitats remanescentes é um dos fatores com grandes efeitos sobre a persistência de espécies em áreas fragmentadas (MILLS; SMOUSE, 1994, (BARBOSA; MARQUET, 2002; HANSKI; GAGGIOTTI, 2004). O estabelecimento de uma matriz diferente da original pode ter influencia ímpar sobre a capacidade de dispersão de algumas espécies e, dessa forma, a fragmentação de habitat pode levar ao estabelecimento de populações isoladas (RICKETTS, 2001). Populações isoladas e com pequeno tamanho são mais susceptíveis à extinção por meio de eventos estocásticos ambientais, demográficos e/ou genéticos (MILLS; SMOUSE, 1994; GAGGIOTTI; HANSKI, 2004).

Nas florestas tropicais, a grande maioria das espécies é muito susceptível à processos de extinção, uma vez que essas ocorrem em densidades populacionais baixas e participam por vezes de interações ecológicas muito estreitas e complexas com outras espécies. Assim, a extinção de uma espécie pode promover o desaparecimento de várias outras com as quais ela interage (MYERS, 1987). Extinção, dispersão e colonização são freqüentes até que ocorra o estabelecimento de um novo equilíbrio (LOVEJOY, 1980).

A Mata Atlântica tem sido altamente explorada e fragmentada com pouca ou nenhuma conectividade entre os fragmentos remanescentes. Estes, por sua vez, costumam não ultrapassar os 1.000 ha (SOS MATA ATLÂNTICA, 1998). Um estudo feito por CHIARELLO (1999 e 2000) sobre os efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades de mamíferos da Mata Atlântica indicou que apenas fragmentos grandes, maiores que 20.000 ha, podem sustentar comunidades com populações viáveis por até 30 anos após o isolamento. Visto que apenas 20% das áreas protegidas na Mata Atlântica são iguais ou maiores que 20.000 ha, há a necessidade de grande atenção e de planos para conservação de espécies neste bioma.

### **1.3 Genética da Conservação**

A extinção recente de várias espécies e as ameaças contínuas sobre tantas outras tem tornado a Biologia da Conservação crucial no século XXI. Nesse contexto, a genética aparece como ferramenta importante no direcionamento de verbas e planejamento adequado de estratégias voltadas à conservação do patrimônio natural do planeta por possibilitar inferências sobre parâmetros como: grau de endogamia, perda de diversidade genética, fluxo gênico e isolamento entre populações.

Em populações pequenas e isoladas pode ocorrer o acasalamento entre indivíduos aparentados, o que aumenta a proporção de locos nos quais as proles são homozigotas para alelos iguais por descendência (HEDRICK; KALINOWSKI, 2000). A consequência mais observada da consangüinidade é a redução dos



valores fenotípicos médios mostrados pelos caracteres ligados à capacidade reprodutiva ou à eficiência fisiológica (valor adaptativo). Este fenômeno é conhecido como depressão endogâmica (FALCONER, 1989; FALCONER; MACKAY, 1996; HEDRICK; KALINOWSKI, 2000). Isto ocorre freqüentemente, uma vez que as reservas naturais existentes são constituídas, em sua maioria, por áreas muito pequenas (CHIARELLO, 1999 e 2000).

Os efeitos da depressão endogâmica estão bem documentados em vários estudos com animais de laboratório e animais domésticos (WRIGHT, 1977; FALCONER, 1989), em animais selvagens mantidos em cativeiro (RALLS et al., 1979; RALLS; BALLOU, 1982; MUNSON, 1993) e em animais selvagens de vida livre (WILDT et al., 1987; FRANKHAM, 1995; MAINGUY, J. et al., 2009). Entretanto, o impacto da depressão endogâmica sobre espécies ameaçadas não foi considerado até 1979, quando foi documentado que o acasalamento entre indivíduos aparentados diminuiu a viabilidade de juvenis em 41 de 44 populações de ungulados criados em cativeiro (RALLS K et al., 1979).

Outro processo genético atuante sobre pequenas populações é a deriva genética. Quando a população é pequena, mesmo se a seleção natural estiver agindo sobre um determinado gene, a deriva genética tem uma atuação maior sobre a variação das freqüências alélicas, uma vez que sua força é inversamente proporcional ao tamanho populacional ( $1/2N$ ), ou seja, quanto menor o tamanho efetivo de uma dada população, maior será o efeito da deriva genética sobre a mesma .

A variação aleatória das freqüências alélicas causada pela deriva genética ao longo das gerações pode provocar a eliminação ou a fixação casual de um alelo (BEIGUELMAN, 1995; HEDRICK W. P. et al., 2000) e essa perda de variabilidade genética pode colocar estas populações em risco, uma vez que tal variabilidade fornece o potencial adaptativo para que a população em questão responda à modificações ambientais como doenças, espécies invasoras e até competidoras.

Talvez, a grande contribuição da genética para a conservação tenha sido o reconhecimento da importância da depressão endogâmica, que ocorre devido ao aumento da freqüência de homozigotos deletérios na população.

Populações selvagens desenvolveram uma grande gama de mecanismos para evitar a endogamia. Dentre estes, podemos citar o reconhecimento de parentesco, diferenças na dispersão dos sexos, diferenças na idade de maturação sexual e fertilização extra-par e extra-grupo (PUSEY; WOLF, 1996). Todos esses mecanismos, entretanto, tem seu desempenho comprometido a medida que o tamanho efetivo populacional decresce e/ou o isolamento aumenta.

Somado ao esperado declínio no sucesso reprodutivo do indivíduo, o valor adaptativo médio de populações pequenas também pode diminuir ao longo do tempo. Isto porque mutações deletérias que conferem pequenas desvantagens podem ser fixadas por deriva genética com maior facilidade em populações com tamanhos efetivos menores, como se fossem neutras. Em geral, variantes genéticas neutras podem ser assumidos quando o coeficiente de seleção  $S$  é menor que  $1/(2N_e)$ , onde  $N_e$  é o tamanho efetivo da população. Portanto, como os tamanhos efetivos em populações ameaçadas são geralmente baixos, seus variantes genéticos são efetivamente neutros (HEDRICK W. P. et al., 2000).

A maioria dos variantes deletérios é recessiva e ocorre em baixas frequências em grandes populações devido à atuação da seleção natural. Assim, estes variantes permanecem presentes apenas em heterozigotos. A curto prazo, se a população diminuir de tamanho, a variação deletéria é eliminada, especialmente quando conferem grande efeito negativo ao valor adaptativo do indivíduo.

Por outro lado, a longo prazo, os variantes deletérios de menor efeito no sucesso reprodutivo podem se fixar e acumular na população graças à deriva, aumentando os efeitos da depressão endogâmica na população.

É difícil prever a magnitude dos efeitos de alelos deletérios, uma vez que estes dependem grandemente da interação entre genótipos e ambiente.

A fim de evitar a extinção, algumas populações podem se beneficiar da introdução de indivíduos de populações relacionadas para restauração genética, isto é, para uma diminuição dos efeitos deletérios causados pela depressão endogâmica e conseqüente recuperação de variabilidade genética (SACCHERI et al., 1998; COUVET, 2001).

A perda de variabilidade genética em sistemas fragmentados tem sido usada para inferir o isolamento entre populações e, além disso, o contraste de padrões mitocondriais e autossômicos tem revelado efeitos diferentes da fragmentação sobre os sexos (TALLMON et al., 2002; JOHNSON et al., 2003).

Há falta de informações sobre a escala de tempo necessária para o registro da resposta da estrutura genética de populações selvagens (FRANKHAM et al., 2002; KEYGHOBADI et al., 2005; EWERS; DIDHAM 2005) ao processo de fragmentação.

Todavia, vários trabalhos analisando os efeitos da fragmentação dos habitats terrestres sobre a estrutura genética de populações naturais têm sido publicados recentemente (FUMAGALLI, 1999; BERGL A. R.; VIGILANT L., 2007; BENEDICK et al., 2007) e mostram uma correlação positiva entre a perda de habitat e perda de variabilidade genética de populações selvagens.

#### **1.4 Genoma mitocondrial e detecção de variabilidade genética**

Em combinação com outras áreas do conhecimento, como a ecologia e a biologia de populações, os marcadores moleculares estão se tornando uma ferramenta importante na determinação de o que conservar (sistemática molecular), onde focalizar os esforços de conservação (filogeografia) e como conservar a maior quantidade de diversidade genética nas populações com o objetivo de manter o potencial evolutivo de uma população (genética de populações) (PEREZ-SWEENEY et al., 2003).

O genoma mitocondrial é um dos pilares da genética evolutiva moderna e, por duas décadas, tem sido amplamente utilizado para reconstruir genealogias e descrever a estrutura genética de populações (GEMMELL et. al., 2004).

O DNA mitocondrial apresenta altas taxas de mutação, provavelmente, como consequência dos efeitos deletérios do estresse oxidativo e do mecanismo ineficiente de reparação de seu DNA (GEMMELL et. al., 2004).

Assim, novos alelos para mtDNA são gerados continuamente (RAND, 2001). Estes alelos persistem, mesmo que sejam de efeito deletério leve, porque a falta

de recombinação no mtDNA conduz a um inevitável acúmulo do desequilíbrio de ligação, reduzindo a atuação da seleção natural (LYNCH; BLANCHARD, 1998).

Além disso, o tamanho efetivo populacional do genoma mitocondrial é geralmente apenas um quarto em relação ao genoma nuclear devido à haploidia e a transmissão materna. Portanto, mutações para o mtDNA são muito sensíveis à deriva genética e a gargalos populacionais.

O genoma mitocondrial é transmitido apenas via materna na maioria das espécies, o que gera assimetria na severidade das mutações esperadas em machos e fêmeas. Mutações neutras ou quase neutras em fêmeas podem atingir altas frequências nas populações (FRANK; HURST, 1996), enquanto que as mutações deletérias que afetam apenas machos não estarão sujeitas à pressões da seleção natural.

Em humanos, mutações no mtDNA têm implicado em várias doenças degenerativas, envelhecimento, câncer (WALLACE, 1999), e, mais recentemente, infertilidade (HOLYOAKE et al., 2001).

Pesquisas sobre fertilidade em humanos deram as primeiras evidências de que pequenas mutações no mtDNA podem reduzir a fertilidade em machos enquanto apresentam pouco ou nenhum efeito no valor adaptativo de fêmeas (RUIZ et al., 2000).

Além das informações relativas à diversidade e estruturação genética, os marcadores mitocondriais também fornecem dados sobre a dispersão diferencial dos organismos (DOWLING et al., 1996). Assim, a baixa taxa de recombinação, associada à alta taxa evolutiva e a ausência de regiões codificantes de genes como o “D-loop”, é atraente à construção de genealogias gênicas mais recentes, permitindo a avaliação da diversidade e estruturação genética de populações submetidas ao processo de fragmentação.

## 1.5 Parque Estadual Morro do Diabo (SP)

A Mata Atlântica é uma das regiões mais ricas em biodiversidade do planeta e possui cerca de 261 espécies de mamíferos, das quais 61% são endêmicas desta região (MITTERMEIER et al., 1999). Apesar de sua grande importância, este ecossistema foi drasticamente devastado e ocupado por cidades e plantações, restando cerca de 7,6% de sua cobertura original (SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2008; BENSUSAN, 2002).

