

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



**DIVERSIDADE GENÉTICA DO OURIÇO-PRETO (*Chaetomys*
subspinosus, OLFERS 1818 Rodentia: Erethizontidae)**
PARA AUXILIAR NA ELABORAÇÃO DE SEU PLANO DE
MANEJO

CLAUDINE GONÇALVES DE OLIVEIRA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

CLAUDINE GONÇALVES DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO OURIÇO-PRETO (*Chaetomys subspinosus*,
OLFERS 1818 Rodentia: Erethizontidae) PARA AUXILIAR NA ELABORAÇÃO DE
SEU PLANO DE MANEJO

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

CLAUDINE GONÇALVES DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO OURIÇO-PRETO (*Chaetomys subspinosus*,
OLFERS 1818 Rodentia: Erethizontidae) PARA AUXILIAR NA ELABORAÇÃO DE
SEU PLANO DE MANEJO

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

APROVADA: 20 de Julho de 2005

Dr. Romari Alejandra Martinez Montano
(UESC)

Dr. Thales Renato O. Freitas
(UFRGS)

Prof. Dr. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC – Orientador)

Aos meu pais Manoel e Zenaide,
À minha irmã Emanuelle, Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus, por mais uma graça concedida.

À minha Orientadora Dra. Fernanda Amato Gaiotto e a Dra. Romari Montano Martinez, pela orientação, confiança... palavras são insuficientes para expressar a minha gratidão.

À Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo apoio.

Ao Co-orientador Marco Antônio e a Conselheira Fabienne Micheli, pela ajuda sempre quando necessária.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudo e ao FNMA pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Gaston, pelas coletas dos pelos dos animais e à Professora Deborah Faria, pela grande parceria.

Aos colegas do Mestrado em Genética e Biologia Molecular da UESC, Alayne, Rita, Dori, Sônia, Van, Maiza, Stênio, André, Lívia, Valéria, Ademilde, Márcia e Dahyana, pela convivência harmoniosa.

À todos os colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular e do Laboratório de Citogenética e Marcadores Moleculares da UESC: Jocy, Jeiza, Fabrício, Fernanda Cupertino, Edilson, que sempre estavam dispostos a ajudar.

Ao estudante de graduação Gesoaldo, pela imensa colaboração para realização das reações de amplificação.

Aos meus pais, Manoel e Zenaide, à minha irmã Emanuelle, pelo amor, carinho e apoio constante.

Às amigas Cris e Alayne, pela amizade, companheirismo, palavras... que muitas vezes me confortaram, e pelos bons momentos vividos.

Aos amigos da UESB Paulo, Ana, Ana Angélica, Derval, Cláudio Lúcio e Juvenal, pela amizade e exemplo de força de vontade.

À todas as pessoas que convivi em Ilhéus, Thiago, Juca, Renato, Luciano e, aquelas que mesmo distante me deram a maior força.

À Victor, pela amizade, carinho e dedicação que sempre me deu, dando assim mais brilho na minha vida.

ÍNDICE

EXTRATO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância da espécie.....	3
2.1.1 Taxonomia.....	3
2.1.2 Distribuição e Habitat.....	5
2.1.3 Informações Biológicas.....	5
2.1.4 Status de Conservação.....	5
2.2 Biologia da Conservação e Diversidade Biológica.....	6
2.2.1 Padrões de extinção.....	8
2.2.2 Fragmentação.....	8
2.3 Marcadores Moleculares.....	10
2.3.1. Marcadores RAPD (<i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i>).....	10
2.3.2. Marcadores SPAR (<i>Single Primer Amplification Reaction</i>).....	13
2.4 Análise Molecular de Variância (AMOVA).....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Material Biológico.....	17
3.2 Extração de DNA Total.....	20

3.3	Quantificação do DNA.....	23
3.4	Condições de amplificação.....	23
3.5	Seleção de <i>primers</i>	24
3.6	Teste de repetibilidade de bandas.....	24
3.7	Análise Genética dos Dados.....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	Extração e Quantificação de DNA Total.....	30
4.2	Seleção de <i>primers</i>	33
4.3	Teste de repetibilidade de bandas.....	36
4.4	Análise de estrutura e diversidade genética.....	39
5.	CONCLUSÕES.....	49
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXOS.....	58

EXTRATO

OLIVEIRA, Claudine Gonçalves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2005. **Diversidade genética da espécie de roedor *Chaetomys subspinosus* (ouriço-preto) para auxiliar na elaboração de seu plano de manejo.** Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaborador: Fabienne Micheli.

Chaetomys subspinosus Olfers, 1818 é um roedor de médio porte, endêmico da Mata Atlântica, popularmente conhecido como ouriço-preto. Esta espécie já foi considerada abundante e distribuída do Norte do Rio de Janeiro até o Sul de Sergipe, mas devido à alteração do seu ambiente natural, acredita-se que as populações estejam atualmente em franco declínio. Isto fez com que esta espécie entrasse na lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção dentro da categoria vulnerável. A inclusão na lista revela um panorama preocupante a respeito de suas chances de extinção. A alta taxa de desmatamento e degradação que as florestas têm sofrido podem levar a perda de inúmeras espécies, principalmente pela redução da área de ocorrência e isolamento dos seus habitats originais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética em populações de *Chaetomys subspinosus* nos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo, através de marcadores moleculares RAPD e SPAR. Foram selecionados 23 *primers* polimórficos, totalizando 47 marcadores dominantes a partir dos testes de amplificação com 77 *primers* RAPD e 10 *primers* SPAR. As análises de diversidade genética foram

realizadas através do método de Análise de Variância Molecular (AMOVA) e do método de agrupamento utilizando-se uma matriz de similaridade de Jaccard. O valor encontrado do $\phi_{ST} = 0,20$ indica que 20% da variabilidade genética encontra-se entre populações e 80% da variabilidade está mantida dentro de populações. As análises de agrupamento reuniram amostras coletadas das populações da Bahia e Sergipe, indicando que tais populações tiveram ancestrais comuns num passado não muito distante. Entretanto, com as modificações ambientais, a população original tornou-se fragmentada e, atualmente apresenta altas taxas de endogamia devido a subdivisão. A principal hipótese para explicar o aumento da endogamia seria a ocorrência de gargalo genético e de pouco fluxo entre elas. Um resultado inesperado foi o agrupamento de nove indivíduos da Bahia, coletados em cidades distintas, com 100% de similaridade genética. Talvez a ocupação e uso da terra nesta região tenham propiciado a redução drástica da variabilidade genética em seus remanescentes populacionais. Os resultados obtidos são de fundamental importância para a elaboração, em médio prazo, de um plano de manejo para a espécie, baseado não apenas em dados ecológicos e comportamentais, mas também em informações genéticas obtidas ao nível de DNA de *C. subspinosus*.

Palavras – chaves: Variabilidade Genética, Animais Silvestres, Marcadores Moleculares, Conservação, Plano de Manejo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Claudine Gonçalves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2005. **Genetic diversity helping on elaboration of a conservation plan of *Chaetomys subspinosus* (bristle-spined)**. Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Marco Antônio Costa. Colaborador: Fabienne Micheli.

Chaetomys subspinosus is a medium size rodent, endemic from the Atlantic Forest. Its common names are bristle-spined rat or thin-spined porcupine. This species was considered abundant in the past. It was distributed from the North of Rio de Janeiro to the South of Sergipe, but due to alteration of its natural environment, we believe that the populations are currently in decline. This species is in the list of the threatened species of the Brazilian fauna on the vulnerable category . The inclusion in the redlist discloses a preoccupying possibility of extinction. The high degradation that the forests have suffered can take the loss of innumerable species, mainly for the reduction of the area of natural occurrence and isolation of original habitats. The aim of this work was to evaluate the genetic variability in populations of *Chaetomys subspinosus* in the States of Bahia, Sergipe and Espírito Santo, with RAPD and SPAR molecular markers. Twenty-three polymorphic primers had been selected from a total of 77 primers RAPD and 10 primers SPAR, totalizing 47 dominant markers. The analyses of genetic diversity had been carried out through the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and matrix of Jaccard similarity. The estimated value of ϕ_{ST} was 0,20 indicating that 20% of the genetic variation is between populations and

80% is kept within populations. The dendogram grouped collected samples from Bahia and Sergipe, indicating that such populations had a recent common ancestor. However, with the environmental modifications, the original population became fragmented and this subdivision probably increased the coancestry. The main hypothesis to explain the increase of the endogamy would be the occurrence of a genetic bottleneck and the current little gene flow between them. An unexpected result was the grouping of nine individuals from Bahia, collected in different cities, with 100% of genetic similarity. Perhaps the occupation and use of the land in this region has promoted a drastic reduction of the genetic variability in its populations. The results obtained are important for the elaboration of a conservation plan for the species, based not only on ecological and behaviour data, but also on genetic information gotten to the level of DNA of *C. subspinosus*.

Key words: Genetic Variability, Wild life, Molecular Markers, Conservation.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Chaetomys subspinosus</i>	4
Figura 2: Mapa dos municípios e localização das áreas de coleta de <i>C. subspinosus</i> nos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo.	19
Figura 3: Resultado do gel de quantificação do DNA de <i>C. subspinosus</i> utilizando o protocolo CTAB modificado.....	33
Figura 4: Perfil de um gel de RAPD utilizando o <i>primer</i> OP-F13 em 24 indivíduos de <i>Chaetomys subspinosus</i> do Espírito Santo, Bahia e Sergipe.....	34
Figura 5: Perfil de um gel de RAPD utilizando o <i>primer</i> OP-N16 em 24 indivíduos de <i>Chaetomys subspinosus</i> do Espírito Santo, Bahia e Sergipe.....	34
Figura 6: Perfil de um gel de RAPD utilizando o <i>primer</i> OP-U16 em 24 indivíduos de <i>Chaetomys subspinosus</i> do Espírito Santo, Bahia e Sergipe.....	35

Figura 7 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o <i>primer</i> OP-R15 em 6 indivíduos de <i>Chaetomys subspinosus</i> do Espírito Santo para testar a reproducibilidade da técnica RAPD	38
Figura 8: Padrão de similaridade genética obtida entre as três populações de <i>C. subspinosus</i> , definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas distâncias genéticas de Jaccard.....	39
Figura 9: Padrão de Dissimilaridade genética em três populações de <i>C. subspinosus</i> obtida pelo Bood-P para determinar a confiabilidade dos nós a partir de 10.000 <i>bootstraps</i>	41

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características dos animais e Localidades de coleta nos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo	18
Tabela 2: Seqüências dos primers RAPD selecionados para <i>screening</i> em <i>Chaetomys subspinosus</i>	25
Tabela 3: Seqüências dos primers SPAR selecionados para <i>screening</i> em <i>Chaetomys subspinosus</i>	27
Tabela 4: Resumo dos resultados de quantificação e amplificação via RAPD dos protocolos testados para extração de DNA de <i>C. subspinosus</i>	32
Tabela 5: Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) em populações de <i>C. subspinosus</i>	43
Tabela 6: Diferenças genéticas e geográficas entre as subpopulações de <i>C. subspinosus</i> dos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo.....	43

1. INTRODUÇÃO

Chaetomys subspinosus, OLFERS 1818 é um roedor de médio porte e endêmico da Mata Atlântica (SANTOS et al., 1987). Esta espécie é conhecida por vários nomes populares nos Estados do Espírito Santo e Bahia, por exemplo: “Luís-cacheiro”, “Luís-cacheiro-dos-pretos”, “Ouriço-do-espinho-mole”, “Boré” ou “Gandaú” (FONSECA et al., 1994). Trata-se do único representante do gênero, e difere das demais espécies de ouriço por apresentar uma pelagem macia e escurecida cobrindo as costas. Esta espécie já foi considerada abundante, ocorrendo do norte do Rio de Janeiro ao sul do Estado de Sergipe (SANTOS et al., 1987; OLIVER; SANTOS, 1991). No entanto, devido a alteração e redução do seu ambiente natural, acredita-se que as populações desta espécie estejam em declínio. Este quadro fez com que este roedor figurasse na lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção, citada dentro da categoria de vulnerável. A sua inclusão na lista revela um panorama preocupante das chances de extinção desta espécie sob as circunstâncias e tendências atuais. A alta taxa de desmatamento e degradação que as florestas têm sofrido podem levar a perda de inúmeras espécies, principalmente pela redução da área de ocorrência e isolamento dos seus habitats originais.

A fragmentação de habitat, isto é, a sua redução e isolamento das porções remanescentes, resulta num processo de formação de mosaicos de habitats, que incluem fragmentos florestais de diferentes tamanhos, áreas agrícolas e urbanas e que apresentam uma probabilidade reduzida de dispersão e estabelecimento de indivíduos adultos e juvenis da fauna (SANTOS, 1995). Assim, as populações remanescentes sofrem alterações nos padrões de troca de genes e têm sua

variabilidade e estrutura genética alterada (BALLAL et al., 1994). Isolados reprodutivamente, alguns poucos indivíduos, que contêm apenas uma reduzida amostra do conjunto gênico da população original, são os responsáveis por manter a espécie naquela determinada área, causando o que se conhece por efeito “*bottleneck*” (gargalo genético). Após um “*bottleneck*” e com a manutenção de áreas reduzidas, a população, mesmo aumentando seu tamanho físico, sofre contínua perda de alelos, principalmente os raros, devido à deriva genética, caso esta população permaneça isolada por várias gerações (SOUZA, 1997). Quanto menor for o remanescente populacional, maior será a perda da variabilidade genética, uma vez que, grandes fragmentos de florestas naturais abrigam uma percentagem significativa da variabilidade.

No entanto, as prioridades de ação para reverter este processo e assegurar a variabilidade das populações naturais devem estar incluídas numa estratégia de conservação que utilize conjuntamente conhecimentos de genética de populações, comportamento, distribuição e ecologia da espécie.

Para uma análise minuciosa da estrutura e diversidade genética de populações naturais, é recomendado o uso de marcadores moleculares, uma vez que estes constituem poderosa ferramenta para tal fim, tornando os dados mais completos para uma conservação eficaz.

O objetivo da presente dissertação foi avaliar a variabilidade genética em populações de *Chaetomys subspinosus* dos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo, através de marcadores RAPD e SPAR, incorporando a tecnologia de análise genômica com marcadores moleculares ao processo de gerenciamento da variabilidade genética mantida nas populações naturais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da espécie

2.1.1 Taxonomia

Chaetomys subspinosus, OLFERS 1818 (Figura 1), é uma espécie pertencente a classe Mammalia, Ordem Rodentia e Família Erethizontidae, porém, a sua taxonomia, é bastante confusa. Woods (1993) a incluiu dentro do grupo dos Echimyidae, uma vez que, compartilha características anatômicas singulares com todos os ratos-de-espinho como, por exemplo, a retenção dos pré-molares decíduos durante toda a vida e a ausência da artéria carótida interna. Já Mckenna e Bell (1997) e Martin (1994), excluíram o *C. subspinosus* dos Echimyidae e o agruparam com a família Erethizontidae. Os trabalhos mais recentes (CARVALHO, 2000) sustentam que os pré-molares não são retidos na vida adulta, corroborando com a inclusão da espécie na família Erethizontidae.



Figura 1 – *Chaetomys subspinosus*

2.1.2 Distribuição e Habitat

Chaetomys subspinosus é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, cuja distribuição geográfica original se estendia do norte do Estado do Rio de Janeiro até Sergipe. O ouriço-preto ocorre atualmente na Bahia, Sergipe e Espírito Santo. Podem habitar áreas em diferentes estágios sucessionais de Mata Atlântica incluindo as florestas litorâneas de restinga, bordas de matas e cabucas (plantações sombreadas de cacau) (SANTOS et al., 1987; OLIVER; SANTOS, 1991; FONSECA et al., 1994).

2.1.3 Informações Biológicas

Existem poucos estudos sobre a biologia de *C. subspinosus*, mas alguns, mostram que esta é uma espécie de hábitos noturnos, arborícola, solitários, lentos quando caminham de uma árvore para outra. As fêmeas tem apenas um filhote por ninhada, e descansam sobre forquilha (bifurcação de galhos ou folhas), emaranhados de cipós, folhas secas e bromélias presentes em árvores de canela, araçá, palmeiras, entre outras espécies de árvores da Mata Atlântica. A alimentação parece ser baseada em folhas e frutos. Seu horário de maior atividade ocorre no início e no final da noite, passando o resto da noite e do dia dormindo ou descansando, o macho adulto tem aproximadamente 69 cm de comprimento e pode pesar mais de 2 Kg (COIMBRA-FILHO, 1972; SANTOS et al., 1987; OLIVER; SANTOS, 1991, CHIARELLO et al., 1997, FONSECA et al., 1994).

2.1.4 Status de Conservação

O IBAMA, em Instrução Normativa de 03/03 divulgou a Lista das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção, que inclui o Ouriço-preto como espécie vulnerável em função dos critérios utilizados pela IUCN (The World Conservation Union) (2001). Segundo este órgão governamental, o táxon não se enquadra nas categorias “Criticamente em perigo” ou “Em perigo” mas corre um alto risco de extinção na natureza a médio prazo em função do declínio populacional (probabilidade de extinção na natureza em pelo menos 10% em 100 anos) e da área de ocupação extremamente fragmentada e reduzida.

Indivíduos dessa espécie foram registrados em diversas unidades de conservação na Bahia e Espírito Santo. Entretanto, não se sabe qual o tamanho das populações dentro destas áreas e nem se estão submetidas a pressões ou ameaças. Na situação atual é impossível saber se estas unidades de conservação, por si só, são capazes de garantir o futuro do Ouriço-preto. Esta conclusão é baseada na evidente redução do hábitat disponível para esta espécie, uma vez que a Mata Atlântica atualmente encontra-se reduzida a menos de 7% da sua cobertura original. Além disso, a maior parte dos remanescentes florestais deste bioma encontra-se fragmentada, causando o isolamento das subpopulações ali presentes (SANTOS et al., 1987, OLIVER; SANTOS 1991; CHIARELLO et al., 1997).

2.2 Biologia da Conservação X Diversidade Biológica e Genética

Diversas comunidades biológicas, que necessitaram de milhões de anos para se desenvolver, vêm sendo devastadas, freqüentemente por ações do homem em todo o planeta. As transformações pelas quais os sistemas naturais estão passando devido às atividades humanas são inúmeras. Muitas espécies tiveram suas populações diminuídas rapidamente, algumas até o ponto de extinção (WILSON; PETER, 1997). Muitas das ameaças à diversidade biológica são sinérgica; ou seja, vários fatores independentes, tais como incêndio, corte e transporte de madeiras além de caça predatória que combinados e multiplicados, tornam a situação ainda pior (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Assim, a biologia da conservação tem por objetivo: entender os efeitos da atividade humana nas espécies, comunidades e ecossistemas, e desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção de espécies e, se possível, reintegrar as espécies ameaçadas ao seu ecossistema funcional (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A expressão diversidade biológica traz idéia do conjunto da variabilidade ecológica e da variabilidade genética. A variabilidade ecológica é o número de espécies de uma comunidade e suas interações. E a variabilidade genética refere-se a diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie. O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece material básico para a seleção natural e, portanto, para evolução das espécies (SOLÉ-CAVA, 2001).

A variação genética acontece porque os indivíduos têm combinações alélicas diferentes. A diversidade genética dentro de uma espécie é freqüentemente afetada pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos dentro das populações. Embora as mutações forneçam o material básico para a variação genética, espécies que se reproduzem sexualmente favorecem a reorganização dos alelos, em diferentes combinações, aumentando substancialmente seu potencial de variação genética (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética. Essa variação é ampliada continuamente nas populações por mutação, migração ou recombinação de indivíduos de outra população e pode ser reduzida através da deriva genética, do endocruzamento e de seleção natural (NEI, 1987). A quantidade de variação genética em uma população é determinada tanto pelo número de locos em seu *pool* genético, quanto pelo número de alelos para cada loco polimórfico. A variabilidade genética possibilita que as espécies se adaptem a um meio ambiente modificado. As espécies de tamanho populacional pequeno têm, em geral, menos variação genética do que as espécies comuns e, conseqüentemente, são mais vulneráveis à extinção quando as condições do meio ambiente se alteram (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Muitas mudanças na diversidade genética podem acontecer por deriva genética, sendo que o principal fator influenciando a deriva é o tamanho efetivo populacional. Portanto, os níveis de diversidade no nível genético são um ponto de

equilíbrio entre ganho e perda de variabilidade genética. Uma vez perdida, a variabilidade genética só é recuperada muito lentamente por mutação ou migração (SOLÉ-CAVA, 2001).

2.2.1 Padrões de extinção

Extinção é um processo constante, exigindo uma adaptação contínua das espécies no ambiente modificado. Acredita-se que este é um dispositivo que abre continuamente os nichos para espécies novas, gerando fontes para atuação da seleção natural e do crescimento da diversidade biológica. O processo evolutivo das comunidades não tem sido estável mas, sim, caracterizado por períodos de alta especiação, seguidos de períodos de mudanças mínimas e episódios de extinção em massa. A maior extinção em massa já ocorrida foi no final da época permiana (250 milhões de anos atrás) quando se estima que 77%-96% de todas as espécies de animais marítimos foram extintos (SEPKOSKI; RAUP, 1995; WILSON, 1989).

Uma espécie pode levar à extinção de outra espécie através da predação, ou pode evoluir para outra, como resposta às mudanças ambientais ou devido a mudanças ocasionais em suas combinações de genes. Os fatores determinantes da permanência ou desaparecimento de determinadas espécies não são totalmente claros, mas a extinção, tanto quanto a especiação, é parte do ciclo natural (PRIMARCK; RODRIGUES, 2001).

A especiação é um processo lento que ocorre através da acumulação gradual de mutações e modificações das frequências dos alelos em dezenas de milhares ou, quem sabe, milhões de anos. À medida que a taxa de especiação se torna igual ou excede à taxa de extinção, a biodiversidade permanece constante ou aumenta. Entretanto, as atividades humanas estão causando extinção em uma proporção que excede, em muito a taxa de reposição de espécies (PRIMARCK; RODRIGUES, 2001).

2.2.2 Fragmentação de hábitat

Quando o habitat é destruído, fragmentos geralmente são deixados para trás. Estes fragmentos são freqüentemente isolados uns dos outros, por uma paisagem altamente modificada ou degradada. Esta situação pode ser descrita pelo modelo de biogeografia de ilhas, com os fragmentos funcionando como ilhas de habitat (SANTOS, 1995).

Os fragmentos dos remanecentes diferem do habitat original de dois modos: (1) têm uma quantidade maior de borda por área de habitat, (2) o centro de cada habitat está mais próximo dessa borda (PRIMACK ; RODRIGUES, 2001).

O aumento drástico na quantidade de borda forma microambientes completamente diferente daquele do interior da floresta. Alguns dos efeitos de bordas mais importantes são um aumento nos níveis de luz, temperatura, umidade e vento (PRIMACK ; RODRIGUES, 2001). Estes efeitos de borda são evidentes até 500m para dentro da floresta, porém mais notáveis nos primeiros 35m (RODRIGUES, 1998). Uma vez que as espécies de plantas e animais são freqüentemente adaptadas de forma precisa a certa temperatura, umidade e níveis de luz, qualquer mudança nestas condições poderão eliminar espécies dos fragmentos de floresta alterando assim a composição das comunidades (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A fragmentação do habitat também ameaça a existência de espécies de maneira mais sutil. Primeiro, a fragmentação pode limitar o potencial de uma espécie para dispersão e colonização. Conseqüentemente muitas espécies não recolonizam os fragmentos após a população original ter desaparecido (LOVEJAY et al., 1986).

A fragmentação florestal, além de isolar reprodutivamente indivíduos que contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original (gargalo genético), pode causar contínua perda de alelos devido à deriva genética, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (SOUZA, 1997). As predições teóricas indicam que quando se têm poucas gerações, o efeito de gargalo genético apresenta-se mais acentuado e mais facilmente detectável. (YOUNG et al., 1996).

Quanto menor for o remanescente populacional, maior será a perda da variabilidade genética, visto que a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorece a perda de variação genética. A população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que a

mesma possa ter continuidade e evolução normais. Nessa população pequena pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes diferentes daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos, podendo reduzir a aptidão da espécie, inviabilizando o remanescente populacional. Em longo prazo, há alta probabilidade de redução da riqueza alélica e um aumento considerável no número de indivíduos homozigóticos na população (ELLSTRAND; ELLAN, 1993; KAGEYAMA et al., 1998).

As alterações decorrentes da fragmentação contribuem para a erosão da variação genética e aumento da divergência genética entre populações por meio do aumento do índice de fixação entre populações (F_{ST}), redução do fluxo gênico e aumento da probabilidade de extinção local, podendo inviabilizar o remanescente populacional (YOUNG et al., 1996).

2.3 Marcadores Moleculares

Diferentes técnicas de Biologia molecular têm sido empregadas com sucesso para revelar polimorfismo genético ao nível de DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de comprimento de fragmento de restrição de DNA (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*). No final da década de 80, o desenvolvimento do processo de amplificação de DNA *in vitro* (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987) levou ao desenvolvimento de outras classes de marcadores genéticos.

Para um uso eficiente dos marcadores moleculares em estudos genéticos deve-se considerar a base genética do polimorfismo revelando os aspectos técnicos dos métodos e, as vantagens e limitações de cada marcador (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

2.3.1. Marcadores RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*)

Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade molecular em populações de plantas e animais, essas metodologias diferenciam-se pela técnica utilizada para avaliar a variabilidade em nível de DNA.

Descrito por Williams et al. em 1990, a tecnologia RAPD foi desenvolvida para otimizar e tornar mais rápido o mapeamento genético em plantas. Trata-se de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987), com algumas modificações que foram introduzidas visando ampliar a quantidade de marcadores polimórficos e estender o potencial de utilização. A principal modificação foi à utilização de um único *primer*, ao invés de um par de *primers*. Este *primer* se anela em locais de seqüências arbitrárias no genoma, para iniciar a reação de síntese de fragmentos de DNA, não requerendo nenhuma informação precisa acerca da seqüência de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. O tamanho do *primer* também é menor (10pb contra geralmente 20pb numa PCR específica) e a temperatura de anelamento é reduzida para aproximadamente 35°C (WELSH; McCLELLAND, 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os marcadores RAPD podem estar dispersos por todo o genoma, garantindo uma ampla amostragem do DNA do indivíduo, sem evidência de agrupamento de marcadores em regiões específicas facilitando a obtenção de fragmentos localizados tanto em seqüências repetitivas do genoma, como em regiões codificadoras (WILLIAMS et al, 1990). Marcadores RAPD têm sido muito empregados no estudo de variabilidade genética em populações naturais. Eles são tecnicamente mais simples que outros tipos de marcadores, facilitando o estudo de um grande número de locos, ampliando o uso de tecnologia de análise genômica mesmo para espécies sem histórico de interesse comercial.

Os marcadores RAPD têm como vantagens: i) a habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, gerando uma grande quantidade de polimorfismo, ii) o baixo custo, iii) rapidez, iv) facilidade de uso, v) consistência, vi) capacidade multiplex (amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo). Além disso, identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; MILACH, 1998), A principal desvantagem dos marcadores RAPD é o fato de possuírem herança dominante, ou seja, não é possível a detecção de genótipos heterozigotos. Estes marcadores são interpretados de forma binária (presença ou ausência da

banda) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, os RAPDs também tem limitações significantes quando comparados com marcadores codominantes, pois a dominância limita algumas inferências, especialmente em estudos de organismos diplóides, e podem fornecer algum viés em alguns parâmetros genéticos (LYNCH; MILLIGAN, 1994), além de apresentar, se analisados sem a devida cautela, problemas de reprodutibilidade (KARP et al., 1996).