A “Grande Reserva do Pontal do Paranapanema”, localizada na confluência dos rios Paraná e Paranapanema no extremo oeste do Estado de São Paulo (Figura 1), foi criada em 1942 para proteger 247 mil hectares de Mata Atlântica. Porém, nos anos posteriores à sua criação, essa Unidade de Conservação foi submetida a um intenso processo de fragmentação florestal associado a conflitos fundiários e ocupações de terras por grandes fazendeiros. O desrespeito aos limites da reserva reduziu drasticamente as áreas florestadas, restando atualmente cerca de 37.000ha do PEMD e 22.000 hectares divididos em centenas de fragmentos florestais.

### Remanescentes Florestais da Mata Atlântica

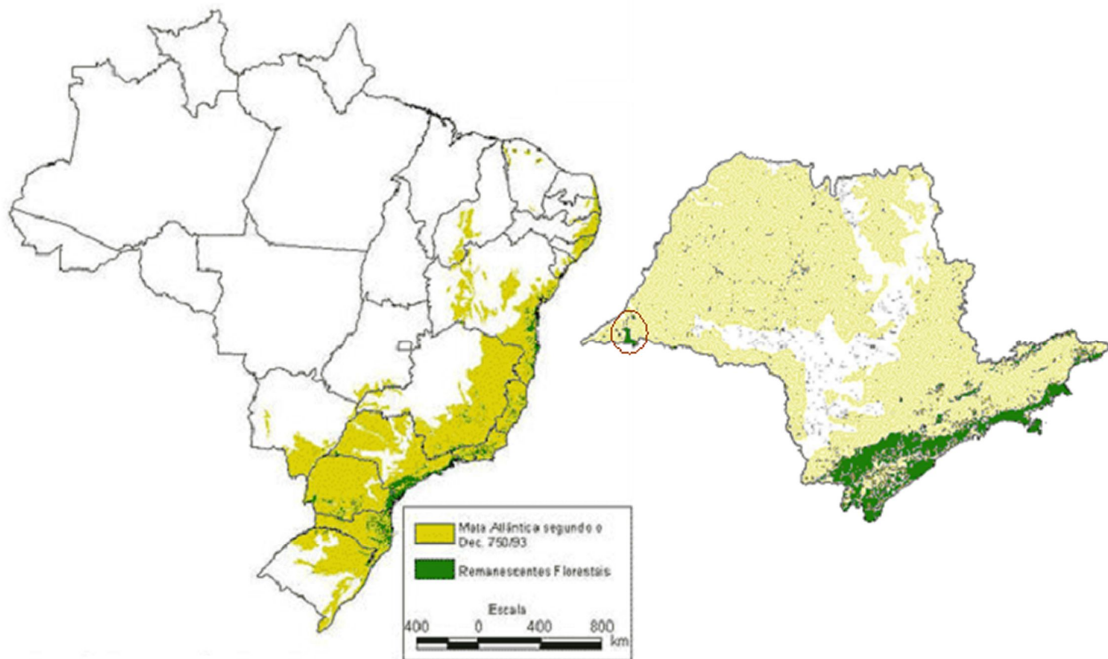


Figura 1. Remanescentes florestais de Mata Atlântica e localização do Parque estadual Morro do Diabo.

O ecossistema representado pelo Parque Estadual Morro do Diabo é o de floresta ombrófila semi-decídua, também conhecida como Mata Atlântica do interior. O parque foi criado em 1986 e abriga um grande número de espécies ameaçadas como onça-pintada, onça-parda, anta, tamanduá e primatas.

Em seu entorno, encontramos diversos fragmentos com tamanhos variados e imersos em uma matriz composta principalmente por pastagens e áreas de agricultura, que representam aproximadamente 58,0% e 18,5% da paisagem respectivamente (MENEGUETTE, 2001). Estas podem atuar como barreiras físicas capazes de impedir o deslocamento de algumas espécies. A maioria desses fragmentos encontram-se isolados há cerca de 50 anos, quando teve início a derrubada da mata nativa e o estabelecimento das atividades agropecuárias.

Como pode ser observado na Figura 2, as áreas prioritárias para conservação de mamíferos no estado de São Paulo sobrepõe grande parte das áreas sob maior pressão antrópica. Entre estas, encontra-se a região do Pontal do

Paranapanema, onde estão localizados o PEMD e os demais remanescentes florestais aqui estudados.

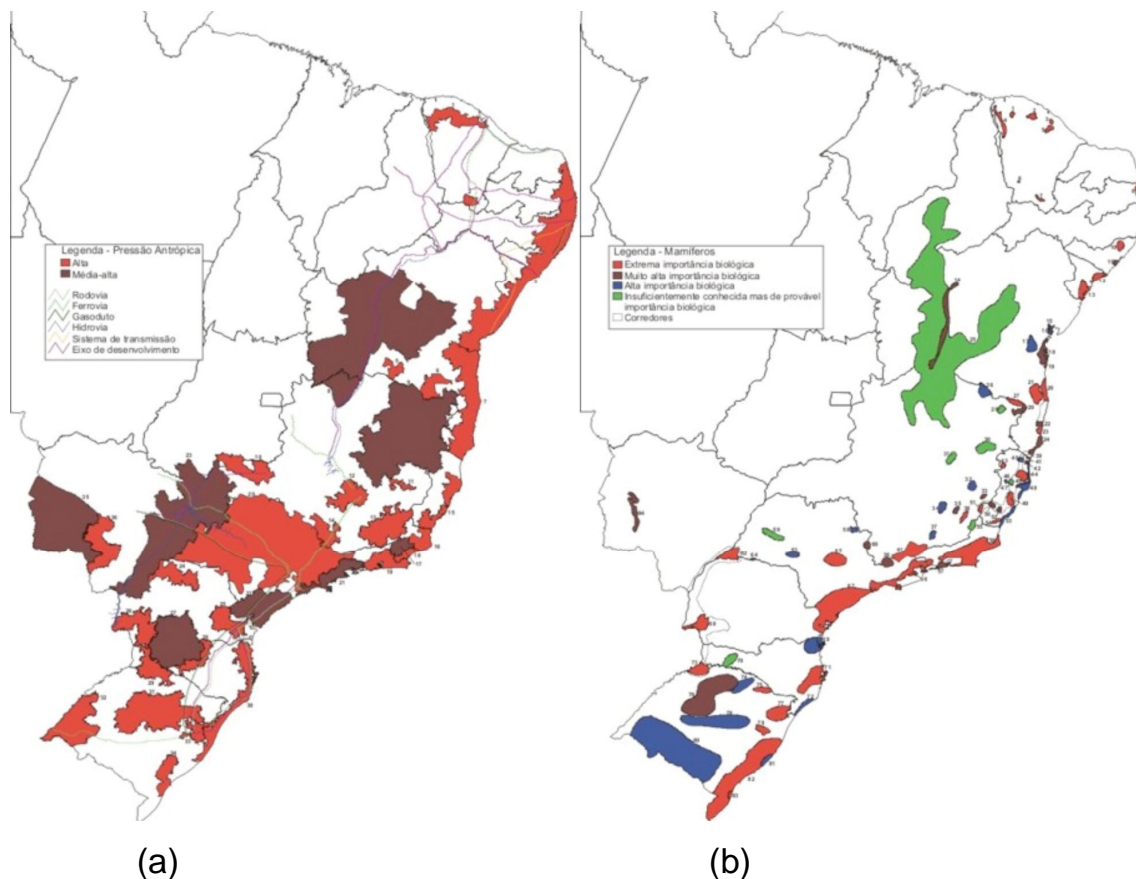


Figura 2. Mapas de intensidade de pressão antrópica (a) e áreas prioritárias para conservação de mamíferos (b) confeccionados pelo PROBIO através de um consórcio de entidades (Consevação Internacional, SOS Mata Atlântica, IPE, SMA-SP, e IEF/SEMADS-MG) no workshop “A Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos” de 1999.

Neste trabalho, o Parque Estadual foi usado como controle por ser mais bem preservado e apresentar proporções espaciais maiores do que os demais fragmentos. Teoricamente, a diversidade genética deve ser maior em fragmentos maiores e próximos um dos outros do que em fragmentos isolados e menores (BROWNE, 1997) e espécies com maior habilidade de dispersão devem ser menos afetadas geneticamente pelo isolamento (LOMOLINO, 1986).

## 1.6 Considerações gerais sobre o gênero *Micoureus*

Diversos trabalhos têm mostrado a importância dos pequenos mamíferos para os processos ecológicos e para o funcionamento dos ecossistemas como, por exemplo, atuação na dispersão de sementes e posição trófica (BUENO; MOTTA-JUNIOR, 2003; BIANCHI et al., 2003; RAÍCES et al., 2003; SALVADOR et al., 2003; LEINER; SILVA, 2003).

Por serem, em sua maioria, habitantes de florestas (EMMON; FEER, 1997), os marsupiais brasileiros estão entre os grupos zoológicos mais ameaçados pela fragmentação florestal.

Entre os marsupiais neotropicais, os representantes do gênero *Micoureus* são considerados animais de pequeno porte com comprimentos que variam de 142 a 250mm e até 130g de massa corporal (BIANCONI, apud ROSSI et al., 2006). Machos são maiores que fêmeas. São caracterizados, também, pela atividade crepuscular ou noturna e dieta insetívora/frugívora (EMMON; FEER, 1997; ROSSI et al., 2006). São preferencialmente arborícolas, mas eventualmente podem descer ao chão a procura de alimentos (EMMONS; FEER, 1997; ROSSI et al., 2006; GOULART et al., 2006). Apresentam gestação e intervalo entre gerações curtos, aproximadamente 1 ano e meio (RODRIGUES, 2004) e as fêmeas podem ter até duas ninhadas por estação reprodutiva (QUENTAL et al., 2001). A capacidade de dispersão parece ser limitada quando comparada a outras espécies, o que os torna um modelo interessante para estudos relativos à estrutura e variabilidade genéticas de populações afetadas pelo processo de fragmentação (FERNANDEZ et al., 1998; PIRES; FERNANDEZ, 1999). São encontrados preferencialmente em áreas de crescimento secundário caracterizadas pela presença de sub-bosques. Além disso, as fêmeas parecem ser territoriais, enquanto os machos parecem ter maior dispersabilidade (PIRES et al., 1999).

A espécie *Micoureus paraguayanus* é conhecida popularmente como cuíca (Figura 3). O gênero *Micoureus* faz parte da família Didelphidae, subfamília Didelphinae e, junto com os gêneros *Marmosa* e *Monodelphis*, constitui o grupo monofilético *Marmosa* (JANSA; VOSS, 2000 e 2003).



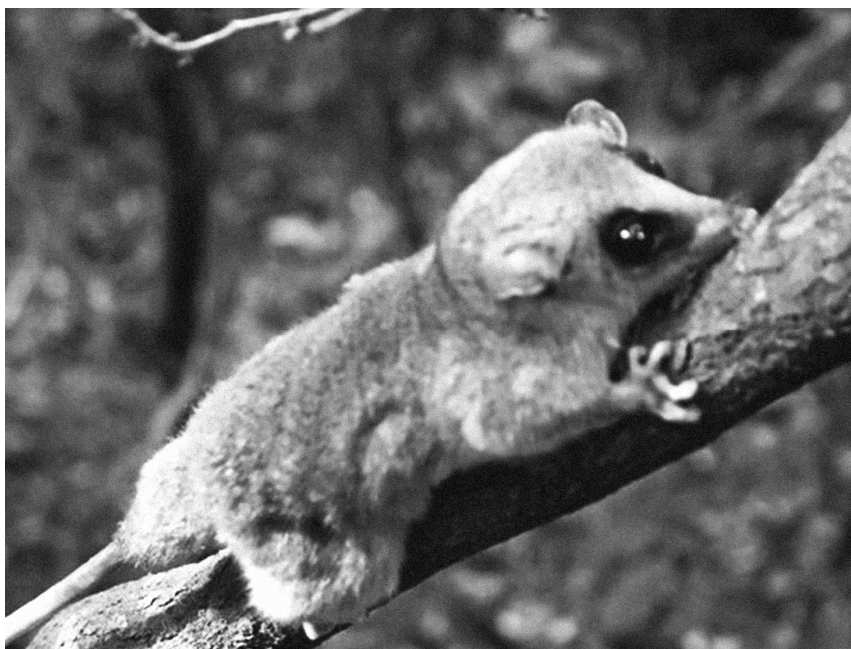


Figura 3. *Micoureus paraguayanus*, mais conhecido popularmente como cuíca.

As espécies desse gênero são amplamente distribuídas pela América do Sul, ocorrendo da Colômbia ao norte da Argentina, no Paraguai e no Brasil (EMMONS; FEER, 1997; PATTON; COSTA, 2003; GARDNER apud ROSSI et al., 2006).

A espécie *M. paraguayanus*, anteriormente denominada *M. demerarae*, foi separada desta última com base na análise de DNA mitocondrial por Costa (2003) e ocupa áreas de Mata Atlântica dos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, estendendo-se a oeste até o Paraguai.

Ainda são poucos os trabalhos que abordaram características genéticas desse marsupial. Rodrigues et al. (2006) caracterizou cinco loci de microssatélite para *M. paraguayanus* e mais recentemente, no trabalho de Dias et al. (2008), foram caracterizados outros oito loci de microssatélite para a espécie a partir de marcadores de *Micoureus demerarae*.

PINHEIRO (2003) estudou a divergência genética entre sequências do gene mitocondrial citocromo b em espécimes de ecossistemas distintos com a finalidade de testar a Hipótese dos Gradientes Ecológicos. Rodrigues (2004) e Guedes (2007) avaliaram a estrutura genética de *M. paraguayanus* nos mesmos

fragmentos florestais estudados por nós através de microssatélites. Estes trabalhos fizeram inferências sobre os efeitos da fragmentação sobre a estrutura genética da espécie, identificando uma baixa diversidade genética e ocorrência de diferenciação entre grupos de indivíduos do Parque Estadual Morro do Diabo e fragmentos de seu entorno.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

- Avaliar o efeito da fragmentação recente sobre a variabilidade e estruturação genéticas das populações de *Micoureus paraguayanus* submetidas a esse processo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Validar o uso do novo conjunto de *primers* para a amplificação da região controle de *Micoureus paraguayanus*.
- Avaliar o nível de diversidade e estruturação genética de *Micoureus paraguayanus* por meio da análise do marcador mitocondrial D-Loop.

### 3. Justificativa

A destruição e a fragmentação dos habitats são consideradas as principais ameaças à conservação da biodiversidade atualmente. Entre os diversos problemas causados pela fragmentação, as alterações genéticas decorrentes desse processo assumem um caráter de extrema importância, já que a diversidade genética existente nas populações naturais tem papel crucial para a sua sobrevivência em longo prazo.

A espécie *M. paraguayanus* foi escolhida como objeto de estudo deste trabalho por estar presente no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e em fragmentos de Mata Atlântica adjacentes, nossa área de estudo, e por oferecer condições ideais para o entendimento do efeito da fragmentação florestal sobre a estrutura genética de suas populações, uma vez que a substituição de áreas florestais por campos cultivados parece constituir uma barreira física eficaz à sua dispersão.

Neste trabalho, partilhamos da opinião de Entwistle e Stephenson (2001), segundo os quais, apesar do reconhecimento crescente da importância que essas espécies possuem, a sua inclusão em programas de conservação é restrita. Isto justifica a realização de projetos que visam a avaliação do status de conservação e as necessidades de manejo particulares a esse grupo, o que fornecerá os meios pelos quais os programas de conservação poderão incorporá-los às suas agendas.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Áreas de estudo

O presente trabalho foi realizado com amostras coletadas no Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) e, também, de fragmentos adjacentes. O parque é um dos últimos remanescentes de áreas de Mata Atlântica protegida do interior do país com cerca de 36.845,33 ha.

A região conhecida como Pontal do Paranapanema localiza-se na confluência dos rios Paraná e Paranapanema, no extremo oeste do estado de São Paulo (Figura 1). A formação vegetal característica é a Floresta Estacional Semidecidual, também conhecida como Mata Atlântica de Interior. O clima é classificado pelo sistema de Koppen como Cwa, mesotérmico, de invernos secos e temperaturas médias anuais ligeiramente inferiores a 22° C. A sazonalidade é uma característica importante do clima, sendo que no inverno frio e seco predominam temperaturas entre 15 e 20° C e no verão quente e úmido são registradas temperaturas acima de 35° C. As precipitações anuais estão em torno de 1100 e 1700 mm.

O Pontal do Paranapanema é a região mais recentemente devastada de São Paulo. O processo teve início por volta de 1942 (FERRARI-LEITE, 1998). Devido ao processo de expansão das atividades agropecuárias, atualmente as áreas florestadas restringem-se a cerca de 1,85% da área ocupada originalmente (MARTINS et al., 2008). Ainda assim, esta região abriga grande parte dos remanescentes dessa formação vegetal no Parque Estadual do Morro do Diabo – PEMD, com 371,56 km<sup>2</sup> (localizado entre as coordenadas 22°16' e 22°40'S e 52°05' e 52°30'W), e diversos fragmentos que juntos somam aproximadamente 210 km<sup>2</sup>. A matriz que separa os fragmentos florestais da região é composta principalmente por pastagens e agricultura, que representam aproximadamente 58,0 e 18,5 % da paisagem, respectivamente (MENEGUETTE, 2001).

Para este trabalho, contamos ainda com amostras coletadas no Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PVRES), no município de Fênix, Paraná. O

parque com coordenadas geográficas 23°54' e 23°56' S e 51°56' e 51°58' W conta com 353.86 ha.

A região do Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo encontra-se em área do Domínio Tropical Atlântico, simbolicamente reconhecido com domínio dos “mares de morros” Florestados. À época do descobrimento do Brasil, encontrava-se revestida por Florestas Estacionais Semidecíduais. O Conceito ecológico deste tipo de vegetação está condicionado pela dupla estacionalidade climática: uma tropical com época de intensas chuvas de verão seguidas por estiagem acentuadas e outra subtropical sem período seco, mas com seca fisiológica provocada pelo intenso frio de inverno, com temperaturas médias inferiores a 15° C. A percentagem de árvores caducifólias no conjunto floresta situa-se entre 20 e 50%.

Os rios que drenam a região do Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo estão compreendidos na Bacia Hidrográfica do Rio da Prata, Sub-bacia do Rio Paraná.

No Paraná a devastação foi mais intensa e acelerada nas regiões norte e oeste. Tal processo esteve diretamente relacionado à alta fertilidade dos solos associada à recente colonização dessa porção do Estado. Dos cerca de 80% da cobertura vegetal original, restam hoje não mais que 8,93% (FUNDAÇÃO S.O.S. MATA ATLÂNTICA, et al., 1998), sendo as florestas transformadas em pastagem ou áreas de cultivo de café, feijão, milho e soja.

## 4.2 Obtenção das Amostras

Para avaliarmos como a fragmentação pode influenciar a estrutura genética das populações de *M. paraguayanus*, realizamos a análise genética de 51 amostras coletadas na região do Pontal do Paranapanema, extremo oeste do estado de São Paulo, e 5 amostras coletadas no município de Fênix, noroeste do Paraná.

As 51 amostras, coletadas entre os anos de 2002 e 2003, foram obtidas do Parque Estadual Morro do Diabo e mais cinco fragmentos do seu entorno (Figura 4), enquanto que as amostras do Paraná foram obtidas do Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PVRES) no ano de 2007 (Figura 5). A Tabela 1 mostra o número de amostras obtidas de cada área, o número de amostras utilizadas para as análises deste trabalho, os tamanhos dos fragmentos e a matriz de distâncias entre as áreas estudadas. Cada amostra era constituída por um pedaço de tecido retirado da orelha do animal e armazenada em etanol absoluto à -20°C.

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

N° Indivíduos amostrados	N° Indivíduos sequenciados	Tamanho (km <sup>2</sup> )	<i>Distância (km)</i>						
			PEMD	Ponte Branca	Tucano	Sta. Tereza	Sta. Maria	Sta. Mônica	
8	8	37156,00	PEMD	0,00	10,671	8,500	0,673	13,700	24,516
22	9	1195,00	P. Branca		0,00	2,538	16,462	26,268	33,553
8	8	1990,00	Tucano			0,00	15,980	28,220	36,608
17	9	83,00	Sta. Tereza				0,00	12,528	23,337
12	8	441,00	Sta. Maria					0,00	8,725
28	9	584,00	Sta. Mônica						0,00

\* PEMD e o PVRES distam 139,900 km

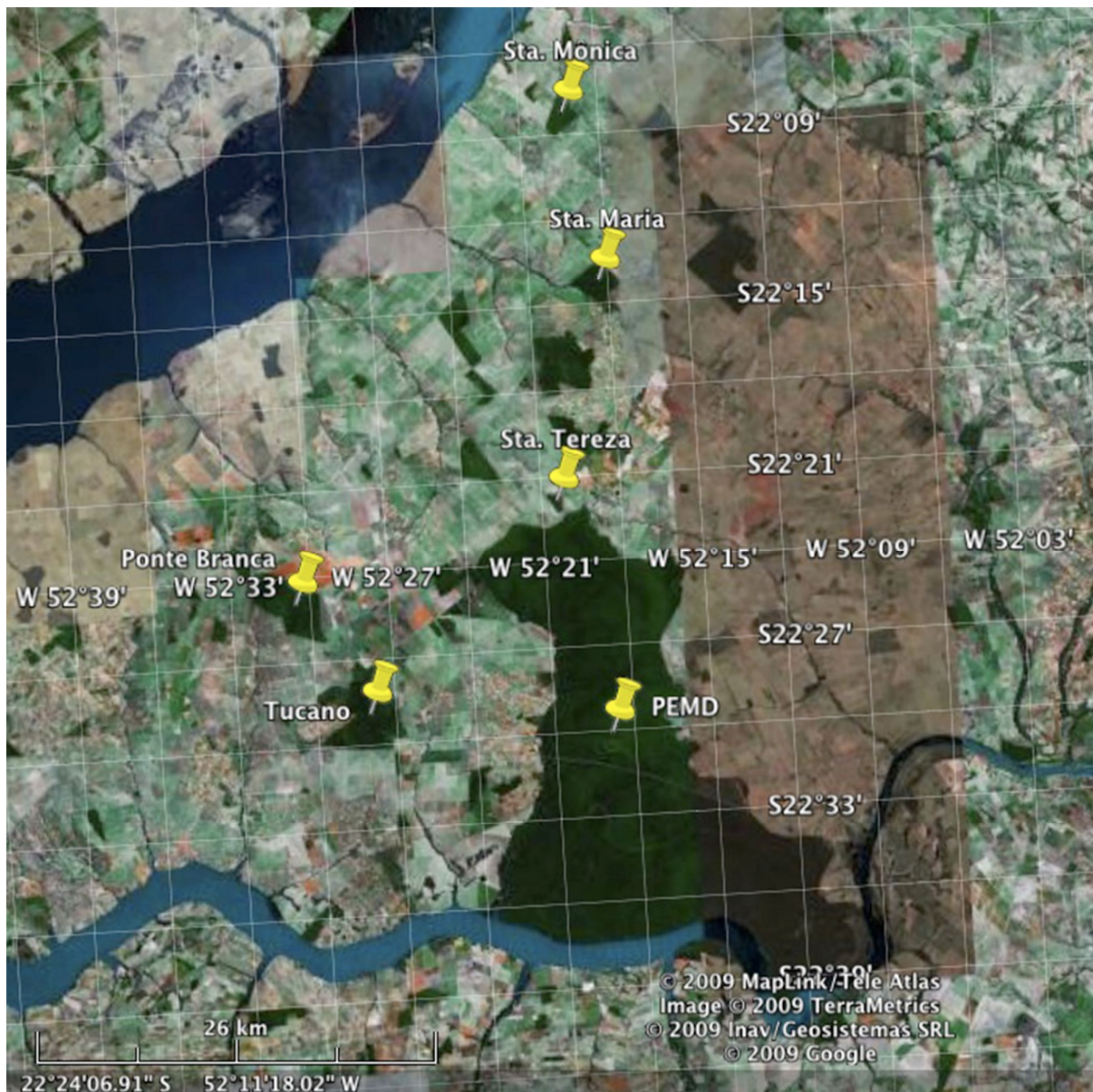


Figura 4. Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD) e fragmentos adjacentes. Os fragmentos marcados e nomeados são os respectivos locais de coleta das amostras utilizadas para a extração de DNA.