Weeden et al. (1992), analisaram a reprodutibilidade do RAPD usando diferentes concentrações dos componentes da reação e observaram que a qualidade do DNA tem um grande efeito na geração e resolução do produto amplificado. DNA isolado com quantidades significantes de polissacarídeos e composto fenólico tornam o DNA impuro e não adequado para a reação produzindo bandas fracas. A concentração desse DNA pode variar de 3 a 30ng por reação de 25µl não afetando o padrão de amplificação. Já as concentrações de *Primer* e Mg^{+2} podem variar de 2 a 5 µm e ainda manter o padrão de amplificação. A partir destes testes os autores concluíram que o processo de amplificação é sensível aos parâmetros testados e estes afetam seriamente a reprodutibilidade da técnica. Porém, se forem mantidas constantes as temperaturas dos ciclos de amplificações, as concentrações dos reagentes (dNTPs, BSA, Taq e primers) e do DNA, assim como o *ramping* do termociclador, os marcadores são reproduzíveis. Dados semelhantes foram obtidos por Pérez, et al., (1998) quando verificaram que a temperatura de anelamento não altera o padrão de repetição das bandas marcadores, sendo que em temperaturas mais altas (45°C) as bandas mais claras, observadas em amplificações com temperaturas mais baixas (35°C), são eliminadas, mas as bandas marcadores são repetidas nas duas temperaturas de anelamento.

De maneira geral, poucos estudos com mamíferos utilizam exclusivamente marcadores moleculares do tipo RAPD para análise da diversidade genética. Na literatura foram encontrados alguns exemplos que utilizam esta técnica exclusiva com mamíferos. González Ittig et al. (2002) utilizaram esta técnica para detectar bandas espécie específicas em roedores do gênero *Calomys*. Já, Bowland, et al. (2001) obtiveram fenogramas comparando quatro populações naturais de zebras, habitando em três fragmentos de pequeno tamanho (entre 98 ha e 2190 ha) e um maior (>66.000 ha) objetivando propor um plano de manejo com manutenção da

diversidade ainda existente nestas populações. Almeida et al. (2000) fizeram uma análise de RAPD afim de estimar a distância genética em populações de *Nectomys squamipes* e detectou uma diferenciação significativa entre populações. Na Rússia, foram utilizados marcadores RAPD para comparar populações naturais de leopardos (*Panthera pardus*) com aquelas existentes em zoológicos, a fim de determinar se a diversidade genética natural estava sendo mantida nas populações de leopardo mantidas em cativeiro. A conclusão foi que apenas uma pequena porção da variabilidade genética desta espécie esta sendo mantida nos zoológicos da Rússia (CHELOMINA et al., 1999). Chiappero e Gardenal (2001), usaram RAPD para estimar a estrutura genética de populações naturais do roedor *Calomys musculinus*, considerado reservatório do agente etiológico da febre hemorrágica Argentina e concluíram que esses valores eram considerados altos e são compatíveis com moderado nível de fluxo gênico entre populações.

2.3.2. Marcadores SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*)

A facilidade de obter e triar marcadores de DNA é essencial para eficiência de programas de conservação assistidos por marcadores moleculares. Reações de amplificação do DNA genômico com *primers* simples ou *Single Primer Amplification Reactions* (SPARs) é uma outra maneira de obter marcadores de DNA de forma rápida e simples (GUPTA et al., 1994). Trata-se de um marcador que utiliza *primers* que se anelam em regiões microssatélites e amplificam fragmentos não repetitivos do genoma sob estudo.

Seqüências simples repetidas de microssatélites (SSR), ocorrem quando di-, tri-, tetra- e penta- nucleotídeos apresentam-se em tandem repetidos de 4 a 40 vezes. As regiões estão presentes e distribuídas uniformemente em genomas eucarióticos. Essas repetições tem sido encontradas entremeadas em várias combinações de dois ou mais SSRs bem como com outras seqüências simples ou multicópias. Das repetições mais estudadas, $(GT)_n$, $(GA)_n$, $(GATA)_n$ e $(GACA)_n$, o número de cópias $(GT)_n$ por genoma haplóide varia de 100 cópias em leveduras a 100.000 cópias em genomas de ratos. E o número de cópias de tetranucleotídeos

repetidos (GATA)_n é aproximadamente 10.000 no genoma de rato (GUPTA et al., 1994).

Altos níveis de polimorfismo em plantas e vertebrados podem ser observados por meio dos SSR para detectar variações no número de repetições encontradas dentro de um *motif* de microssatélites por *primers* desenhados flanqueando-o. Entretanto, esta estratégia requer informações da seqüência de regiões do DNA flanqueando o microssatélite para que o *primer* específico que amplifica aquele loco marcador possa ser desenhado. A seqüência não repetitiva que flanqueia um microssatélite (AG)_n, por exemplo, varia de uma espécie para outra. Desta maneira, este marcador não pode ser utilizado rapidamente para uma espécie silvestre. A menos que, para a espécie alvo, já exista na literatura *primers* SSR desenvolvidos (GUPTA et al., 1994).

Dada a atração pelos SSRs devido a abundância e distribuição em genomas eucarióticos, Gupta et al, em 1994 desenvolveram *primers* baseados em SSRs e usados como marcadores em genomas eucarióticos evolutivamente diversos. A amplificação é realizada via PCR e a peculiaridade da técnica é o emprego de um único *primer* com a seqüência repetitiva de um microssatélite. Assim como os marcadores RAPDs, os marcadores SPARs apresentam herança dominante e não foi, até o momento, descrito problemas com a reproducibilidade das bandas mesmo com variações grandes nas condições de amplificação, sendo esta considerada uma grande vantagem da técnica.

Marcadores SPAR têm sido empregados recentemente na caracterização de peixes neotropicais, em especial da ordem Gymnotiformes. Fernandes-Matioli et al., (2000) analisaram os padrões de amplificação dos fragmentos de DNA nuclear flanqueados por microssatélites (GGAC)_n do gênero *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes), e observaram os padrões de amplificação obtidos através da técnica de SPAR e que refletiu a distribuição das seqüências repetitivas simples no genoma nuclear das espécies, uma vez que foram encontradas bandas de amplificação espécie-específico utilizados na análise da distribuição geográfica e diversidade da espécie *Gymnotus*.

2.4 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (HAMRICK, 1982).

A caracterização da estrutura genética entre populações, através de marcadores moleculares dominantes pode ser abordada pelas estatísticas análogas as estatísticas F de Wright, denominada estatísticas ϕ (EXCOFFIER et al., 1992).

Informações sobre a divergência de DNA de dados provenientes de haplótipos foram incorporadas na forma de análise de variância, derivada da matriz de distância quadrada entre todos os pares de haplótipos. Esta análise de variância, denominada AMOVA, produz estimativas dos componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright. Estas refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Desta forma, permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre populações (ϕ_{ST}).

O método acomoda diversos tipos de matrizes de entrada fornecidas por diferentes tipos de marcadores moleculares, e alguns tipos de pressuposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica de análise. A significância dos componentes de variância e das estatísticas ϕ , é dada através do uso de permutações. Os autores, ao aplicarem esta análise a dados de haplótipos de DNA mitocondrial humano verificaram que as subdivisões de populações são melhor resolvidas se alguma medida de diferença molecular entre haplótipos for introduzida na análise. Segundo os autores, a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares (ZUCCHI, 2002).

O primeiro trabalho realizado usando esta metodologia com marcadores dominantes foi feito por Huff et al. (1993). Eles estudaram a variação genética entre e dentro de populações naturais de *Buchioe dactyloides*, baseando-se em dados provenientes de quatro populações do México e duas do Texas (EUA).

Alguns estudos com animais utilizaram AMOVA para detectar a variabilidade genética entre dentro de populações, tais como: populações de sapos – *Rana ridibunda* – (ZEISSET; BEEBEE, 2003), de cnidários – *Nematostella vectensis* – (PEARSON et al., 2002), de gambás - *Isoodon obesulus* - (COOPER, 2000). Existem relatos na literatura sobre o uso de análise de variância molecular para quantificar a variabilidade genética em roedores. Almeida et al. (2000) analisaram a variação genética proporcionada pela subdivisão da população para a espécie *Nectomys squamipes*; Chiapero e Gardenal (2001) analisaram para populações de *Calomys musculinus* e Vucetich et al. (2001) para populações de *Peromyscus maniculatus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

O material para o presente estudo é originado de seis áreas do estado da Bahia (Itacaré, Una, Uruçuca, Ilhéus, Salvador, Amargosa e Cachoeira), uma de Sergipe (Santa Luzia do Itanhi) e uma do Espírito Santo (Parque Estadual Paulo César Vinha). As populações aqui consideradas referem-se aos Estados onde as amostras foram coletadas, assim considerou-se para fins de análise, três populações totalizando 27 indivíduos, sendo 6 indivíduos do Espírito Santo, 19 indivíduos da Bahia e 2 indivíduos de Sergipe. Os municípios amostrados e as áreas de coletas estão relacionados na Figura 2 e na Tabela 1.

As capturas de exemplares da espécie *Chaetomys subspinosus*, mediante autorização concedida pelo IBAMA, foram feitas através de campanhas diurnas de procura ativa dos animais no período entre 15 de março e 15 de abril de 2005, em fragmentos de Mata Atlântica, priorizando a busca em habitat e locais de maior probabilidade de avistar e encontrar a espécie (habitats de vegetação baixa e possíveis sítios de repouso como emaranhados de cipós, tabocais, ocos e bromélias). Após a localização de um exemplar, a árvore em que se encontrava era escalada, e o animal era desprendido da vegetação através de sua contenção pela cauda, e sua imobilização pelo pescoço, com o auxílio de luva de couro.

Tabela 1 - Características dos animais e Localidades de coleta nos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito

Indivíduo	Sexo	município	localidade	bioma	hábitat	localizaçõx	localizaçõy
25	F	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
26	F	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
27	F	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
29	*	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
31	*	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
32	*	Guarapari-ES	Parque Estadual Paulo César vinha	Mata Atlântica	*	2057045	04040899
B	F	Ilhéus-BA	Faz. Morro das pedras, Povoado de Ribeira das Pedras	Mata Atlântica	borda de brejo	482827	8380239
C	F	Ilhéus-BA	Faz. Morro das pedras, Povoado de Ribeira das Pedras	Mata Atlântica	borda de brejo	482719	8380373
D	F	Ilhéus-BA	Faz. Corumbá	Mata Atlântica	capoeira (em borda de mata)	475439	8380784
E	M	Itacaré-BA	Faz. Bom Sossego	Mata Atlântica	interior de mata seca (capoeira)	479770	8399918
F	F	Uruçuca - BA	Faz. Georgia	Mata Atlântica	borda de mata (tabocas)	473920	8396138
G	F	Itacaré-BA	Faz São José	Mata Atlântica	cacau cabruca	488151	8404289
H	F	Itacaré-BA	Faz São José	Mata Atlântica	cacau cabruca	488151	8404289
I	M	Itacaré-BA	Faz São José	Mata Atlântica	cacau cabruca	488151	8404289
J	M	Ilhéus-BA	Povoado de Ribeira das pedras	Mata Atlântica		481287	8378495
L	F	Una- BA	Faz. Bolandeira	Mata Atlântica	restinga (borda)	493795	8300616
M	*	Una- BA	Faz. Bolandeira	Mata Atlântica	restinga (borda)	493850	8300616
N	*	Ilhéus-BA	UESC				
P	M	Uruçuca - BA	Faz.em frente ao Parque do conduru	Mata Atlântica	borda de mata	485160	8397970
Q	F	Uruçuca - BA	Faz.em frente ao Parque do conduru	Mata Atlântica	pasto(casa de farinha)	485145	8397970
R	*	Ilhéus-BA	Faz Vitória	Mata Atlântica			
D1	F	Salvador-BA	Praia do Forte, Reserva Sapiranga	Mata Atlântica	restinga (interior)	604177	8610944
D2	M	Santa Luzia do Itanhi-SE	Faz. Crasto, Povoado Crasto	Mata Atlântica	capoeira (em borda de mata)	672669	8741524
D3	M	Santa Luzia do Itanhi-SE	Faz. Crasto, Povoado Crasto	Mata Atlântica	capoeira (em borda de mata)	672669	8741524
D4	M	Cachoeira-BA		Mata Atlântica	borda de mata	509270	8602296
D5	M	Amargosa-BA	Faz.Riacho do Timbó	Mata Atlântica	capoeira (em borda de mata)	427290	8550942
Y	F	Una- BA	Faz. Bolandeira	Mata Atlântica	restinga (borda)	493813	8300637

* dados faltantes

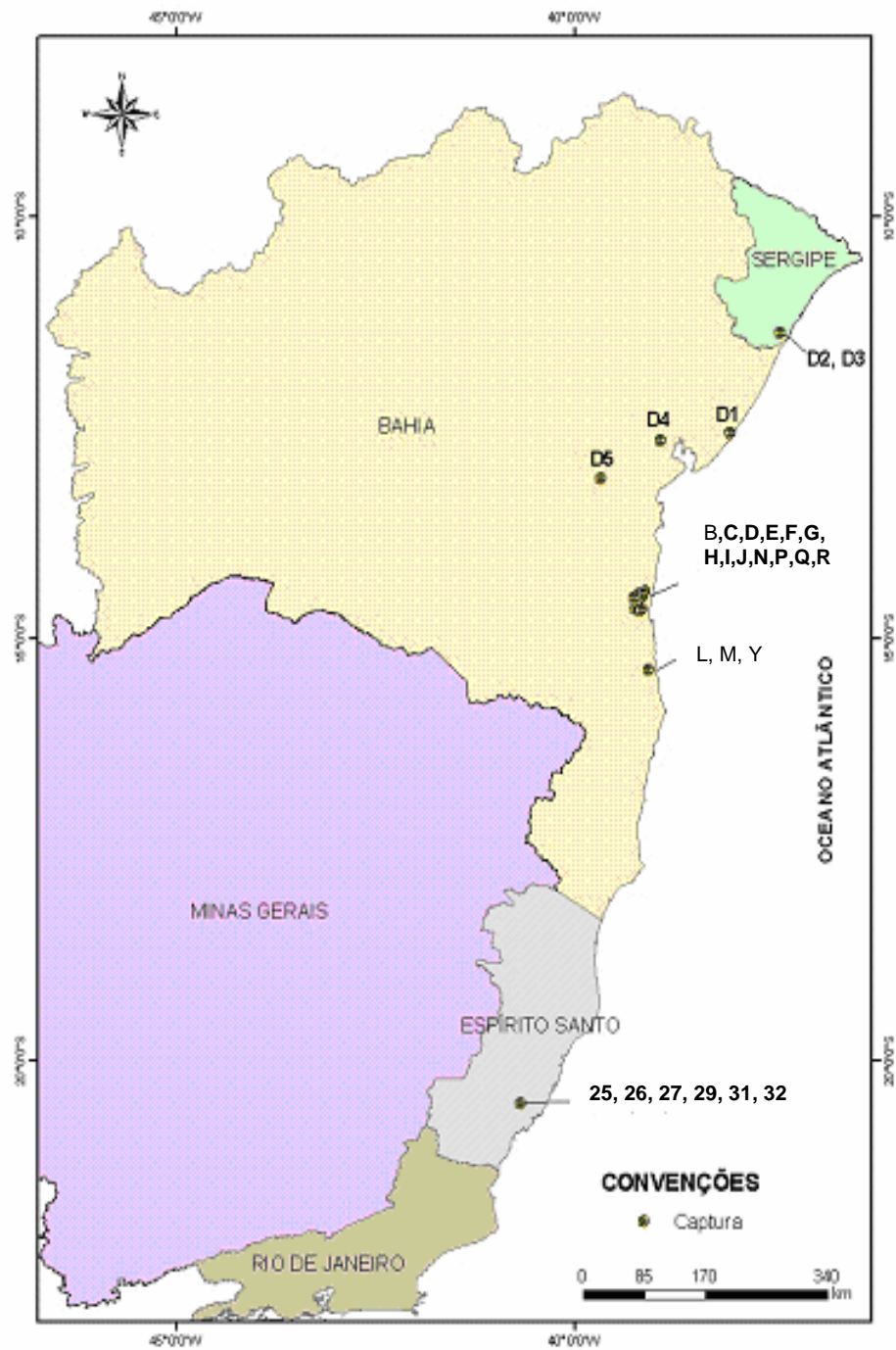


Figura 2 – Mapa dos municípios e localização das áreas de coleta de *C. subspinosus* nos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo.