### 4.3 Extração do DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada pelo 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 10 ng/ $\mu$ l de DNA.

### 4.4 Amplificação da região D-loop

Para a análise do DNA mitocondrial, utilizamos a técnica de PCR para a amplificação da região controle utilizando, inicialmente, *primers* descritos por Fumagalli et al., (1997). Estes correspondem à primeira e segunda metade do gene D-loop.

De acordo com estes autores, os dois conjuntos de primers amplificam por inteiro o gene D-loop de várias espécies de marsupiais. Ao utilizarmos esses *primers* em *M. paraguayanus*, verificamos a amplificação de 2 fragmentos. Ambos conjuntos de primers produziram fragmentos de aproximadamente 1000 bases. Todavia, a visualização em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrou que, na verdade, os primers produziam dois fragmentos de tamanhos próximos e de difícil separação em agarose.

Os primers foram testados a partir dos ciclos descritos no próprio artigo e o uso de adjuvantes ou mudanças nas concentrações de primers, magnésio e/ou dNTP e temperatura não melhoraram o desempenho prévio para a espécie *Micoureus paraguayanus*. Adjuvantes como Formamida, Acetamida, DMSO e Betamida foram testados individualmente e associados uns aos outros em concentrações finais em solução que variavam de 1% à 5%.

Com o intuito de contornar esse problema, desenvolvemos nosso próprio conjunto de *primers* utilizando as seqüências dos fragmentos de PCR obtidos com os *primers* de Fumagalli et al., (1997) como ponto de partida. Para tanto, os produtos de PCR foram aplicados em géis de agarose à 3%, separados e

recortados do gel com auxílio de lâminas autoclavadas e, finalmente, eluídos em 15 $\mu$ L de água milli-Q autoclavada.

Após a eluição, o material obtido foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% com o marcador de peso molecular “mass ruler” (FERMENTAS). Os produtos de PCR eluídos e com concentração de 20 ng/ $\mu$ L foram, então, utilizados em uma nova PCR, à partir da qual obtivemos a amplificação de fragmentos únicos.

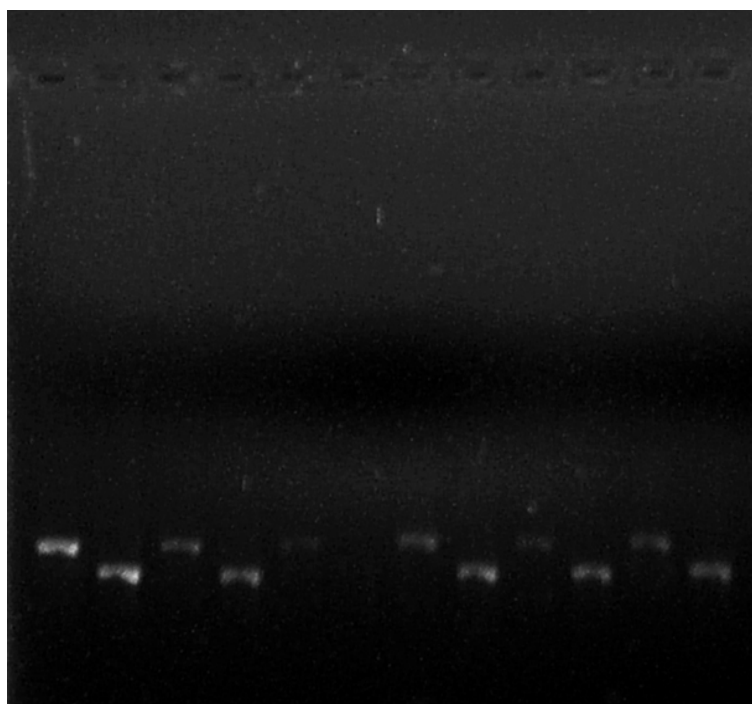


Figura 5. Visualização de gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo das bandas separadas através do corte e eluição do produto de PCR do conjunto II de primers descritos por FUMAGALLI et al., 1997.

Os novos produtos de PCR obtidos (Figura 6). Produtos amplificados para a segunda metade do gene D-Loop foram purificados utilizando 1 U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) e 10 U de ExoI (Exonuclease I, GE Healthcare) para cada 8  $\mu$ L de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37oC por 1 h e a 80oC por 15 min. A verificação do sucesso da etapa de purificação foi realizada em gel de agarose 1%. As amostras foram enviadas para seqüenciamento em um seqüenciador Megabace.

## 4.5 Desenvolvimento do novo *primer*

As bandas amplificadas, separadas e reamplificadas de cinco indivíduos foram utilizadas para confecção do novo conjunto de *primers* através dos procedimentos descritos a seguir.

Para amplificar apenas um fragmento mitocondrial, foram obtidas as sequências-consenso dos eletroferogramas e alinhamentos dos fragmentos parálogos para os cinco indivíduos. Estes foram, então, visualizadas com o auxílio do programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas com o auxílio do programa Bioedit (HALL, 1999). Além disso, o alinhamento manual das seqüências também foi empregado para garantir a acurácia dos dados para as demais análises. As diferenças entre bases, inserções/deleções entre fragmentos parálogos foram utilizadas para o desenho de um novo conjunto de *primers* denominado “D-Loop MpaF1” e “D-loop MpaR1” por meio do programa “Primer 3” (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Assim, os novos primers foram desenhados sobre regiões de inserção/deleção encontradas entre as sequências-consenso para evitar que os óligos se ligassem inespecificamente novamente.

Os primers desenhados foram testados para temperatura de anelamento, formação de harpins e dímeros com o auxílio do programa on line Oligo Analyser (tabela 2) (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e os fragmentos obtidos foram comparados com fragmentos mitocondriais de outros marsupiais através da ferramenta “Blast”.

## 4.6 Amplificação do novo *primer*

Para a amplificação dos marcadores pela da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), as reações foram feitas com volume de 25µL e concentrações finais de 2 mM para dNTP, 1mM para Tris-HCl, 5mM para KCl, 2 mM para MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de Taq, 1 µM para cada *primer* e 20 ng de DNA.

A amplificação dos *primers* foi padronizada em um termociclador PTC-100 (BioRad) com gradiente de temperatura, o que permitiu que várias temperaturas de

anelamento diferentes fossem testadas de uma única vez até que encontramos a reação mais otimizada à 51°C.

A PCR foi dividida em duas etapas diferentes. O primeiro com uma desnaturação inicial à 94°C por 4 min; três ciclos com 94°C por 45s, 54°C por 45s e 72°C por 1 min. O segundo com outros 30 ciclos com 94°C por 45 s, 51°C por 45s e 72°C por 1 min. Para finalizar , 72°C por 10 min.

Os três ciclos com a temperatura ligeiramente mais alta que a temperatura de anelamento encontrada durante a padronização das condições de amplificação foram usados para aumentar a especificidade do *primer* durante os ciclos iniciais, já que se trata de uma reação exponencial de amplificação. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose 1,5%, feitos com TBE 1X e corados com brometo de etídio.

Para a análise do DNA mitocondrial, utilizamos fragmentos com aproximadamente 450 bases da segunda metade do gene D-loop, que foram purificados e seqüenciados pela empresa MacroGen. As amostras foram preparadas para envio de acordo com as especificações da própria empresa ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

## 4.7 Análise dos dados

Para a análise dos dados, foram seqüenciados oito indivíduos para os pontos PEMD, Sta Maria e Tucano, enquanto nove indivíduos foram seqüenciados para os pontos Sta Tereza, Pte Branca e Sta Mônica e mais cinco indivíduos do PVRES (Tabela 1).

O programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para calcular os valores das diversidades haplotípica e nucleotídica. Já a diferenciação e estruturação genética foram avaliadas através do grau de diferenciação genética entre os pares de populações pela estimativa dos valores de  $F_{st}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984), assumindo o modelo de mutação de alelos infinitos (KIMURA; CROW, 1964) com o auxílio dos programas Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000). Os agrupamentos obtidos através dessa análise foram então

avaliados pelo método de Análise da Variância Molecular AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992) com o auxílio do programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER; SCHINEIDER, 2005).

Para avaliar a existência de correlação entre a distância genética e a distância geográfica entre os indivíduos amostrados, realizamos o teste de Mantel conforme implementado pelo programa GeneAIEx vs. 6.1 (PEAKALL; SMOUSE, 2007).

Para a análise da estrutura populacional, o programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) também foi utilizado por apresentar bons resultados na identificação de baixos níveis de diferenciação populacional (CHEN et al., 2007; GAUFFRE et al., 2008). No estudo de estruturação pelo software Structure 2.2 (PRITCHARD et al., 2000), foram realizadas 20 repetições para cada K inferido, com período de burnin de 30000 e 60000 repetições MCMC. A média dessas 20 repetições foi calculada e o K que apresentou maior valor foi o utilizado, como recomendam os autores do software.

Também foi estabelecido um gráfico para avaliar a existência de correlação entre fatores como distância contínua de matriz agropastoril entre fragmentos em direção ao PEMD e número de haplótipos exclusivos.

## 5. Resultados

### 5.1 Desenvolvimento do novo *primer*

O novo conjunto de *primers* se mostrou eficiente para a amplificação de um fragmento de 450 bases da região controle do DNAm<sub>t</sub>, produzindo uma grande quantidade de DNA, cerca de 40ng/μL. Não houve amplificação de outras bandas senão as esperadas (Figura 5).

Como mostrado na figura 8, as seqüências produzidas pelo novo conjunto de *primers* também apresentaram elevados valores de identidade quando comparadas à seqüências mitocondriais de outros marsupiais presentes no GenBank. Os valores de identidade chegam à 76% quando as seqüências foram comparadas com a seqüência completa do DNA mitocondrial de *Didelphis virginiana* e 67% quando comparadas com a seqüência de *Monodelphis domestica*.

Os *primers* também foram avaliados quanto suas temperaturas de “melting”, porcentagem de cg, formação de “harpins” e quanto aos valores de  $\Delta G$  para formação de homo e heterodímeros (Tabela 2). Neste caso, valores mais negativos de  $\Delta G$  indicam que o sistema requer pouca energia para que o anelamento ocorra. Os valores de  $\Delta G = -5,63$  kcal/mole para MpaF1 em um máximo de  $-37,76$  kcal/mole e  $\Delta G = -1,47$  kcal/mole para MpaR1 em um máximo de  $-33,79$  kcal/mole mostram que os *primers* atendem aos requisitos pretendidos quanto à otimização das reações, evitando formação de homo e heterodímeros. Uma vez que as temperaturas de 28,2°C e -34,6°C não são usadas nos ciclos de amplificação de DNA, os riscos de estruturas em “harpin” ou grampo também são pequenas para o conjunto de *primers* em questão.

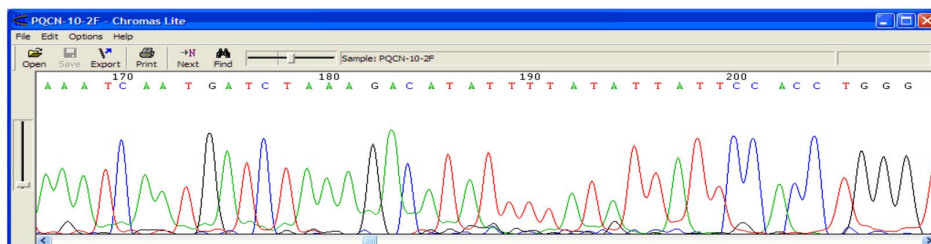
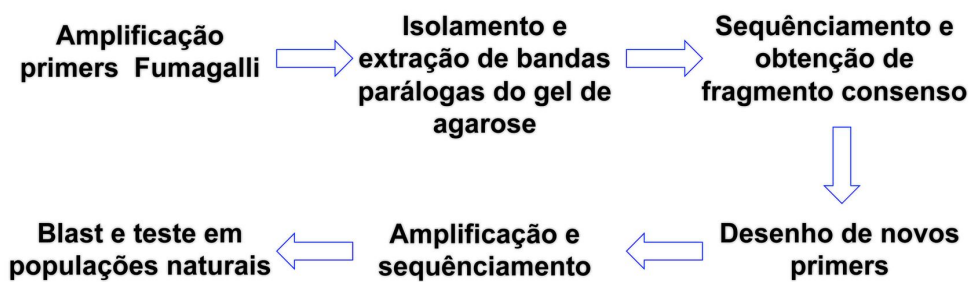
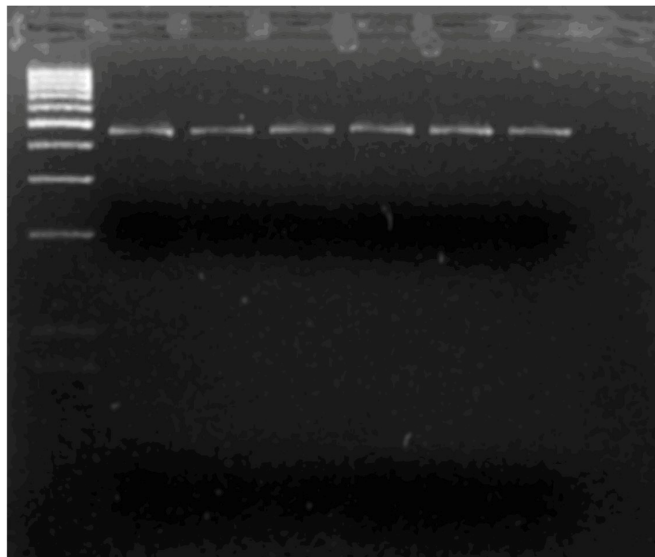
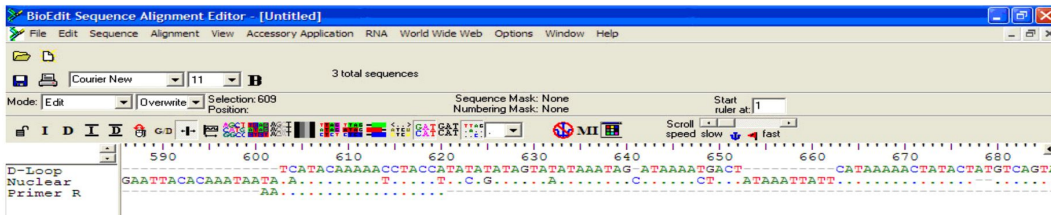
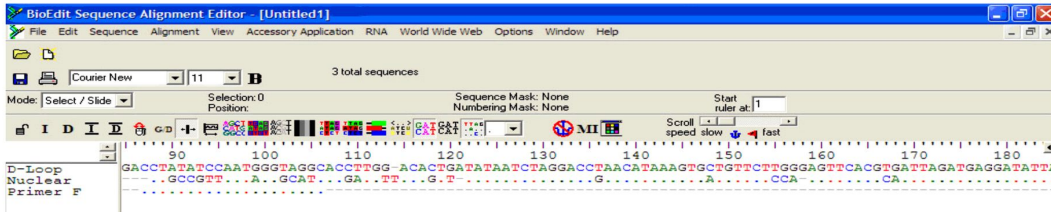


Figura 6. Síntese do desenvolvimento do conjunto de primers MpaF1-MpaR1





## 5.2 Seqüenciamento e diversidade genética

O seqüenciamento dos 56 indivíduos revelou 25 haplótipos diferentes gerados pelas combinações de 12 mutações ao longo das 450 bases dos fragmentos amplificados (Figura 8).

		Posição dos nucleotídeos											
Haplótipo	Nº	11	274	277	278	318	319	320	326	370	372	390	391
A	1	.	.	.	A	.	C	.	.	A	.	A	A
B	1	.	.	.	C	.	C	.	.	A	.	C	A
C	21	.	.	.	C	.	C	.	.	A	.	A	A
D	2	.	.	.	C	.	C	.	.	A	.	A	C
E	1	.	.	.	C	.	C	.	.	A	.	A	G
F	4	.	.	.	C	.	C	.	.	A	.	G	A
G	1	.	.	.	C	.	C	.	A	C	A	C	A
H	1	.	.	.	C	.	C	C	A	.	A	.	A
I	1	.	.	.	C	.	C	C	A	.	A	C	A
J	1	.	.	.	C	.	C	C	A	C	A	.	A
K	1	.	C	C	C	C	.	A	.	A	.	A	A
L	1	.	C	C	C	C	C	A	C	A	.	A	A
M	1	C	.	.	C	.	.	A	.	A	C	A	A
N	6	C	.	.	C	C	.	A	.	A	.	A	A
O	1	C	.	.	C	C	.	A	.	A	C	A	A
P	1	C	.	.	C	C	.	A	C	A	C	A	A
Q	1	C	.	.	C	C	C	.	.	A	.	A	A
R	1	C	.	.	C	C	C	A	.	A	.	A	A
S	2	C	.	.	C	C	C	A	C	A	.	A	A
T	1	C	C	.	.	C	.	A	C	A	.	A	A
U	1	C	C	C	C	C	.	A	.	A	.	A	A
V	1	C	C	C	C	C	C	A	.	A	.	A	A
W	1	C	C	C	C	C	C	A	C	A	.	G	A
X	1	C	C	C	C	C	C	A	.	A	.	G	A
Z	2	C	C	C	C	C	C	A	C	A	.	A	A

Figura 8. Representação gráfica da quantidade e posição das mutações encontradas nos 25 haplótipos amplificados e números de indivíduos amostrados para cada haplótipo (Nº).

A Figura 9 mostra a distribuição desses haplótipos entre os indivíduos e a distribuição dos haplótipos na estrutura genética de cada um dos fragmentos florestais.

O PEMD, Tucano e PVRES contam com três haplótipos exclusivos cada um, enquanto Santa Mônica conta com quatro, Ponte branca com cinco e Santa Maria com apenas um. Santa Tereza não conta com haplótipos exclusivos (Figura 9).

Os haplótipos mais bem representados são C, N, F, D, S e Z, contando com 21, seis, quatro, dois, dois e dois indivíduos, o que representa 37,5%, 10,7%, 7,1% e 3,5% da amostragem total respectivamente. Os demais haplótipos contam com apenas 1,8% do total amostrado.

É possível notar a grande contribuição do haplótipo C na composição de grande parte dos fragmentos, bem como a existência de 16 haplótipos exclusivos espalhados por seis das sete áreas de estudos (Figura 9).

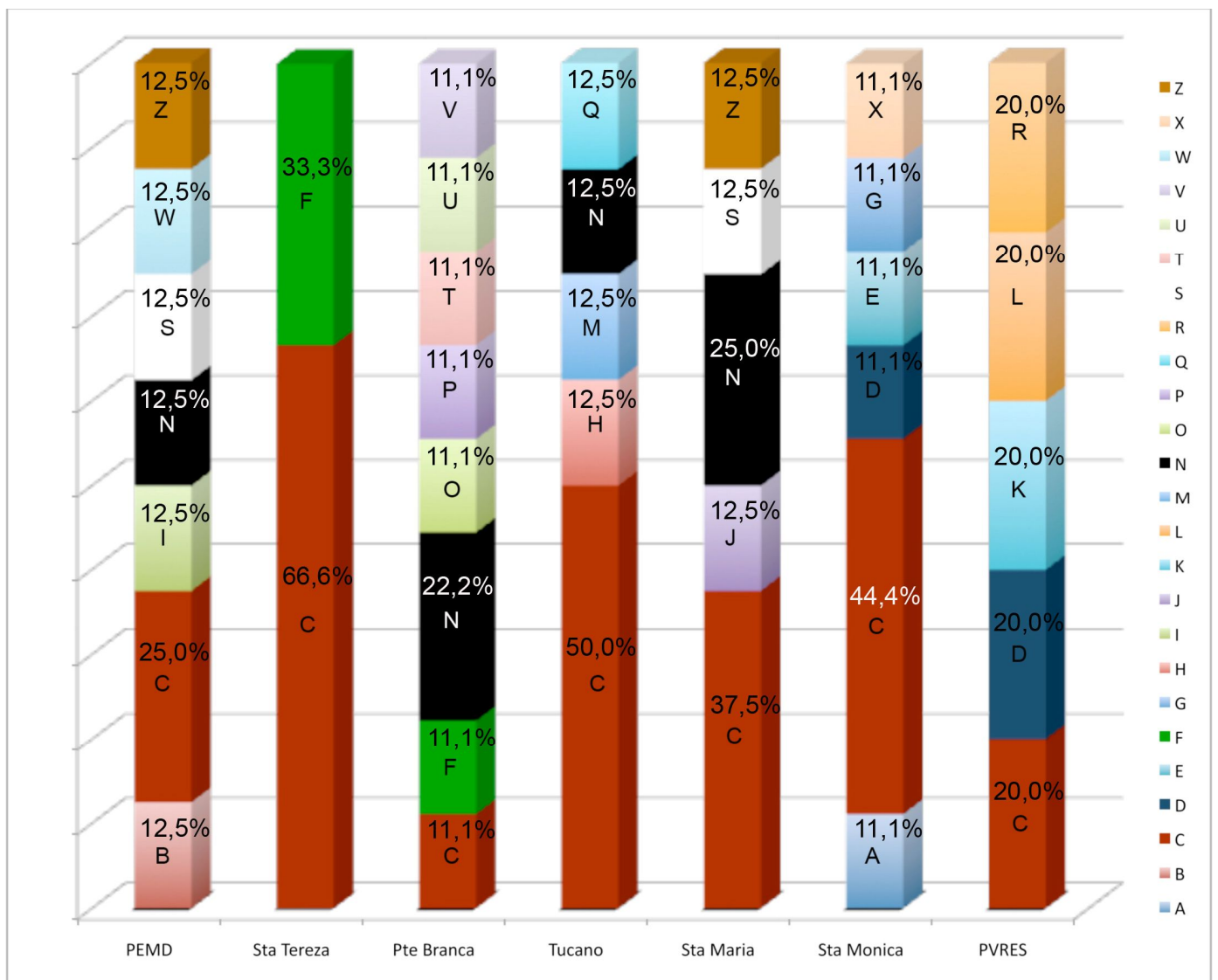


Figura 9. Histograma com a porcentagem de haplótipos por fragmento florestal amostrado.