3.2 Extração de DNA total

Para a extração de DNA do *Chaetomys subspinosus* foram utilizados os seguintes protocolos:

1) Protocolo de CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) para extração de DNA descrito por Doyle e Doyle (1987): Coletou-se 10 bulbos pilosos de, macerou-os em eppendorf de 1,5 ml com 700 µl de CTAB (vide anexo). Os tubos foram deixados por uma hora em banho-maria 65°C. Após a retirada do banho-maria, deixou-se as amostras esfriando sobre a bancada por 5 minutos e em seguida acrescentou-se 600 µl de clorofórmio-alcoól isoamílico (24:1). As amostras foram invertidas por 100 vezes e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante, colocou-se em novo tubo Eppendorf autoclavado, adicionou-se 400 µl de isopropanol, inverteu suavemente as amostras e deixou-se no freezer a -20°C por uma hora. Após o tempo de repouso, centrifugou-se os tubos por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e aos tubos, adicionou-se 800 µl de etanol 70% para lavar. Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12.000 rpm. Repetiu-se esta operação por duas vezes e a última lavagem foi efetuada com etanol absoluto. Após a centrifugação, os tubos foram deixados sobre a bancada para secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 20 µl de TE com RNase (10µg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos.

2) Protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) com três modificações independentes nas quantidades a saber: i) Dobrou-se a quantidade de bulbos pilosos, utilizando-se 20 bulbos e não 10 como descrito anteriormente; ii) reduziu-se as quantidades das soluções à metade; iii) Dobrou-se as quantidades de pêlos e simultaneamente reduziu-se as quantidades das soluções à metade. Após as modificações supracitadas o procedimento foi idêntico ao já descrito anteriormente.

3) Protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) com a adição da proteinase K, enzima que degrada todas as proteínas deixando o DNA exposto para ser extraído.

Foi colocado em 50 µl proteinase k (0,01mg/mL), 20 bulbos pilosos de *C. subspinous* e 500µl do tampão de lise (Tris-HCl 1M pH8.0, NaCl 5M, SDS 10%, EDTA 0,5M) (Vide anexo) e levados ao banho-maria por duas horas a 55°C. Após as duas horas, foi adicionado 350µl de tampão CTAB e deixado mais duas horas no banho-maria a 65°C. Após a retirada do banho-maria acrescentou-se 300 µl de clorofórmio, inverteu-se as amostras por 100 vezes e centrifugou-se os tubos por 10 minutos a 12.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e colocou-o em novo tubo eppendorf autoclavado, adicionou-se 200 µl de isopropanol, inverteu-se suavemente e deixou-se no freezer a -20°C por uma hora. Após o tempo de precipitação no freezer, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 12.000 rpm, descartou o sobrenadante. Ao *pellet* formado adicionou 400 µl de etanol 70% e centrifugou por 10 minutos a 12.000 rpm. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Após a segunda centrifugação, adicionou-se 400 µl de etanol absoluto e centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12.000 rpm. As amostras foram deixadas sobre a bancada para secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 20 µl TE com RNase (10µg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos.

4)Protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) aumentando o tempo de exposição da amostra à temperatura ótima da proteinase K, para que esta tenha melhor desempenho de atividade, mudando de duas horas a 65°C para *overnight* a 65°C e adicionando o β-mercaptoetanol ao tampão de extração (CTAB), uma vez que este impede a oxidação do DNA durante a extração. Foram colocados em 50 µl proteinase k (0,01mg/µL), 50 bulbos pilosos de *C. subspinous* 500µl do tampão de lise (Vide anexo) e levados ao banho-maria por quatro horas a 65°C. Após as quatro horas, foi adicionado 500µl de tampão CTAB, 1µl de β-mercaptoetanol e deixado mais duas horas no banho-maria a 65°C. Posteriormente seguiu-se os mesmos passos citados no protocolo anterior, número 3.

5)Protocolo de extração de DNA pelo método fenol-cloroformio (SAMBROOK et al., 1989). Inicialmente, colocou-se 50µl de proteinase K (0,01mg/µL), 500µl de tampão de lise e deixou – se duas horas a 55°C. Após a retirada do banho-maria, adicionou-se 550 µl de fenol, agitou-se e centrifugou-se 10 minutos a 3.000 rpm. O

sobrenadante foi retirado, passado para novos tubos Eppendorf autoclavados e adicionou-se 550µl de clorofórmio:fenol 1:1,. agitou fortemente e centrifugou-se 10 minutos a 3.000 rpm. Adicionou - se 550µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. Agitou fortemente e centrifugou-se 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e passado para outros tubos Eppendorf autoclavados. Adicionou-se 500 µl de etanol absoluto gelado e 100µl de acetato de sódio 3M (AcNa), misturou devagar e centrifugou-se 10 minutos a 3.000 rpm. Descartou o sobrenadante, deixou-se secar o pellet e ressuspendeu-se em 60µl de TE com RNase (10µg/mL) e incubou a 37° C por 30 minutos.

6)Protocolo de extração utilizando Brazol®, que é um reagente comercial com a combinação de fenol e tiocinato de guanidina, os quais inibem imediatamente a atividade de RNase. As células presentes na amostra biológica são lisadas através deste reagente e, após homogeneização, o produto resultante é separado em duas fases aquosa e orgânica através da adição do clorofórmio e posterior centrifugação. Seguindo as recomendações do fabricante, colocou-se em um tubo Eppendorf autoclavado 50 bulbos pilosos e 300µl de Brazol®, agitou-se os tubos por inversão por 2 minutos e adicionou-se 50 µl de clorofórmio. Centrifugou-se a 12.000 rpm a 4°C por 12 minutos e transferiu o sobrenadante para novos tubos Eppendorf autoclavados contendo 300 µl de isopropanol gelado. Agitou-se os tubos por inversão por 2 minutos e centrifugou-se a 12.000 rpm a 4°C por 18 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em TE com RNase.

7)Protocolo do Brazol® com adição de proteinase K. Colocou-se em um tubo Eppendorf autoclavado 50 bulbos pilosos, 50 µl de proteinase K (0,01mg/µL) e 300µl de Brazol®, e seguiu os passos recomendados pelo fabricante descritos anteriormente no protocolo número 6.

8)Protocolo de extração de DNA por meio do Chelex® (WALSH et al, 1989). Colocou-se 20 bulbos pilosos e 200 µl de Chelex® 5.0% em um tubo estéril, agregou-se 2 µl de proteinase K (0,01mg/µL) e incubou 2 horas a 56°C. Após o período de incubação, agitou-se em vórtex a alta velocidade por 5-10 segundos,

centrifugou-se a amostra a 13.000 rpm por 20 segundos, selou-se com parafilm e colocando-os em água fervente por 8 minutos. Após a fervura, agitou-se em vortex a alta velocidade por 5-10 segundos, centrifugou-se a 13.000 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, colocou-se em novo tubo Eppendorf estéril e a amostra estava pronta para ser utilizada.

3.3 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA de cada indivíduo foi realizada por meio de comparação com DNA padrão de concentração conhecida. Para tanto, foram aplicados em cada poço do gel 2µl de DNA e 2 µl de tampão de carregamento 6x (sacarose 1,6M, azul de bromofenol 1,6mM) (vide anexo), ao lado de concentrações conhecidas de DNA de fago λ (10, 50 e 100 ng/µl). Foi então, realizada eletroforese em gel de agarose 1.0% com tampão de corrida TBE 1x (Tris-base 8,9 mM, ácido bórico 88mM, EDTA 10 mM) (vide anexo) e visualizado na luz UV após coloração com brometo de etídeo ($2,5 \times 10^{-4}$ mg/ml). Posteriormente, o DNA foi diluído em água MiliQ estéril para 2,5 ng/µl para ser utilizados nas reações de RAPD e SPAR.

3.4 Condições de amplificação

Posteriormente a diluição do DNA, as reações de amplificação foram montadas e colocadas em termociclador GeneAmp®PCR System 9700 (PerkinElmer), num volume de 13 µl contendo: 1,3 µl de tampão 10x com MgCl₂ já incluído (Tris 1M pH 8.3, MgCl₂ 1M, KCl), 1,3 µl l de dNTPs à 2,5 mM, 1,04 de BSA (*Bovine Serum Albumin*) à 2,5 mg/mL, 3 µl de *primer* à 5ng/µl, 0,2 µl de taq polimerase a 5 u/µl, 3,42 µl de água miliQ autoclavada e 3 µl de DNA a 2,5 ng/µl. As reações foram submetidas a 40 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 92°C por 2 minutos, seguido de ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2

minutos a 72°C. Ao final dos 40 ciclos foi realizada uma extensão de 5 minutos a 72°C.

O produto resultante das amplificações foi aplicado em gel de agarose 1,5%, e submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 1x (vide anexo). O ladder 1Kb (Invitrogen) (10 µl de uma solução de 66ng/µl) foi usado como marcador de peso molecular. Após visualização, o gel foi fotografado sob luz UV pelo fotodocumentador EDAS 24.0 da KODAK

3.5 Seleção de *Primers*

Foi feito o “*screening*” de 77 *primers* RAPD de Kits da Operon Technologies (Tabela 2) e 10 *primers* SPAR sintetizados pela Operon Technologies (Tabela 3). Para a verificação do perfil de amplificação dos *primers* foram utilizados seis indivíduos da população do Espírito Santo.

3.6 Teste de repetibilidade de bandas

Para testar a reproducibilidade de bandas amplificadas por marcadores RAPD, foram realizadas reações de amplificação em dias distintos mantendo o mesmo *primer* e as mesmas condições de amplificação, concentração dos reagentes e temperatura de anelamento, excetuando-se o DNA que foi utilizado de amostras do mesmo indivíduo, porém extraído em diferentes dias. Ou seja, testou-se se a extração distinta de DNA de uma mesma amostra influenciava nos resultados RAPD, uma vez que é sabido que as condições de amplificação não podem ser alteradas para que se mantenha o mesmo padrão de marcadores (WEEDEN et al., 1992).

Tabela 2 – Seqüências dos primers RAPD selecionados para fazer *screening* em *Chaetomys subspinosus*).

Primer	Seqüência 5' – 3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCSC
OPA-04	AARCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG *
OPA-06	GGTCCCTGAC
OPA-07	GAAACGGGTG *
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-20	GTTGCGATCC
OPB-02	TGATCCCTGG
OPB-03	CATCCCCTG
OPB-09	TGGGGGACTC
OPB-18	CCACAGCAGT
OPC-05	GATGACCGCC
OPD-14	CTTCCCAAG
OPD-20	ACCCGGTCAC
OPE-03	CCAGATGCAC
OPE-06	AAGACCCCTC
OPE-12	TTATCGCCCC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-13	GGCTGCAGAA *
OPG-01	CTACGGAGGA
OPG-07	GAACCTGCGG *
OPG-08	TCACGTCCAC
OPG-11	TGCCCGTCGT *
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPH-12	ACGCGCATGT
OPH-14	ACCAGGTTGG
OPI-02	GGAGGAGAGG *
OPJ-01	CCCGGCATAA
OPJ-11	ACTCCTGCGA

Continuação...

Primer	Seqüência 5' – 3'
OPJ-12	GTCCCGTGGT
OPJ-13	CCCACTACC
OPJ-19	GGACACCACT
OPJ-20	AAGCGGCCTC *
OPK-03	CCAGCTTAGG *
OPK-04	CCGCCCAAAC
OPK-08	GAACACTGGG
OPK-09	CCCTACCGAC
OPK-18	CCTAGTCGAG
OPM-01	GTTGGTGGCT *
OPM-08	TCTGTTCCCC
OPM-16	GTAACCAGCC
OPM-18	CACCATCCGT *
OPM-20	AGGTCTTGGG
OPN-01	CTCACGTTGG *
OPN-10	ACAACCTGGGG
OPN-11	TCGCCGCAA *
OPN-16	AAGCGACCTG *
OPP-16	TCGGCGGTTT *
OPQ-05	CCGCGTCTTG *
OPQ-12	AGTAGGGCAC
OPQ-13	GGAGTGGACA *
OPR-08	CCCGTTGCCT *
OPR-11	GTAGCCGTCT
OPR-13	GGACGCACCG
OPR-15	GGACAACGAG *
OPR-16	CTCTGCGCGT
OPS-14	AAAGGGGTCC
OPT-17	CCAACGTCGT
OPT-20	GACCAATGCC
OPU-15	CAGGGCCAGT
OPU-16	CTGCGCTGGA *
OPV-04	CCCCTCACGA
OPV-09	TGTACCCGTC
OPX-03	TGGCGCAGTG *
OPX-06	ACGCCAGAGG
OPX-09	GGTCTGGTTG

Continuação...