Tabela 3. Diversidades haplotípica e nucleotídica calculada para cada fragmento florestal.

Local	Diversidade Haplotípica (h)	Variância (h)	Desvio Padrão (h)	Diversidade Nucleotídica (Pi)	Variância (Pi)	Desvio Padrão (Pi)
PEMD	0,964	0,00596	0,077	0,00822	0,0000023	0,00152
Sta Tereza	0,500	0,01646	0,128	0,00128	0,0000001	0,00033
Pte Branca	0,972	0,00409	0,064	0,00694	0,0000013	0,00115
Tucano	0,786	0,02274	0,151	0,00437	0,0000017	0,00129
Sta Maria	0,857	0,01172	0,108	0,00547	0,0000018	0,00132
Sta Mônica	0,833	0,01600	0,127	0,00560	0,0000043	0,00208
PVRES	1,000	0,01600	0,126	0,00765	0,0000023	0,00151
Total	0,833	0,00598	0,077	0,0057	0,0000000	0,00022

A tabela 3 traz os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica para os sete fragmentos amostrados e, também, os valores totais de diversidade para o PEMD e fragmentos adjacentes. O índice de diversidade haplotípica (h) indica a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso no conjunto de amostras serem diferentes. Já o índice de diversidade nucleotídica (Pi) indica o número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos calculados par a par (NEI, 1987). Assim, podemos observar altos valores de h para todos os fragmentos, exceto Santa Tereza com 0,50. De forma análoga, observamos o menor valor de Pi para o fragmento de Santa Tereza (0,00128), enquanto que o PEMD e PVRES apresentaram os maiores valores, 0,00822 e 0,00765 respectivamente.

A figura 10 mostra o aumento do número de alelos exclusivos a medida que a distância coberta por matriz agropastoril contínua entre os fragmentos adjacentes e o fragmento controle (PEMD) aumenta. A reta de tendência apresenta valor de  $R = 0,91$  significativo. Todavia, a correlação entre distância genética e distância geográfica entre fragmentos não revelou valores significativos ( $r_m = 0,14$ ,  $P = 0,56$ ).

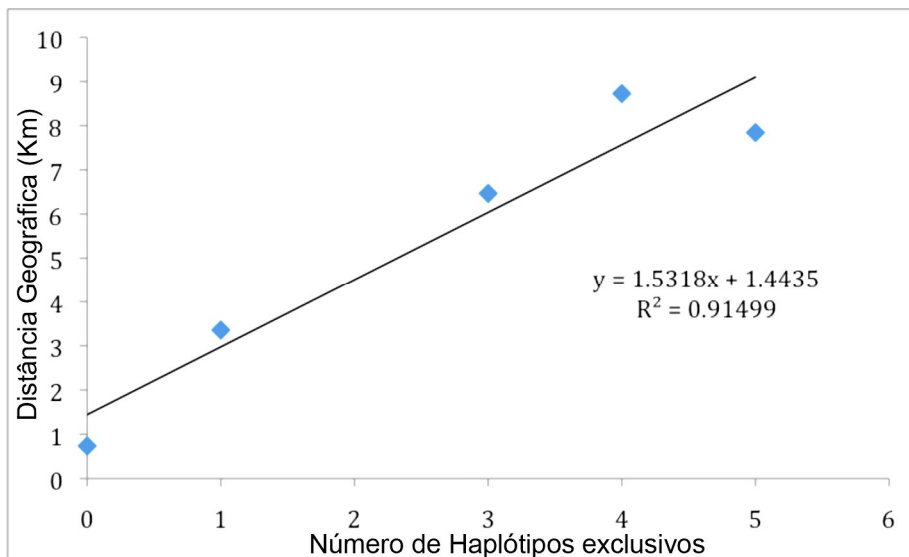


Figura 10. Correlação entre distancia agropastoril contínua entre fragmentos e número de haplótipos exclusivos.

### 5.3 Estrutura populacional

O fragmento de Santa Tereza conta com apenas dois dos 25 haplótipos encontrados na população total (Figura 9), apresentando diferenciação altamente significativa ( $\alpha=0,005$ ) em relação aos demais fragmentos para os valores de  $F_{st}$ . Os valores altamente significativos variam de 0,26090 até 0,32031 e são referentes aos valores de  $F_{st}$  entre Santa Tereza e os fragmentos PEMD, Ponte Branca, Santa Maria e PVRES. Os valores moderadamente significativos ( $\alpha=0,010$ ) são referentes aos valores de  $F_{st}$  entre Ponte Branca e os fragmentos Tucano e Santa Mônica e entre Santa Mônica e Santa Tereza, variando de 0,01689 até 0,11105 (tabela 4).

A proporção de variância molecular apontada pelo teste hierárquico AMOVA mostrou que 91,25% da variação está dentro das populações amostradas com grande homogeneidade revelada pelo índice de estruturação genética ( $\Phi_{ST}$ ), que foi significativo com valor de 0,08745 (tabela 5). Para este teste, os fragmentos foram agrupados de acordo com resultados preliminares obtidos a partir das comparações par a par para os valores de  $F_{st}$  apresentados na tabela 4 da seguinte forma: Santa Tereza e Tucano; Ponte Branca e Santa Maria; PEMD;

Santa Mônica e, por último, outro grupo para o PVRES. Outros cenários foram testados e também apresentaram resultados que apontam para a maior parte da variação dentro das populações, com valores que variaram de 90,63 à 92,52%.

Os valores apresentados pela estatística bayesiana implementada pelo programa Structure indicaram a existência de uma única população com valores mais altos e estáveis de  $\ln$  para  $k=1$ .

Tabela 4. Número de indivíduos seqüenciados e valores de FST com probabilidades aceitas para  $\alpha=0.001$  discriminadas por \* e para  $\alpha=0.010$  por \*\*.

<b><i>N Indivíduos sequenciados</i></b>	<b><i>PEMD</i></b>	<b><i>Sta Tereza</i></b>	<b><i>Pte Branca</i></b>	<b><i>Tucano</i></b>	<b><i>Sta Maria</i></b>	<b><i>Sta Mônica</i></b>	<b><i>PVRES</i></b>	
<b>8</b>	<b>PEMD</b>	0.0	0.26090*	-0.02467	0.03654	-0.08090	0.05626	-0.07368
<b>9</b>	<b>Sta Tereza</b>		0.0	0.32031*	0.18065	0.29266*	0.01689**	0.27419*
<b>9</b>	<b>Pte Branca</b>			0.0	0.07817**	0.00310	0.11105**	0.04416
<b>8</b>	<b>Tucano</b>				0.0	0.00461	-0.00689	0.06250
<b>8</b>	<b>Sta Maria</b>					0.0	0.04771	-0.03647
<b>9</b>	<b>Sta Mônica</b>						0.0	-0.02906
<b>5</b>	<b>PVRES</b>							0.0

Tabela 5. Teste hierárquico de variância molecular (AMOVA) e índice de estruturação genética  $\Phi_{ST}$  para os grupos testados.

<b><i>Fonte da Variação</i></b>	<b><i>Componentes da Variação</i></b>	<b><i>Porcentagem da Variação</i></b>	<b><i>Probabilidade</i></b>	<b><i>Índice de fixação (<math>\Phi_{ST}</math>)</i></b>
Entre Grupos	0.10596 Va	8.89	0.08502	0.08890
Entre Populações dentro de Grupos	-0.00173 Vb	-0.14	0.07554	-0.00159
Dentro de Populações	1.08759 Vc	91.25	0.02753*	0.08745

## 6. Discussão

### 6.1 Desenvolvimento do novo *primer*

O DNA mitocondrial é predominantemente transmitido por via materna na maioria das espécies e é uma das moléculas mais utilizadas em estudos filogenéticos e filogeográficos. A baixa taxa de recombinação, associada à alta taxa evolutiva de regiões como a “D-loop” é atraente à construção de genealogias gênicas mais recentes, permitindo a avaliação da diversidade, dispersão diferencial entre sexos e estruturação genética de populações submetidas ao processo de fragmentação.

O conjunto de *primers* MpaF1 e MpaR1 foi desenvolvido sobre a segunda metade do gene mitocondrial D-Loop com base nos *primers* descritos por Fumagalli et al. (1999).

Como descrito para o gênero *Didelphis* (LEMOS et al., 1999), o gênero *Micoureus* parece apresentar fragmentos mitocondriais com cópias nucleares. Estas podem ser amplificadas erroneamente e a escolha equivocada de um desses fragmentos para análises populacionais pode diminuir a variação esperada para o fragmento mitocondrial e levar à obtenção de resultados que não refletem os verdadeiros efeitos da fragmentação.

A despeito da possível presença de cópias nucleares evidenciadas pela amplificação de bandas de mesma intensidade e tamanhos próximos e, além disso, pela presença de artigos na literatura citando a presença dessas cópias no gênero *Didelphis* (LEMOS et al., 1999), os novos *primers* foram satisfatórios quanto à amplificação da região D-Loop por corresponderem quanto ao tamanho esperado para o fragmento, por apresentarem grandes deleções, por não apresentarem evidência de heterozigotos durante a fase de seqüenciamento e leitura dos eletroferogramas, por terem apresentado altos valores de identidade com seqüências mitocondriais de grupos próximos e por apresentarem valores pouco negativos de  $\Delta G$ , o que garante uma reação bem otimizada quanto à ausência de homo e heterodímeros. Além disso, os *primers* descritos neste

trabalho alcançaram resultados similares e corroboraram os trabalhos prévios com microssatélites realizados por Rodrigues (2004) e Guedes (2007).

## 6.2 Diversidade Genética

O conjunto de *primers* descrito amplificou 25 haplótipos diferentes nos 56 indivíduos seqüenciados e mostrou que grande parte desses haplótipos são exclusivos para os fragmentos florestais amostrados. O haplótipo C é o mais bem representado com 37,5% de freqüência e, desta forma, é o mais antigo e está relacionado com todos os demais haplótipos encontrados através de poucos passos mutacionais (Figura 9).

A diversidade haplotípica total ( $h= 0.833$ ) é substancial quando comparada à valores publicados para região D-loop de outros marsupiais com populações em declínio (*Petrogale xanthopus*,  $h= 0.20$ , Pope et al. 1996; *Isoodon obesulus*,  $h= 0.5042$ , Zenger et al., 2005 e *Myrmecobius fasciatus*  $h=0.90$ , Fumagalli et al., 1999). Já a diversidade nucleotídica total ( $Pi= 0,57\%$ ) é muito inferior à descrita por Pope (1996) e Zenger (2005) com valores de  $Pi = 1.5\%$  e  $Pi= 0.76\%$  respectivamente. Sinclair et al. (2002) encontrou valores de  $Pi= 0.04\%$  para uma população de *Potorous gilbertii* em declínio. Clegg et al. (1998) encontrou valores de  $h=0.99$  e  $Pi=3.6\%$  para uma população de *Macropus rufus* em expansão.

A diversidade nucleotídica apresentada na tabela 3 variou de 0.00128 até 0,00822, evidenciando o quão similares são estes haplótipos. Em ambas análises, diversidades haplotípica e nucleotídica, o fragmento de Santa Tereza apresentou os menores valores.