Primer	Seqüência 5' – 3'
OPX-13	ACGGGAGCAA *
OPZ-20	ACTTTGGCGG
OPW-12	TGGGCAGAAG *
OPW-18	TTCAGGGCAC
OPW-19	CAAAGCGCTC *
OPY-20	AGCCGTGGAA

(*) primers selecionados para análise de variabilidade genética

Tabela 3 – Seqüências dos primers SPAR selecionados para fazer *screening* em *Chaetomys subspinosus*.

Primer	Seqüência 5' – 3'
SPAR 1	ACTGACTGACTGACTG *
SPAR 2	CGGCGGCGGCGGGCGGGCGGG
SPAR 3	AGGAGGAGGAGGAGGAGG
SPAR 4	TGGATGGATGGATGGATGGA
SPAR 5	TGTCTGTCTGTCTGTCTGTC
SPAR 6	GACAGACAGACAGACA *
SPAR 7	TTTATTTATTATTTATTTA
SPAR 8	GATAGATAGATAGATA
SPAR 9	GACACGACACGACACGACAC
SPAR 10	GACTGACTGACTGACTGACT

(*) primers selecionados para análise de variabilidade genética

3.7 Análise genética dos dados

A partir da leitura dos géis, os indivíduos foram “genotipados” quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Após este procedimento gerou-se uma planilha de dados binários em excel. A estimativa da similaridade genética, entre as populações foi obtida por matrizes de similaridade com base nos marcadores RAPD e SPAR, utilizando o índice de similaridade de Jaccard (1901) que é descrito conforme a expressão abaixo:

$$J = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

- a- Número de marcadores presentes em ambos indivíduos, simultaneamente.
- b- Número de marcadores presente no 1º indivíduo e ausente no 2º.
- c- Número de marcadores presente no 2º indivíduo e ausente no 1º.

As bandas ausentes nos dois indivíduos sob análise não são consideradas para efeito de estimativas de similaridade entre pares de amostras, uma vez que a ausência de bandas RAPD pode não denotar eventos evolutivos equivalentes (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995)

Os dados da matriz foram agrupados feneticamente pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*), que considera a média dos valores de similaridade da matriz de Jaccard (1901). Foi calculada a correlação cofenética de Mantel (r), entre a matriz de distância genética e o dendrograma. O programa NTSYS - pc versão 1.8 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1992) foi utilizado para efetuar tais análises. A confiabilidade dos nós do dendrograma construído, por população, foi baseada em 10.000 *bootstraps*. A análise de agrupamento foi realizada com o auxílio do programa Bood-P (COELHO, 2003)

A decomposição da variância molecular entre e dentro populações e a estimação do parâmetro ϕ_{ST} , análogo ao F_{ST} de Wright (1951) foi realizada através

do método de AMOVA (Análise de Variância Molecular) utilizando as distâncias ao quadrado conforme descrito por (EXCOFFIER et al., 1992) com o auxílio dos programas AMOVA-PREP (MILLER, 1998) e Winamova (EXCOFFIER et al., 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a serem apresentados a seguir referem-se a um tipo de abordagem jamais realizada para roedores da Mata Atlântica e animais que estão na lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Dos poucos trabalhos de genética de roedores publicados, nenhum apresenta formas efetivas de utilização desta informação para auxiliar na conservação de espécies silvestres. Com os dados gerados, no presente, será possível integralizar dados genéticos a ecológicos e comportamentais para a realização de um plano de manejo e conservação desta espécie vulnerável a extinção.

4.1 Comparação entre métodos de extração e quantificação do DNA

A possibilidade de analisar geneticamente um grande número de indivíduos depende inicialmente da capacidade de extrair seu DNA em qualidade e quantidade adequadas de forma rápida e eficiente. Uma das considerações mais importantes em qualquer procedimento de extração de DNA é a maneira utilizada para coletar e preservar o tecido. Os cuidados iniciais durante a coleta e armazenamento podem reduzir em muito os problemas encontrados mais tarde na qualidade do DNA que, em geral, resultam da degradação devido ao uso de material mal preservado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Para *C. subspinosus*, observou-se que a

maneira de armazenar os pêlos estava influenciando no rendimento do DNA. Para contornar este problema a alternativa foi extrair o DNA de todos os bulbos assim que o material chegasse do campo.

A literatura descreve vários procedimentos de extração para tecido a fresco, sangue e células em cultivo, o que se pode observar é que geralmente são utilizados protocolos padrão com algumas modificações a fim de solucionar os problemas específicos da espécie em estudo. Porém, para a espécie *C. subspinosus* não existia nenhum estudo genético prévio e, conseqüentemente, nenhum método de extração estabelecido, portanto foram necessárias otimizações e padronizações dos protocolos baseando-se em protocolos utilizados para outras espécies, essa padronização da extração de DNA foi realizada apenas com alguns dos protocolos disponíveis na literatura para evitar várias coletas simultâneas de pêlos.

O fato da espécie está classificada como vulnerável à extinção pela IUCN (2001) e a facilidade de *stress* dos animais ao serem manuseados pelos coletores, proporcionou a escolha de amostras não-invasiva para a extração do DNA, uma vez que, não é necessário aplicação de anestesia no animal e retirada de tecido do animal _ pedaço da cauda, falanges.

O protocolo de extração com CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987), Protocolo 1, apresentou um rendimento de DNA muito baixo para os indivíduos coletados, uma vez que não foi possível a visualização de banda em gel de qualidade para uma possível quantificação. Mesmo quando a amostra concentrada, sem conhecimento da quantidade de DNA, foi amplificada com *primers* RAPD não foi possível a visualização de bandas no gel. As outras metodologias testadas (Protocolos 5, 6, 7 e 8) apresentaram visualização de bandas apenas quando era feita a amplificação via RAPD. Porém não foram utilizados já que o fenol é muito tóxico e o rendimento não era suficiente para todas as amplificações necessárias para uma análise estatística considerada adequada para o tipo de abordagem proposto. Já o protocolo de CTAB modificado (Protocolo 4) possibilitou a visualização de bandas no gel de qualidade (Tabela 4). Acredita-se que o incremento na quantidade de DNA obtida após a utilização deste protocolo está associado à adição da Proteinase K e do β -mercaptoetanol. A Proteinase K tem a função de degradar todas as proteínas deixando o DNA exposto, e o β -mercaptoetanol, evita a oxidação do DNA. Desta

forma, o escolhido como o protocolo padrão para as extrações de DNA de *Chaetomys subspinosus* por método não invasivo foi o tratamento do bulbo piloso com proteinase K *overnight* a 65°C seguido de extração por CTAB (Protocolo 4). O rendimento médio foi de 25ng/μl e estas amostras foram armazenadas no freezer – 20°C (Figura 3).

Tabela 4: Resumo dos resultados de quantificação e amplificação via RAPD dos protocolos testados para extração de DNA de *C. subspinosus*. A coluna **A**, indica a quantificação no gel de agarose 1.0% e a coluna **B**, a observação de bandas após amplificação via RAPD

Método	A	B
CTAB 2hs (10 bulbos)	–	–
Metade do protocolo CTAB 2hs (10 bulbos)	–	–
CTAB 2hs (20 bulbos)	–	–
Metade do protocolo CTAB 2hs (20bulbos)	–	+
Metade do protocolo CTAB 2hs+PK 2hs (55°C)	–	+
PK 4hs (65°C)+ ½ CTAB 2hs +β-mercaptoetanol	+	+
PK <i>overnight</i> (37°C)+ Metade do protocolo CTAB2hs +β-mercaptoetanol (30 bulbos)	–	+
Fenol	–	*
Brazol® (50bulbos pilosos)	–	+
Brazol®+PK (50 bulbos pilosos)	–	+
Chelex® (20 bulbos pilosos)	–	+

Uma das grandes vantagens do método CTAB é que não exige preparação previa do tecido e é adaptável a vários tipos de tecido. Além disso, ele pode facilmente acomodar uma grande variação de quantidades iniciais de tecido desde quantidades da ordem de miligramas de tecido até várias gramas de tecido fresco (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995).

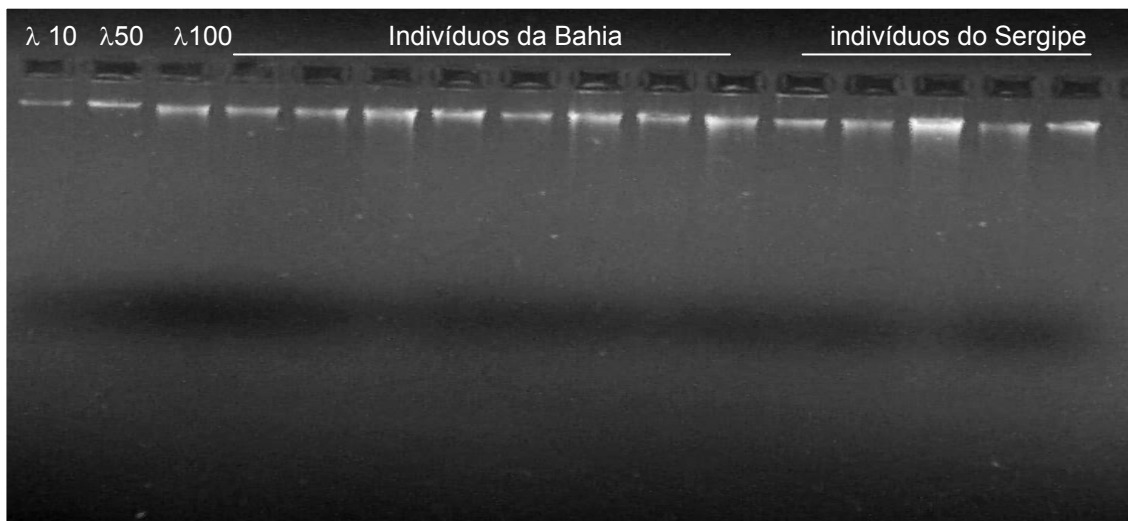


Figura 3: Resultado do gel de quantificação do DNA de *C. subspinosus* utilizando o protocolo CTAB modificado, sendo que nos três primeiros poços do gel estão os marcadores de concentração lambda de 10, 50 e 100 ng/ μ l, respectivamente; nos nove poços seguintes estão amostras de indivíduos da Bahia e nos quatro últimos estão amostras dos indivíduos de Sergipe.

4.2 Seleção de *primers*

Do total de 77 primers RAPD analisados, 23 foram selecionados porque geraram o maior número de bandas polimórficas facilmente interpretáveis e reproduzíveis. Dos 10 primers SPAR testados dois (SPAR 1 e SPAR 6) apresentaram resultados satisfatórios. Na Tabela 3, pode-se verificar a seqüência dos *primers* selecionados e nas Figura 4, 5 e 6 pode-se observar o perfil dos *primers* OP-F13, OP-N16 e OP-U16 para indivíduos de *C.subspinosus*.

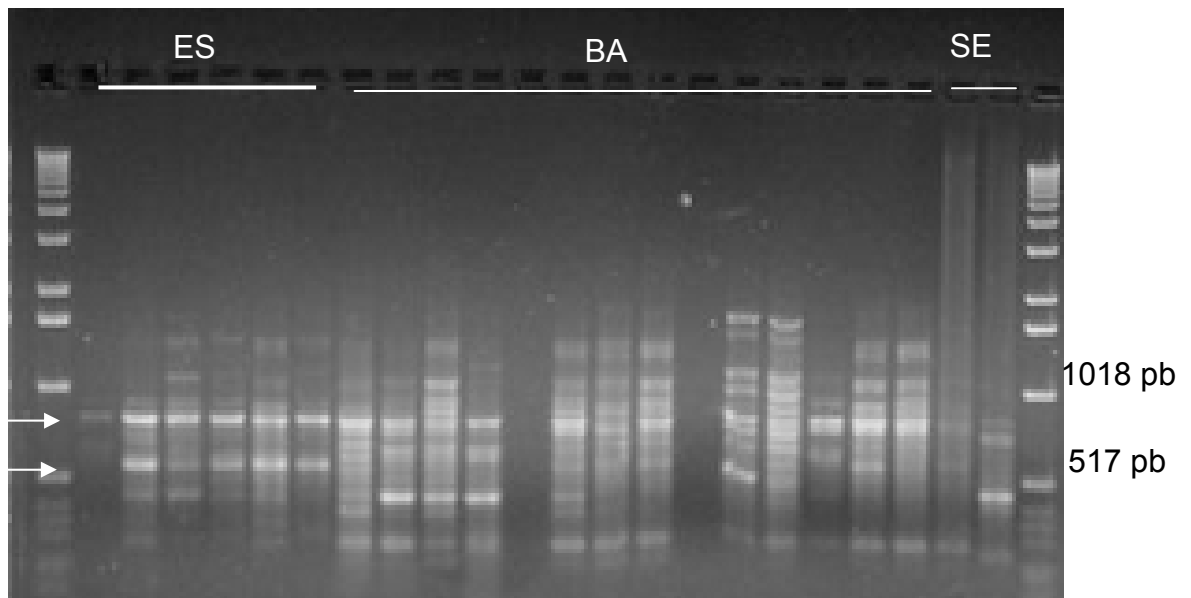


Figura 4 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OP-F13 em 24 indivíduos de *Chaetomys subspinosus* do Espírito Santo, Bahia e Sergipe. Nas extremidades está o DNA padrão de fragmentos com tamanhos conhecidos (ladder 1 kb) e as setas indicam as bandas marcadoras analisadas.