A existência de muitos haplótipos exclusivos (figura 10) é justificada pelos altos índices de diversidade haplotípica encontrados (tabela 3), variando de 0.5 no fragmento Santa Tereza até 0.972 no fragmento de Ponte Branca, que conta com cinco haplótipos exclusivos. O número de haplótipos exclusivos foi relacionado com a distância contínua de matriz agropastoril entre os fragmentos adjacentes e o PEMD. A reta exibida pela figura 11 evidencia o aumento do número destes haplótipos à medida que os fragmentos se afastam do PEMD e/ou não contam

com “ilhas de vegetação” intermediárias. Isto explica porque o número de haplótipos exclusivos é maior em fragmentos como Ponte Branca do que em fragmentos como Santa Mônica, que conta com uma série de ilhas de vegetação próximas e que se arranjam em direção ao PEMD, o local mais bem preservado da amostragem.

Pires e Fernandez (1999) estudaram uma metapopulação de *M. Paraguayanus* em fragmentos de Mata Atlântica e observaram que a movimentação entre os remanescentes era feita por machos adultos durante a estação de reprodução. Além disso, também constataram que a grande maioria dos indivíduos (machos e fêmeas) se mantinham em um único fragmento durante toda a vida, o que pode explicar a presença de alelos exclusivos nos estudos feitos com microssatélites. Em nosso estudo, o grande número de haplótipos exclusivos para o marcador mitocondrial D-loop pode ser consequência da baixa capacidade de dispersão e, também, da incapacidade de deslocamento entre fragmentos devido à barreira física imposta pela matriz agropastoril.

A dispersão enviesada para machos nesta espécie (PIRES; FERNANDEZ, 1999; PIRES et al., 2002) é um problema adicional para a manutenção da mesma em ambientes fragmentados, já que, neste caso, extinções locais não podem ser repostas naturalmente por recolonização.

Rodrigues (2004) e Guedes (2007) utilizaram 10 *loci* de microssatélites para avaliar a diversidade das mesmas populações estudadas neste trabalho e também identificaram uma baixa diversidade quando comparada à outra população dessa espécie ou outras espécies não endogâmicas. Foi sugerido que esta baixa diversidade resulte, dentre outros fatores, de eventos sucessivos de extinção e recolonização, devido às populações amostradas estarem localizadas à margem da distribuição da espécie.



### 6.3 Estrutura populacional

Levando em consideração o valor crítico de  $F_{st} = 0,15$  sugerido por Frankham et al. (2002) como indicativo de importante diferenciação populacional, a população de Santa Tereza é a única que parece apresentar diferenciação genética significativa quando comparada com todos os demais fragmentos. O teste par a par dos valores de  $F_{st}$  indicam restrições altamente e moderadamente significativas quanto ao fluxo gênico entre fragmentos adjacentes e PEMD. A correlação entre distancia genética e distancia geográfica foi testada e não apresentou correlação significativa ( $r_m = 0.14$ ,  $P = 0,56$ ).

Santa Tereza é o menor entre os fragmentos estudados e, apesar de mais próximo do PEMD, estes resultados podem indicar que os efeitos da fragmentação foram mais acentuados no grupo amostral do fragmento em questão. Guedes (2007) detectou sinal significativo para retração populacional abrupta (bottleneck) para os indivíduos desse fragmento quando analisou *loci* de microssatélites. Assim, a baixa diversidade encontrada pode ser resultado do impacto deste fenômeno na estrutura demográfica e genética da população do fragmento Santa Tereza. Além disso, esta hipótese pode ser corroborada pelos estudos sobre movimentação de *M. paraguayanus* que indicam poucas movimentações entre distâncias de até 300 metros (GOULART et al., 2006; PIRES et al., 2002).

Segundo estudos realizados através da avaliação de dez *loci* de microssatélites por Guedes (2007) e Rodrigues (2004), as populações de Santa Teresa, Santa Maria e Ponte Branca também apresentaram diferenciação genética significativa entre si, com valores de  $F_{st}$  para as comparações par a par variando de 0,103 a 0,125.

Apesar de grande parte da variância molecular encontrada (91,25%) estar dentro das populações e não entre fragmentos e, também da grande homogeneidade mostrada pelo índice de estruturação genética ( $\Phi_{ST} = 0,08745$ ), a diferenciação genética estatisticamente significativa entre fragmentos e os indícios dados por outros artigos sobre a ausência de mobilidade de fêmeas entre fragmentos deve ser levado em conta no planejamento de estratégias para

restauração da diversidade genética das populações de *M. paraguayanus* dos remanescentes de Mata Atlântica. De outra forma, podem ocorrer alterações irreversíveis no curso de processos evolutivos que podem levar à queda da variabilidade genética e do valor adaptativo desta espécie, o que pode contribuir para extinções locais.

#### **6.4 Implicações da diversidade e estrutura genética na população**

É esperado que as alterações genéticas decorrentes do processo de fragmentação do habitat ocorrerão em maior ou menor intensidade em função de fatores como tamanho e qualidade do fragmento, distância entre fragmentos, distância dos fragmentos em relação ao parque, história dos fragmentos e, também, capacidade de dispersão e adaptação da espécie estudada às alterações em seu habitat. Além disso, espera-se encontrar baixa diversidade genética em populações isoladas pela distância, seja por fatores geográficos, ecológicos e/ou comportamentais devido ao fluxo gênico restrito, ao aumento da atuação da deriva genética e, também, ao aumento do número de acasalamentos consangüíneos (FRANKHAM et al. 2002). Há muito debate sobre a importância de fatores genéticos em processos de extinção (BROOK et al. 2002, SPEILMAN et al. 2004), mas já é sabida a correlação positiva entre redução de variação genética e diminuição da persistência de longo prazo de populações selvagens (SACCHERI et al. 1998). Somado a isto, correlações positivas entre diversidade de espécies e alelos corroboram a importância de fatores genéticos na preservação da biodiversidade (CLEARY et al. 2006).

Alguns estudos têm indicado que *M. paraguayanus* possui baixa mobilidade em situações de habitats fragmentados, realizando poucos movimentos entre fragmentos. Pires et al. (2002) estudaram a frequência de movimentos de pequenos mamíferos em 4 fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro e observaram que apenas 1,2% das recapturas de *M. paraguayanus* referiam-se a movimentos entre fragmentos.

Devido a baixa mobilidade entre fragmentos, espera-se limitação do fluxo gênico entre os remanescentes, o que pode acarretar em perda de variabilidade genética para populações de fragmentos mais isolados. Isto já está sendo observado nos trabalhos que buscaram avaliar a estrutura genética de *M. paraguayanus* no Pontal do Paranapanema (RODRIGUES, 2004; GUEDES, 2007) e, também, no presente trabalho. Populações isoladas em pequenos fragmentos apresentam menor tamanho populacional e são mais suscetíveis à ação da deriva genética, à depressão por endocruzamento e à aleatoriedades demográficas como desvios das razões sexuais (FERNANDEZ et al. 2003).

Populações podem ser restauradas demograficamente a medida que a chegada de imigrantes aumenta o tamanho da população receptora e/ou podem ser restauradas geneticamente a medida que migrantes podem reduzir significativamente os efeitos da depressão endogâmica (SACCHERI et al., 1998; COUVET, 2002).

Entretanto, o aumento da mortalidade de dispersores devido a baixa qualidade ambiental das matrizes pelas quais os fragmentos encontram-se circundados contribui para o isolamento dessas populações e também pode levá-las a extinção (VANDERMEER; CARVAJAL, 2001).

Ainda, deve-se considerar que, segundo Rodrigues (comunicação pessoal), as condições da matriz na região do Pontal do Paranapanema são menos favoráveis a movimentações quando comparadas à matriz na área estudada por Pires et al. (2002). Desta forma, é possível que, mesmo que a fragmentação na região seja recente com cerca de 60 anos, alguns processos evolutivos já podem estar sendo afetados. Neste caso, a manutenção do fluxo gênico entre os fragmentos seria a maneira de dar continuidade aos padrões evolutivos históricos da população de *Micoureus paraguayanus*.

## 7. Conclusões

Através do uso do conjunto de *primers* D-loop MpaF1 e D-loop MpaR1, foram encontrados 25 haplótipos nos 7 fragmentos amostrados, dos quais 19 são exclusivos para alguns fragmentos. Isto pode estar indicando dispersão sexo-assimétrica, na qual as fêmeas parecem ser filopátricas.

Os valores encontrados para as diversidades haplotípicas e nucleotídicas são condizentes com os valores apresentados para outras populações de marsupiais em declínio.

Não houve correlação entre distância geográfica e distância genética, mas foi encontrada correlação positiva entre distância contínua agropastoril e número de haplótipos exclusivos. Além disso, estudos prévios feitos com microssatélites também encontraram haplótipos exclusivos. Isto pode ser consequência da presença de uma matriz agropastoril entre os diversos fragmentos, que atuaria como uma grande barreira ou, até mesmo, consequência da baixa capacidade de dispersão de *M. paraguayanus* em áreas contínuas.

Os valores apresentados pelo teste AMOVA não indicaram estruturação populacional, mas os valores altos e significativos de  $F_{st}$  apresentados mostram que a fragmentação florestal já tem efeitos sobre a diferenciação genética das populações dos diferentes fragmentos florestais.

Além de mostrar que a fragmentação pode estar atuando sobre a diversidade e estrutura genética de *M. paraguayanus*, estes achados mostram como populações de diferentes remanescentes florestais podem atuar como reservatórios da diversidade genética total encontrada em uma espécie.

## Referências Bibliográficas

BENSUSAN, N. A. 2002. Impossibilidade de ganhar a aposta e a destruição da natureza. In: Bensusan, N. (org). **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade – como, para que, por quê?** Brasília. Editora Universidade de Brasília e Instituto Socioambiental, 2002. p. 13-28.

BARBOSA, O.; MARQUET P. A. (2002) Effects of forest fragmentation on the beetle assemblage at the relict forest of Fray Jorge, Chile. **Oecologia**, v. 132, n. 2, p. 296-306, 2002.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas populações**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 460 p.

BENEDICK, S. et al. Impacts of habitat fragmentation on genetic diversity in a tropical Forest butterfly on Borneo. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, p. 623-634, 2007.

BERGL, A. R.; VIGILANT L. Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla diehli*). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 501-516, 2007.

BIANCHI, R. C. et al. Análise preliminar da dieta dos pequenos felídeos em Linhares, ES. In: **Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro de Mastozoologia**. Belo Horizonte, MG, p. 20, 2003.

BROOK, B.W. et al . Critiques of PVA ask the wrong questions: throwing the heuristic baby out with the numerical bath water. **Conservation Biology**, v. 16, p. 262-263, 2002.

BROWNE, R. A. Genetic variation in island and mainland populations of *Peromyscus leucopus*. **The Amer. Mid. Nat**, v. 97, p.1-9, 1997.

BUENO, A. A.; MOTTA-JUNIOR, J. C. 2003. Seleção de pequenos mamíferos na dieta do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae) na Estação Ecológica de Itirapina, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOLOGIA, 2., 2003, Belo Horizonte, MG, p.13.

BURKEY, T. V. Extinction rates in archipelagoes: implications for populations in fragmented habitats. **Conservation Biology**, v. 9, p. 527-541, 1995.

CINCOTTA, R. P.; WISNEWSKI J.; ENGELMAN R. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, v. 404, p. 990-992, 2000.

CHEN, C. et al. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 747-756, 2007.

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

CHIARELLO, A. G. Density and population size of mammals in remnants of Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 14, p. 1649-1657, 2000.

CLEARY, D. F. R. et al. Parallel responses of species and genetic diversity to El Niño Southern Oscillation-induced environmental destruction. **Ecology Letters**, v. 9, p. 304-310, 2006.

CLEGG, S. M.; HALE, P.; MORITZ, C. Molecular population genetics of the red kangaroo (*Macropus rufus*): mtDNA variation. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 679-686, 1998.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1660, 2000.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **J. Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.

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

COUVET, D. Fitness heterogeneity and viability of restored populations. **Animal Conservation**, v. 5, p. 153-161, 2002.

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND (CEPF):  
<http://www.cepf.net/xp/cepf/>

DALE, V. H.; PEARSON, S. M. **Quantifying habitat fragmentation due to land use change in Amazonia**. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD JR., R. O.

(Ed.). **Tropical Forest remnants ecology, management and conservation of fragmented communities**. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. p. 400-409.

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

DOWLING, T. E. et al. **Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites**. In: HILLIS, D. M.; Moritz, C. & Mable, B. K. (Ed.). **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 1996. p. 249-320.

ENTWISTLE, A. C.; STEPHENSON, P. J. **Small mammals and the conservation agenda**. In: ENTWISTLE, A.; DUNSTONE, N. (Ed.). **Priorities for the conservation of mammalian diversity: Has panda had its day?** London, Cambridge University Press, 2001 p.474.

EMMONS, L. H.; FEER, F. 1997. **Neotropical rainforest mammals**. Chicago and London, The University of Chicago Press, 2nd. Ed., 1997, p. 307.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L. G. LAVAL; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EWERS, R.M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**, v. 81, p. 117-142, 2005.

FAHRIG, L. Relative effects of habitat loss and fragmentation on population extinction. **Journal of Wildlife Management**, v. 61, p. 603-610, 1997.

FAHRIG, L. How much habitat is enough? **Biological Conservation**, v. 100, p. 65-74, 2001.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow, Longman Scientific & Technical, p.438, 1989.

- FALCONER, D.S., MACKAY, T.F.C., 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**. fourth (Ed). Longman, Harlow, England, 1996.
- FERNANDEZ, F. A. S., PIRES, A. S., FREITAS, D., ROCHA, F. S. & QUENTAL, T. B. **Respostas de pequenos mamíferos, à fragmentação de habitats em remanescentes de Mata Atlântica**. In Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros, nº5, p.184-189, 1998. Águas de Lindóia, SP: Academia de Ciências do Estado de São Paulo.
- FERNANDEZ, F.A.S.; BARROS, C.S.; SANDINO, M. Razões sexuais desviadas em populações da cuíca *Micoureus demerarae* em fragmentos de Mata Atlântica. **Natureza e Conservação**, v. 1, p.21-27, 2003.
- FRANK, S. A.; HURST L. D. Mitochondria and male disease. **Nature**, v. 383, p.224, 1996.
- FRANKHAM, R. Conservation Genetics. **Annu. Rev. Genetics**, v. 29, p. 305-327, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Introduction to Conservation Genetics. **Cambridge University Press, Cambridge**, 2002.
- FUMAGALLI, L. et al. Versatile primers for the amplification of the mitochondrial DNA control region in marsupials. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 1199-1201, 1997.
- FUMAGALLI, L. et al. Mitochondrial DNA sequence variation within the remnant populations of the endangered numbat (*Marsupialia: Myrmecobiidae: Myrmecobius fasciatus*). **Molecular Ecology**. V. 8, p.1545-1549, 1999.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS; INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995**. São Paulo: S.O.S Mata Atlântica/INPE/ISA. 391 Atlântica/INPE/ISA, 1998.
- GAGGIOTTI, OE ET I HANSKI. **Mechanisms of population extinction, in Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations**, I. Hanksi et OE Gaggiotti (Ed.) Academic Press, San Diego, USA, p. 337-366, 2004.
- GAUFFRE, B. et al. Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 4619-4629, 2008.



GEMMELL, J. N.; METCALF, J. V.; ALLENDORF W. F. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. **Trends in Ecology and Evolution**, 19, 2004.

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

GRELLE, C. E. V. et al. The question of scale in threat analysis: a case study with Brazilian mammals. **Animal Conservation**, v. 2, p.149-152, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Symp. Ser. V.** 41, p. 95-98, 1999.

HEDRICK, P. W. **Genetics of Populations**. Boston: Jones & Bartlett. 2nd Ed, 2000.

HOLYOAKE, A. J. et al. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. **Int. J. Androl.** v. 24, p. 175-182, 2001.

JANSA, S.A.; VOSS, R. S. Phylogenetic Studies on Didelphid Marsupials I. Introduction and Preliminary results from Nuclear IRBP Gene Sequences. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 7, p. 43-77, 2000.

JOHNSON, JA; TOEPFER, J. E.; DUNN, P. O. Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 3335-3347, 2003.

KALINOWSKI, S. T.; HEDRICK, P. W. Inbreeding depression in captive bighorn sheep. **Zoo Biol. Submitted**, 2000.

KALINOWSKI, S. T.; HEDRICK, P. W.; MILLER, P. S. A close look at inbreeding depression in the Speke's gazelle captive breeding program. **Conserv. Biol. In press**, 2000.

KEYGHOBADI, N. et al. Among-andwithin-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: an empirical demonstration. **Proceedings of the Royal Society of London B**. v. 272, p. 553-560, 2005.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. **Genetics**. v. 49, p. 725-738, 1964.

LEINER, N. O.; SILVA, W. R. **Dieta e uso do espaço de Marmosops paulensis (Didelphimorphia: Marmosidae) na Mata Atlântica de São Paulo**. In: Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro de Mastozologia. Belo Horizonte, MG, p. 99, 2003.

LEMONS, B., CANAVEZ, F.; MOREIRA, M. A. M. Mitochondrial DNA-like sequences in the nuclear genome of the Opossum genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae). **The American Genetic Association**. v. 90, p. 543-547, 1999.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.  
Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/reprint/25/11/1451>>.  
Acesso em: 27 jul. 2009

LOMOLINO, M. V. Mammalian community structure on islands: the importance of immigration, extinction and interactive effects. **Biol. J. Linnean Soc.** v. 28, p. 1-21, 1986.

LORD, J.M.; NORTON, D.A. Scale and the spatial concept of fragmentation. *Conservation Biology*. v. 4, p. 197-202, 1990.

LOVEJOY, T.E. Foreword. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A, eds. **Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates. p. 5-9, 1980.

LYNCH, M.; BLANCHARD, J. L. Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. **Genética**. v. 103, p. 29-39, 1998.

JULIEN, M. J.; CÔTÉ, S. D.; COLTMAN, W. D. Multilocus heterozygosity, parental relatedness and individual fitness components in a wild mountain goat, *Oreamnos americanus* population. **Molecular Ecology**. v. 18, p. 2297-2306, 2009.

MENEGUETTE, A. A. C. **Atlas interativo do Pontal do Paranapanema: uma contribuição à educação ambiental**. 2001. 190 f. Tese (Livre-Docência em Cartografia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2001. 1 CD-ROM.

MILLS, L. S.; SMOUSE, P. E. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. **Am. Nat.** v. 144, p. 412-31, 1994.

MITTERMEIER, R. A. et al. Hotspots: Earth's biology richest and most endangered terrestrial ecoregions. **Cemex e Conservation International**, Mexico. p. 431, 1999.

MUNSON, L. Inbreeding and disease in captive wild animals. In: FOWLER, M. E.. **Zoo and wild animal medicine**, 3rd. ed., Philadelphia, 73-79, 1993.

MYERS, N. The extinction spasm impending: synergisms at work. **Conservation Biology**. v. 1, p. 14-21, 1987.

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

PATTON, J.L.; COSTA, L.P. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: **Predators with Pouches: The Biology of Carnivorous Marsupials**, (Ed.) Jones, M., Dickman, C. & Archer, M. (CSIRO, Canberra, Australia), p. 63-81, 2003.

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.

PINHEIRO, P.S. **Morfologia e ADNmt nos marsupiais Marmosops incanus e Micoureus paraguayanus (Didelphimorphia, Didelphidae): um teste de diversificação ao longo de gradientes ecológicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade do Estado do Rio de Janeiro. p.133, 2003.

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

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

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P. & MELNICK, D. J. **Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação**. 343-380. In CULLEN JR, L.; RUDRAN, R. & VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**, 2003. p.665.

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

PUSEY, A; WOLF, M. Inbreeding avoidance in animals. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 11, p. 201-206, 1996.

RAÍCES, D. S. et al. **Dispersão de sementes pelo marsupial *Didelphis aurita* (*Didelphimorphia*) em uma área de Mata Atlântica na Ilha Grande**. In: Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro de Mastozoologia. Belo Horizonte, MG, 2003. p.107.

RAND, D. M. The units of selection on mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 32, p. 415-448, 2001.

RALLS, K.; BRUGGER, K.; BALLOU, J. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. **Science**. v. 206, p. 1101-1103, 1979.

RALLS, K.; BALLOU, J. Effects of inbreeding on infant mortality in captive primates. **Intern. Journ. Primatol.** v. 4, p. 491-505, 1982.

RICKETTS, T.H. The matrix matters: effective isolation in fragmented landscapes. **American Naturalist**. v. 158, p. 87-99, 2001.

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

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

ROZEN S.; SKALETSKY J. H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

ROSSI, R.V.; BIANCONI, G.V. & PEDRO, W.A. **Ordem Didelphimorphia**. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. 2006. **Mamíferos do Brasil**. Londrina, 2006 p.437.

RUIZ-PESINI E. et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. **American Journal of Human Genetics**. v. 67, p. 682-696, 2000.

SACCHERI I. et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature**. v. 392, p. 491-94, 1998.

SALVADOR, C. et al. **Comparação de hábito alimentar entre populações insulares e continental de gambá, Didelphis aurita, no estado de Santa Catarina**. In: Livro de Resumos do II Congresso Brasileiro de Mastozoologia. Belo Horizonte, MG, 2003. p.106.

SAMBROOK J., FRISCH E., MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Vol 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SCHENEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin: A software for population genetics data analysis**. v. 2000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SINCLAIR A. E. et al. Detecting a genetic bottleneck in Gilbert's Potoroo (*Potorous gilbertii*) (Marsupialia: Potoroidae), inferred from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. **Conservation Genetics**. v. 3, p. 191-196, 2002.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos Renascentes Florestais da Mata Atlântica**, 2008.

SPEILMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 101, p. 15261-15264, 2004.

TALLMON, D. A. et al. Insights into recently fragmented vole populations from combined genetic and demographic data. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 699-709, 2002.

TONHASCA JR. A. **Ecologia e História Natural da Mata Atlântica**. Ed 1, Interciência, 2005.

TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**. v. 33, p. 200-209, 1996.

VANDERMEER J; CARVAJAL R. Metapopulation dynamics and the quality of the matrix. **American Naturalist**. v. 158, p. 211-220, 2001.

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

ZENGERY R. K.; ELDRIDGE D. B. M.; JOHNSTON G. P. Phylogenetics, population structure and genetic diversity of the endangered southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) in south-eastern Australia. **Conservation Genetics**. v. 6, p. 193-204, 2005.

WALLACE, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**. v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WARREN DEAN. **Ferro e Fogo: a História e a Devastação da Mata Atlântica Brasileira**. Ed 1, Companhia das Letras, 2002.

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

WILCOX, B.A.; MURPHY, D.D. Conservation strategy: the effects of the fragmentation on extinction. **The American Naturalist**. v. 125, p. 879-887, 1985.

WILDT, D. E. et al. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**. v. 329, p. 328-331, 1987.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Vol. 3, Experimental results and evolutionary deductions. The University of Chicago Press, Chicago, 1997.