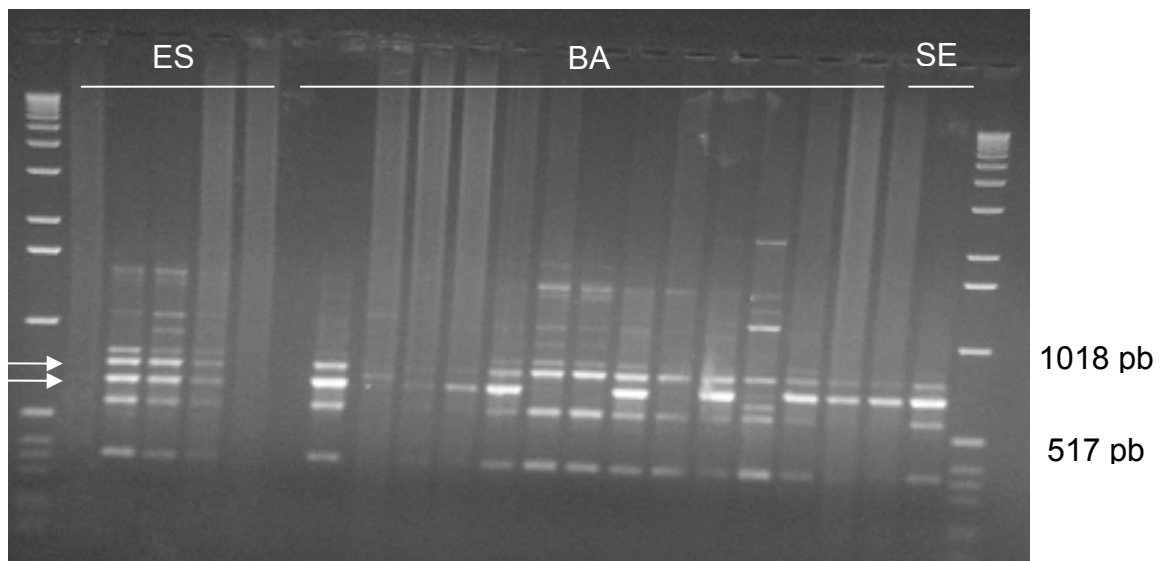


Figura 5 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OP-N16 em 24 indivíduos de *Chaetomys subspinosus* do Espírito Santo, Bahia e Sergipe. Nas extremidades está o DNA padrão de fragmentos com tamanhos conhecidos (ladder 1 kb) e as setas indicam as bandas marcadoras analisadas.

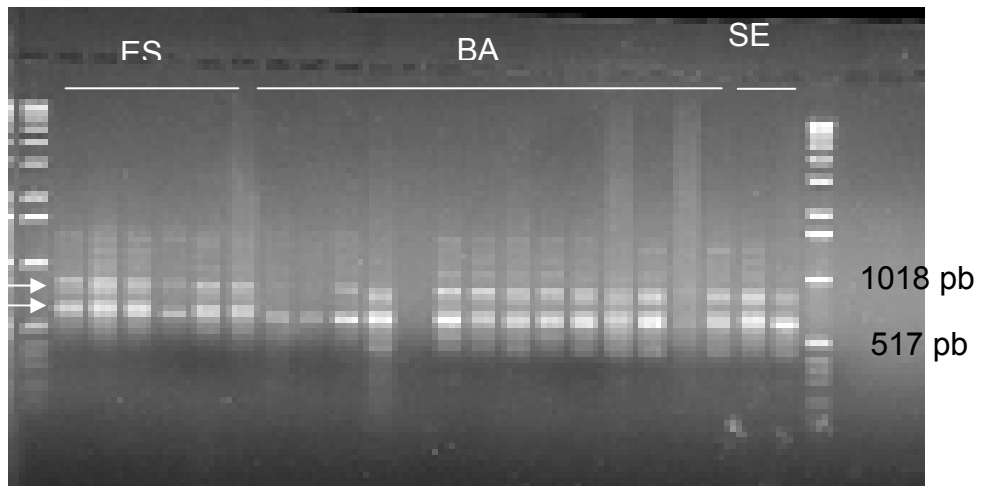


Figura 6: Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OP-U16 em 24 indivíduos de *Chaetomys subspinosus* do Espírito Santo, Bahia e Sergipe. Nas extremidades está o DNA padrão de fragmentos com tamanhos conhecidos (ladder 1 kb) e as setas indicam as bandas marcadoras analisadas.

4.3 Teste de repetibilidade de bandas

Os marcadores moleculares tipo RAPD e SPAR são ainda considerados uma das opções mais baratas e rápidas para acessar a variabilidade ao nível do DNA. São considerados especialmente úteis em análises intraespecíficas. Os marcadores RAPD têm a vantagem de amplificar tanto regiões do genoma que podem ser transcritas e/ou traduzidas, como regiões não-codificantes. Por outro lado, o RAPD ainda é criticado por muitos pesquisadores que o consideram pouco reproduzível.

As desvantagens quanto ao uso dos marcadores RAPD, estão relacionadas com a baixa informação por loco, uma vez que é um marcador dominante, e a falta de reproduzibilidades das bandas. A insuficiência de informação por marcador pode ser minimizada com a utilização de um grande número de *primers* a fim de contornar os problemas estatísticos para marcadores dominantes e gerar maior número de bandas marcadoras. Já para driblar a falta de reproduzibilidade, utilizam-se critérios mais rígidos no momento da interpretação dos resultados (PÉREZ, et al., 1998).

No presente estudo esses problemas foram contornados utilizando 47 marcadores RAPD. Em estudos semelhantes encontrados na literatura, foram amostrados de 20 a 120 pontos do genoma (PÉREZ, et al., 1998). Estes autores mostram a necessidade de se amostrar muitos locos dominantes para suprir o problema do baixo conteúdo informativo por loco.

Também foram realizadas amplificações de um mesmo *primer* mais de uma vez, em dias diferentes e utilizando amostras de DNA também extraídos em dias diferentes, a fim de observar a repetibilidade dos marcadores (Figura 7). Além disso, a análise dos dados foi bastante criteriosa, uma vez que apenas bandas marcadoras com certeza de repetibilidade ao se fazer uma outra amplificação seguindo o mesmo procedimento foram selecionadas. Desta forma elegeram-se apenas duas ou três bandas marcadoras por gel o que corresponde de 20% a 30% do total de bandas amplificadas seguindo as recomendações feitas por Pérez et al. (1998). Estes autores, avaliando a repetibilidade de bandas de RAPD em *Cervus elaphus*, *Sus scrofa* e *Drosophila melanogaster* observaram que 23%, 36% e 26% respectivamente das bandas eram repetidas.

Chiappero e Gardenal (2001) mostraram a reproducibilidade e a herança de marcadores RAPD para detectar altos níveis de polimorfismo tendo grande utilidade para determinar a estrutura genética de populações de *Calomys musculinus*. Assim, nota-se que o marcador RAPD tem sido utilizado com sucesso para análises de variabilidade genética em animais, inclusive roedores.

Resultado semelhante ao obtido para *C. subspinosus* pode ser observado no trabalho de Pearson et al. (2002) em que relataram que a repetibilidade é aumentada quando as bandas mais fracas são omitidas da contagem, pois, estas variam em múltiplas corridas. Assim, estes autores estabeleceram um protocolo controle, no qual era feito ampliações de 5 indivíduos para cada *primer* 10 vezes e selecionava apenas as bandas mais fortes sendo que, as escolhidas apresentavam 100% de repetibilidade.

Nusser, et al. (1996), testaram a reproducibilidade dos marcadores RAPD quando avaliaram a variabilidade genética em populações de pássaros (*Rallus longirostris levipes*). Para testar a reproducibilidade das ampliações, uma parte das reações eram repetidas pelo menos quatro vezes e as bandas polimórficas eram contadas só se o padrão de polimorfismo fosse observado repetido. Um terço das bandas polimórficas analisadas seguia este critério e era usada na análise de todos os pássaros e revelou que o marcador RAPD detectou polimorfismo do DNA entre e dentro de populações. No caso do presente trabalho, a repetibilidade de marcadores foi comparada numa amostra de 6 indivíduos com 8 *primers*. Apenas as bandas consideradas fortes e de fácil interpretação foram selecionadas como marcadores para todos os 23 *primers* utilizados.

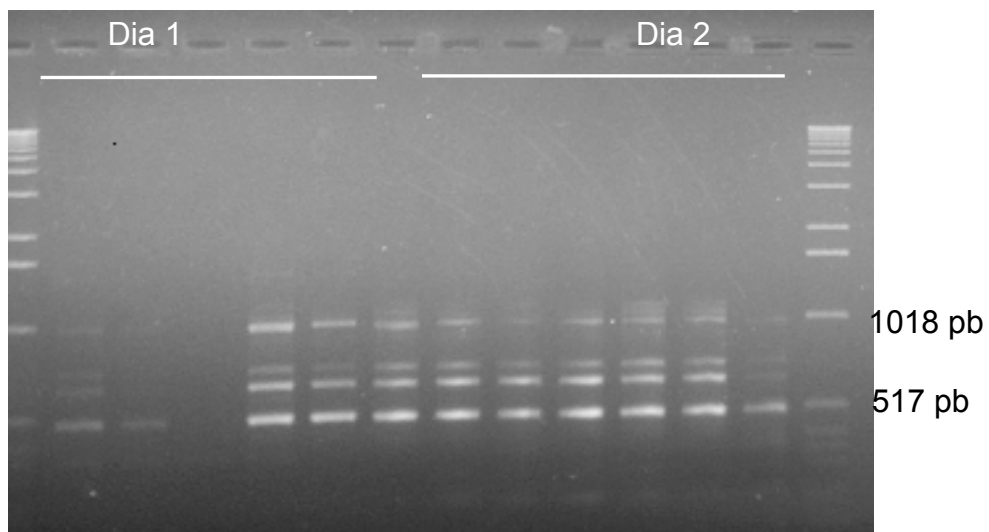


Figura 7 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OP-R15 em 6 indivíduos de *Chaetomys subspinosus* do Espírito Santo, sendo que as amostras utilizadas foram extraídas em dois dias diferentes (1 e 2). Nas extremidades estão fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (ladder 1 kb).

4.4 Análise de estrutura e diversidade genética

As similaridades genéticas médias obtidas a partir do índice de similaridade de Jaccard (1901) variaram entre 25% e 100%. A partir do dendograma, Figura 8, pode-se observar que as populações de Sergipe, norte da Bahia e um indivíduo do Espírito Santo formaram um grupo geneticamente distinto do restante das populações do Espírito Santo e sul da Bahia.

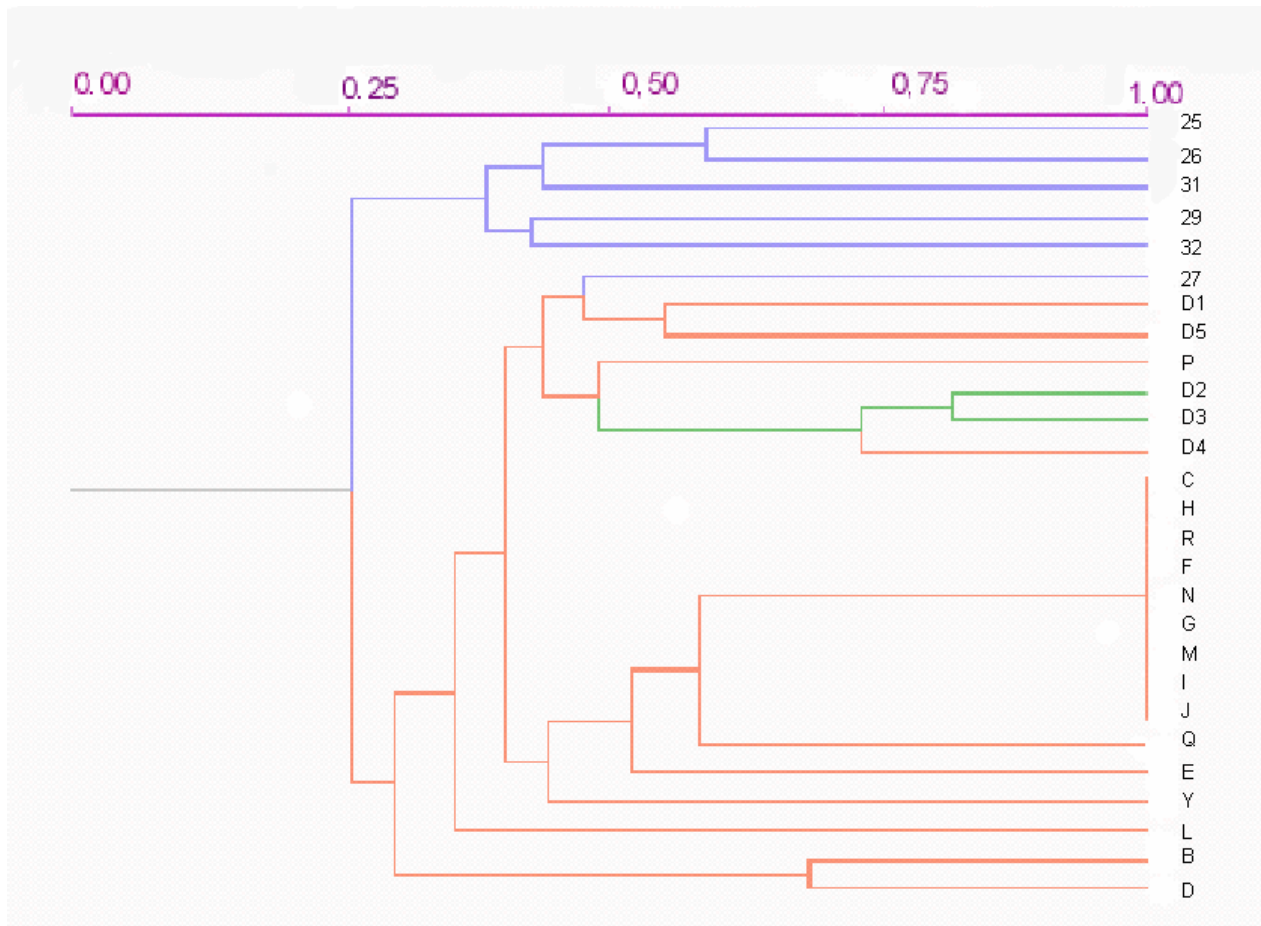


Figura 8 – Dendrograma da similaridade genética obtida entre as 3 populações de *C. subspinosus* definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard. Em azul, população do Espírito Santo, em verde, população de Sergipe e em vermelho população da Bahia,

O valor estimado para a correlação cofenética de Mantel (r), entre a matriz de similaridade genética e o dendograma, foi de 0,683 o que permite discutir os resultados obtidos de posse da figura do dendograma, sem a necessidade de publicar a matriz propriamente dita.

O dendograma obtido (Figura 8) foi considerado consistente, uma vez que, separa três *clusters* de acordo com a distribuição geográfica das populações. Sendo o primeiro grupo formado pela população do Espírito Santo, outro por amostras do sul da Bahia, e um outro grupo formado pelas amostras do norte da Bahia, Sergipe e Espírito Santo.

Neste último, ocorreu o agrupamento de três indivíduos coletados na região mais ao norte da Bahia (P, D1 e D5) com a população de Sergipe (D3 e D4) e o indivíduo 27 da população do Espírito Santo. É importante salientar que as populações de Sergipe e norte da Bahia estão mais próximas geograficamente.

O agrupamento de um indivíduo do ES neste *cluster* pode ser compreendido se problemas inerentes ao marcador molecular forem considerados. Podem ter ocorrido bandas idênticas que conferiram similaridade entre este indivíduo com as populações (BA e SE) que na realidade não existe. Na interpretação, de marcadores RAPD e SPAR, considera-se que a presença de bandas de mesmo tamanho entre indivíduos distintos são oriundas de uma mesma região do genoma e, portanto com histórico evolutivo comum. Entretanto, como se trata de amplificação com primers randômicos, é possível que bandas idênticas estejam localizadas em regiões distintas do genoma, mas possuam o mesmo tamanho em pares de base e, portanto a mesma migração num gel de agarose (homoplasia). Este artefato causaria erro de interpretação que não pode ser contornado pelo pesquisador. Para sanar esta dúvida seria necessária uma análise semelhante utilizando dados de sequenciamento de DNA, como por exemplo, a região do D-loop do mtDNA.

Nove indivíduos da região Sul da Bahia agruparam-se no mesmo ramo (C, H, R, F, N, G, M, I, e J), apresentando similaridade de 100% entre eles considerando os 47 pontos do genoma amostrados nestes indivíduos. Pode-se ainda observar similaridade de apenas 30% entre indivíduos coletados em Una e em Ilhéus (L, B e D).

Para entender a discrepância na similaridade genética obtida entre os indivíduos coletados na Bahia, que apresentaram similaridade 1,0 (indivíduos de Itacaré, Una e Ilhéus -C, H, R, F, N, G, M, I, e J), e outros de Una e Ilhéus (L, B e D), com similaridade 0,3, seria necessário fazer o sequenciamento de regiões pouco conservadas (indicadas para estudos populacionais) do genoma dessas amostras e proceder uma análise mais refinada de distância genética.

As semelhanças genéticas entre indivíduos geograficamente distantes culminando com o agrupamento das populações da Bahia, Sergipe e Espírito Santo (Figura 9), indicam que em algum momento da história evolutiva, existiu um fluxo ou troca de genes entre os indivíduos destas populações. As ações antrópicas, intensificada com o desmatamento da Mata Atlântica nos últimos 30 anos e, conseqüentemente a fragmentação do ambiente original fez com que essas populações se separassem, fisicamente diminuindo o fluxo gênico. A fragmentação causou, provavelmente mudança aleatória na freqüência gênica pela deriva genética e aumento da endogamia.

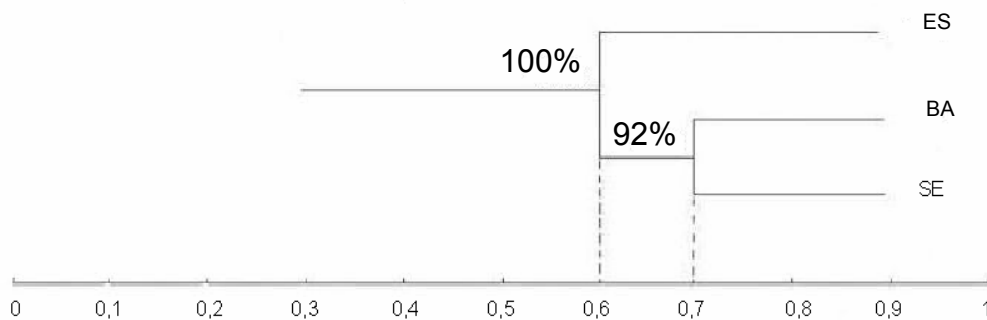


Figura 9 - Padrão de Similaridade genética em 3 populações de *C. subspinosus* obtida pelo programa computacional Bood-P para determinar a confiabilidade dos nós a partir de 10.000 *bootstraps*.

Quando uma população se divide em subpopulações isoladas, existe uma perda da heterozigiosidade. Há formação de pequenos demes, com um tamanho reduzido da população fazendo com que as frequências de determinados alelos, inteiramente ao acaso sejam diferentes quando comparadas às da população maior. Além disso, em cada subpopulação devem ser aumentadas, ou mesmo fixadas pela ação da deriva genética. Estas alterações podem provocar numerosas consequências evolutivas, tais como: a perda da variação genética dentro das populações e a divergência genética entre elas (HARTL; CLARK, 1997; FUTUYMA, 2002).

Assim, a homogeneidade genética observada entre os indivíduos das populações amostradas de *C. subspinosus* pode ser explicada pelo efeito sobre a variação genética de um gargalo (*Bottleneck*) no tamanho populacional. Após o “*bottleneck*”, pode ocorrer que um pedaço de um habitat não ocupado previamente por uma determinada espécie, seja colonizado por um ou poucos indivíduos desta mesma espécie, todos os genes da população assim originado serão derivado daqueles portados pelos indivíduos fundadores e de subseqüentes mutações e imigrações. Mas se o fluxo gênico permanecer restrito, as populações tendem a ter um menor tamanho efetivo e mais endogamia, como resultado, uma maior probabilidade de se diferenciarem ainda mais.

A similaridade genética existente entre BA/SE e ES foi de 60% o que indica uma maior variabilidade genética existente nos indivíduos amostrados no ES.

Com a Análise molecular de variância (AMOVA) foi possível estimar a variação genética existente entre pares de populações (Tabela 5). A elevada variação genética observada entre populações é possivelmente uma consequência da coancestralidade entre indivíduos destas populações, o que é um efeito comum em casos de “*bottleneck*”.

Tabela 5 - Diferenças genéticas (AMOVA) e geográficas entre as subpopulações de *C.subspinosus* dos Estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo

Localidades	Distância geográfica aproximada	Variância Genética
Espírito Santo e Sergipe	1200	0,3863
Sergipe e Bahia	600	0,1852
Bahia e Espírito Santo	800	0,1899

Por meio da análise molecular de variância (AMOVA) baseando-se nos 47 locos polimórficos verificou-se que 19.9% da variabilidade genética está entre populações e 80.01% dentro de populações e o valor de ϕ_{st} foi igual a 0,200 conforme a Tabela 6.

Tabela 6- Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada em três populações de *C. subspinosus* dos estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo

Fontes de Variação	GL	SQ	Percentagem total de variação	P	Estatísticas ϕ_{st}
Entre Populações	2	46.0214	19.99%	<0.0001	0.2
Dentro Populações	24	219.3860	80,01%	<0.0001	1 - ϕ_{st} =0.8
Total	26	265.4074			

Os valores obtidos por meio da AMOVA, Tabela 6, indicam que o índice de endogamia devido à subdivisão da população é alto, ou seja, a probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados nas três populações é considerada alta. Uma vez que, são comparados com valores descritos por Falconer (1987), o qual cita que em populações com sistemas de acasalamento entre irmãos completos, o coeficiente de endogamia esperado (F_{ST}) é de 0,25 e, em populações com sistemas de acasalamento entre meio-irmãos, o coeficiente de endogamia esperado é igual a 0,125. Portanto, observa-se uma redução drástica na base genética do animal, uma vez que, a variabilidade genética existente entre as populações em estudo ou a coancestralidade existente dentro delas, é semelhante aquela existente em famílias de irmãos completos.

Trabalhos realizados com outras espécies de roedores revelaram um ϕ_{ST} bastante diferente do encontrado para *Chaetomys subspinosus*, os quais corroboram com a afirmação de que o ϕ_{ST} encontrado para a espécie pode ser considerado preocupante. Almeida et al. (2000) trabalhando com uma espécie de roedor tida como hospedeiro natural de *Schistosoma mansoni*, o *Nectomys squamipes*, obtiveram valor de $\phi_{ST} = 0,14$, o que indica que 86% da variação total ocorreu dentro de populações e só 14% da variação foi devido a subdivisão da população. Chiappero e Gardenal (2001) encontraram um $\phi_{ST} = 0,127$ para *Calomys musculatus*, também indicando que 87,3% da variação total ocorreu dentro de populações e 12,7% da variabilidade foi devido a deriva.

Esses estudos análogos às estruturas genética de Wright também já foram feitos com outras famílias de mamíferos e mostraram ϕ_{ST} menor do que o obtido para *C. subspinosus*, o que é de se esperar para a maioria das espécies que se encontram em estado bom de conservação genética. Bowland, et al. (2001) caracterizaram a variação genética em zebras (*Equus quagga*) e que a variação genética entre populações foi da ordem de 2.1% e que 97.9% da variação encontrase dentro de populações ($\phi_{ST} = 0,021$). De maneira análoga, Pearson, et al. (2002) analisando a estrutura genética de *Nematostella vectensis stephenson* no Reino Unido, observaram que dados de AMOVA calculados pela matriz de distância Euclidiana, revelaram que 2,96% da variação total era por diferenças entre regiões,

18,81% da variação era devido diferenças entre grupos dentro da população e, 78,24% era visto entre indivíduos dentro das populações.

Porém, avaliações de diversidade genética com outras espécies de animais, detectaram ϕ_{ST} semelhante ao encontrado para *Chaetomys*. Cooper (2000) avaliando a diversidade genética dentro e entre populações de gambás (*Isoodon obseus*) da Austrália, que apresentavam variação no tamanho do corpo associado com o tipo e condições dos habitat onde viviam, por meio da AMOVA verificou significativa subdivisão geográfica, $\phi_{ST}=0,208$, sendo que o padrão da subdivisão era relacionado com a distância física entre os locais e não com as condições de cada habitat, ou seja, não existia fluxo gênico devido as barreiras, o sedentarismo do animal ou, os animais que estavam dispersando não eram assimilados na nova subpopulação. Já Zeizesset e Beebee (2003) em estudos de estrutura genética de rãs (*Rana ridibunda*) na Grã-Bretanha, verificaram valores de 27.4% da variação genética entre populações e 72.6% dentro de populações. Os autores relacionaram o elevado valor do ϕ_{ST} encontrado ao efeito gargalo ocorrido durante a colonização.

Acredita-se que esta elevada endogamia encontrada nas populações de *C. subspinosus* não seja natural da espécie e sim fruto da fragmentação por ação antrópica na região de coleta, principalmente na Bahia.

A perda de variação genética surgindo a partir da redução do tamanho da população (“bottleneck” e endocruzamento) e a possível redução no valor adaptativo, são as maiores preocupações da Biologia da Conservação. Portanto, o declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo à mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolutivo, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção. Além disso, a eficácia dos programas de estabelecimento necessita do conhecimento dos fatores que estão levando ao declínio da população, claramente entendidos e com possibilidades de serem eliminados ou pelo menos controlados.

Técnicas moleculares além de permitirem a identificação de efeitos da fragmentação sobre o complemento genético das populações remanescentes. Também têm sido úteis em programas de manejo e conservação genética de populações naturais. No caso de animais, têm sido recomendadas translocações de indivíduos e acasalamentos programados para ajudar as espécies ameaçadas de

extinção e recuperarem a variabilidade genética perdida e/ou fragmentada em consequência da alteração de seus habitats (SCHNEIDER et al., 2003). Assim esses dados de genética de populações associados com os dados de ecologia da espécie, claramente entendidos, podem salvar a espécie da extinção a partir do estabelecimento de programas de manejo e manutenção das populações para aumentar o seu tamanho populacional e genético.

Um das possibilidades para estabelecer novas populações e assegurar a integridade das mesmas, é a implantação de um programa de reintrodução e translocação da espécie. Translocação é uma medida ativa de manejo de populações selvagens pela qual indivíduos de uma população existente são transportados pelos manejadores para outra localidade. Reintrodução, por sua vez, refere-se ao processo de devolver à natureza indivíduos provenientes de cativeiro, os quais irão, de modo geral, fundar novas populações em áreas de habitat adequado e dentro dos limites de ocorrência original da espécie, porém não ocupado pela mesma. Alguns dos programas de manejo mais importantes envolvendo atividades de translocação e de reintrodução referem-se aos dos micos-leões, o preto e o dourado, realizados pelos projetos Pontal e Poço das Antas, respectivamente (SCHNEIDER et al., 2003).

No caso do manejo de populações de *Chaetomys subspinosus* do presente estudo, uma possível reintrodução e translocação do animal poderá ser feita entre indivíduos da população do Espírito Santo para as populações que apresentaram significativa redução da similaridade genética, Bahia e Sergipe Isso é permitido porque a população do Espírito Santo encontra-se num melhor estado de conservação genética, o qual coincide com o estado de conservação do fragmento da mata. Ou o programa de translocação e reintrodução poderá ser feito entre indivíduos de regiões da Bahia que apresentaram alta variabilidade genética para aqueles locais em que os indivíduos apresentaram significativa redução da similaridade genética.

Faria et al., 2005 (*in press*) relataram que os fragmentos de Mata Atlântica que ainda existem no sul da Bahia não são formados por uma vegetação contínua, mas sim por mosaicos que surgiram dentro de um fragmento maior a partir do uso da terra. Acredita-se que este teve início no período colonial com o corte de madeira

de lei, com o plantio da cana-de-acúcar e na década de 70, com o plantio de cacau (*Theobroma cacao*) dentro da mata pelo sistema agroflorestal cabruca. Já no Estado do Espírito Santo, os poucos fragmentos de Mata Atlântica que ainda restaram são muito bem conservados, uma vez que, tem um histórico de fragmentação mais recente, daí as chances da variabilidade genética da espécie estar maior neste fragmento. Além disso, o sistema de cabruca parece não ser suficiente o bastante para guardar a diversidade genética de *C. subspinosus*, uma vez que não permite conectividade entre os “subfragmentos” por meio de corredores ecológicos, de fato impedindo o fluxo gênico entre indivíduos dessa espécie.

Um caso bem sucedido de programas para conservação de espécie, é o do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). Um estudo prévio realizado no início da década de 90, apontou a existência de 12 grupos de micos-leões-dourados isolados em pequenos fragmentos (de 20ha até 250ha) de Mata Atlântica na região da baixada costeira do Estado do Rio de Janeiro, além da população da Reserva Biológica de Poço das Antas (FERNANDEZ et al., 2003). Usando a Análise de Viabilidade de Populações, Kierulff (1993) concluiu que nenhuma das populações pequenas se manteria por mais tempo do que umas poucas décadas. Esta constatação levou à necessidade de translocar essas pequenas populações para uma área de habitat e tamanho adequados, mas onde os micos-leões não eram encontrados. Esses grupos representavam 11% da população selvagem existente e, provavelmente mais de 11% da diversidade genética retida da espécie, já que os fragmentos estavam relativamente distantes das populações maiores.

Além disso foi detectada uma acentuada estrutura genética das populações analisadas, com uma diferenciação média de 31% e, uma correlação positiva entre variabilidade genética interpopulacional e distância entre os fragmentos, seguindo o modelo de fluxo gênico de isolamento por distância. Esses resultados indicam que a diversidade genética do mico-leão-dourado tem sido perdida especialmente nas populações menores, isto é, quanto menor a população, menor também a diversidade genética encontrada (SCHNEIDER et al., 2003).

Esta constatação levou à necessidade de translocar pequenas populações para uma área de habitat e tamanhos adequados. Entre 1994 a 1997, seis grupos de micos-leões foram translocados e monitorados continuamente à medida que

estabeleciam suas áreas de uso. Vários grupos novos foram formados a partir dos indivíduos que saíram de seus grupos e se juntaram aos micos de outros grupos (FERNANDEZ et al., 2003).

Essas translocações, entretanto, devem ser realizadas com cautela. Quando indivíduos de uma população são inseridos em uma outra geneticamente muito distinta, pode haver incompatibilidade genética com a população receptora, o que pode levar a perdas consideráveis da variabilidade genética. Para evitar este problema, deve-se procurar promover as translocações entre populações residentes em uma mesma região e provenientes de ambientes semelhantes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- Este foi o primeiro trabalho de genética de populações com a espécie *Chaetomys subspinosus* na Mata Atlântica para auxiliar na elaboração de um plano de manejo;
- Os marcadores RAPD e SPAR constituem uma ferramenta útil para análise de variabilidade genética em populações naturais subdivididas em que não há informação de seqüência para a utilização de marcadores codominantes;
- Marcadores RAPD foram considerados reproduzíveis para a análise genética quando apenas algumas bandas, as mais claras e facilmente interpretáveis foram consideradas;
- A elaboração de planos de manejo com informação genética gerada com marcadores pouco informativos é preferível àqueles elaborados sem nenhuma informação genética acerca da espécie. Os resultados possibilitaram prever a aplicabilidade da translocação dos indivíduos do Espírito Santo para a Bahia e Sergipe;

- A estimativa do $\phi_{ST} = 0,20$, foi considerada anormal uma vez que revelou um elevado coeficiente de coancestralidade dos indivíduos existentes nestas populações;
- A inexistência de variabilidade entre algumas amostras coletadas na Bahia pode refletir danos causados pela redução das populações desta espécie pela ocupação e uso da terra na região.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. C.; MOREIRA, M. A . M.; BONVICINO, C. R.; CERQUEIRA, R. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 793-797, 2000.

BALLAL, S.R.; FORÉ, S.A.; GUITTMEN, S.I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in fores fragments. **Canadian journal of botany**, v.72, p.1311-1315, 1994.

BOWLAND, A.E.; BISHOP, K.S.; TAYLOR, P.J.; LAMB, J.; Van der BANK, F.H.; WYK, E.V.; YORK, D. Estimation and management of genetic diversity in small populations of plains zebra (*Equus quagga*) in KwaZulu-Natal, South Africa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p. 563-583, 2001.

CARVALHO, G. Substitution of the deciduous premolar in *Chaetomys subspinosus* (Olfers, 1818)(Hystricognathi, Rodentia) and its taxonomic implications. **Zeitschrift fur Saugetierkunde**, v. 65, p. 187-190, 2000.

CHELOMINA, G.N.; SPIRIDONOVA, L.N.; KOZYRENKO, M.M.; ARTIUKOVA, E.V.; CHELOMIN, I.U.V.; ZHURAVLEV, I.U.N. Use of RAPD-PCR-analysis of cellular DNA for the evaluation of genetic polymorphism and subspecies diagnostics of the Far Eastern leopard *Panthera pardus orientalis*. **Genetika**, v. 35, p. 681-687, 1999.

CHIARELLO, A. G.; PASSAMANI, M.; ZORTÉA, M.. Field Observations on the thinspined porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Echimyidae). **Mammalia**, v. 61, p, 29-36, 1997.

CHIAPPERO, M. B.; GARDENAL, C.N. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population genetic studies of *Calomys musculinus* (Rodentia: Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic fever. **Hereditas**, v. 135, p. 85-93, 2001.

COELHO, A. S. G. **Bood-P: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap (software)**. Goiânia: Universidade federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2003.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Mamíferos ameaçados de Extinção no Brasil**. In: Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Ed. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1972.

COOPER, M. L. Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obsoletus*) populations in Western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 469-479, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissues. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

ELLSTRAND, N.C.; ELLAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual review on ecological systematics**, v.24, p.217-242. 1993.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** v. 131, p.479-91. 1992.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética Quantitativa**. Trad. de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Impr. Univ. UFV, Viçosa, 279p, 1987.

FARIA, D. M., LAPS R. R., BAUMGARTEN, J., CETRA, M. Bat and bird assemblages from forests and shade cacao plantations in two contrasting landscapes in the atlantic forest of southern bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, 2005 (*In press*).

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C., MATIOLI, S.R. e ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)n microsatellite analysis. **Genetics and Molecular Biology**, V. 23, n. 4, p. 803-807, 2000.

FERNANDEZ, F. A . S. et al. **Manejo das populações naturais nos fragmentos**. In: Fragmentação de ecossistemas: casuas, efeitos sobre a diversidade e recomendações de políticas públicas. Denise Marçal Rambaldi e Daniela América Suárez de oliveira (orgs). Brasília:MMA/SBF, 510p,2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA - CENARGEN. p.38-53. 1995.

FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; COSTA, C.M.R; MACHADO, R.B.; LEITE, Y.L.R. (eds). **Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção**. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 1994.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Segunda edição. Riberão Preto: FUNPEC-RP, 2002.

GONZÁLEZ ITTIG, R.E.; CHIAPPERO, M.B.; BLANCO, A.; PROVENSAL, C.; GARDENAL; C.N. Accurate identification of three cryptic species of rodents of genus *Calomys* using RAPD-PCR and MitDNA RFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 425-432, 2002.

GUPTA, M., CHYI. Y. S., ROMERO-SEVERSON, J, OWEN, J.. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.** v 89, p. 998-1006, 1994

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HARTL, D.; CLARK, A . G. **Principles of population genetics**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997

HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchlōe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 927-34, 1993.

IUNC 2001. **IUCN Red List categories: version 3.1.** Prepared by the IUCN species survival commission, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull Soc Vandoise Sci Nat**, v. 37, p.547-579, 1901.

KAGEYAMA, P. Y., GANDARA, F. B., SOUZA, L. M. I. Consequências da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KARP, A.; SEBERG, O; BUIATTI, M. molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annual of Botany**, v.78, n.2,p.2,p.143-149, 1996.

KIERULFF, M. C. M., 1993, Avaliação das populações selvagens de mico-leão-dourado, *Leontopithecus rosalia*, e proposta de uma estratégia para sua conservação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

LOVEJAY, T. E. et al. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments. In M. E. Soulé (ed). Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA, p 257-285, 1986.

LYNCH, M; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD. **Molecular Ecology**, n.3, p. 91-99, 1996.

MARTIN, T. On the systematic position of *Chaetomys susbpinosus* (Rodentia: Caviomorpha) based on evidence from the incisor enamel microstructure. **J. Mammal. Evol.**, v. 2, p. 117-1321, 1994.

McKENNA, M. C.; BELL, S. K. **Classification of Mammals Above the Species Level**. Columbia University Press, New York, 1997.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 187p, 1998.

MILLER, M. P. **AMOVA-PREP**. Department of Biological Sciences - Box 5640 Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640 - mpmm2@nauvax.ucc.nau.edu, 1998.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reactions. **Methods Enzymol.**, v.55, p.335-50. 1987.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, 1987.

NUSSER, J. A .; GOTO, R. M.; LEDIG, D.B.; FLEISCHER, R. C.; MILLER, M. M. RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 463-472, 1996.

OLIVER, W. L. R.; SANTOS, I. B. Threatened endemic mammals of the Atlantic forest region of south-eastern Brazil. **Wildlife Preservation Trust Special Scientific Report** v. 4, p.1-126, 1991.

PEARSON, C.V.M.; ROGERS, A.D.; SHEADER, M. The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2285-2293. 2002.

PÉREZ, P. T.; ALBORNOA, J; DOMINGUEZ, A. na evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1347-1357, 1998.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Ed. dos Autores, Londrina, p.328. 2001.

PRIOR, K. A ., GIBBS, H. L., WEATHEAD, P. J. Population genetic structure in the black rat snake: implication for management. **Conservation Biology**, v. 11, n. 5, p. 1147-1158, 1997.

RODRIGUES, E. **Edge effect on the regeneration of forest fragments in North Paraná**. Tese de PhD – Harvard University. United States of American, 1998.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system vers. 1.70. **Exeter Software**, Setauket, N. Y. 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SANTOS, I.B; OLIVER, W. L.; RYLANDS, A. B.. Distribution and Status of two of tree porcupines. *Chaetomys subspinosus* and *Sphiggurus insidiosus* in south-east Brazil. Dodo, J. Jersey **Wildl. Preserv. Trust** , v.24, p. 43-60,1987.

SANTOS, P.S. Fragmentação de habitats: implicações para a conservação *in situ*. In: ESTEVES, F.A., ed. **Ecologia brasiliensis**, p. 616.1995.

SCHNEIDER, M. P. C. et al. **Genética de populações naturais**. In: Fragmentação de ecossistemas: casuas, efeitos sobre a diversidade e recomendações de políticas públicas. Denise Marçal Rambaldi e Daniela América Suárez de oliveira (orgs). Brasília:MMA/SBF, 510p,2003.

SEPKOSKI, J. J . Jr.; RAUP, D. M. **Periodicity in marine extincyion events**. I D. K. Elliott (ed), Dynamics of extinction. John Willy , New York, p. 3-36, 1995.

SOLÉ-CAVA, A M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: Biologia Molecular e Evolução. Ed Sergio Russo Matioli. Editora Holos, São Paulo, 2001.

SOUZA, L.M.F.I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) – Brasil**. 1997. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 76p .1997.

VUCETICH, L. M.; VUCETICH, J. A . M; JOSHI, C.P.; WAITE, T. A .; PETERSON, R. O. Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in naturally fragmented landscape. **Molecular ecology**, v. 10, p. 35-40, 2001.

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

WALSH, P S; METZGER, D A; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simpleextraction de DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v.10, p. 506-513, 1989.

WEEDEN, N.F., G.M. TIMMERMAN, M. HEMMAT, B.E. KNEEN AND M.A. LODHI. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: **Proc. Joint Plant Breeding Symposium Series**. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science and American Genetic Association. p. 12-17, 1992

WELSH, J; McLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p7213-7218,1990.

WILSON, E. O . Threats to biodiversity. **Scientific American**. V. 261, p. 108-116, 1989.

WILSON, E. O .; PETER, F. M. The current state of biological diversity. *In*: **Biodiversity**. Washington, DC: National Academy, 1997.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK,A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-35. 1990.

WOODS, C. A . Suborder Hystricognathi. In: Wilson, D. E. , Reeder, D. M. (Eds), **Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference**. **Smithsonian Institution press, Washington**, p. 771-806,1993.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T.J.C. population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. **Molecular Ecology** v. 12, p. 639-646. 2003.

ZUCCHI, M. I. **Análise da Estrutura Genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 130 p, 2002.

ANEXOS

Soluções utilizadas no protocolo de extração de DNA.

Tampão de extração CTAB 2% para 100 mL

2,0 g de CTAB 2,0%
8,12 g NaCl 1,4 M
4 mL EDTA a 0,5M
10 mL de Tris- Cl pH 8.0 a 1M
1g de Polyvinylpyrrolidone 1,0%
Completar com água até 100 mL

Tampão de Lise para 50 mL

2,5 mL de Tris-HCl 1M pH 8.0
2 mL de NaCl 5M
0,5 mL de SDS 10%
1 mL de EDTA 0,5M
44,0 mL de Água Mili Q

Preparo de EDTA 0,5 M pH 8,0 para 100 mL

18,61 g EDTA

40 µl de Água Mili Q

2g de NaOH dissolvido em 15 mL de Água destilada

Agitar por duas horas e completar o volume para 100 mL

Tampão TE para 1000 mL

10mL de Tris-HCl a 1M

2 mL de EDTA 0,5 M

Completar com água até 1000 ML

Tampão de corrida TBE 10X (estoque 1L)

108 g de Tris

55g de Ácido bórico

40mL de EDTA 0,5M pH 8,0

Tampão de Carreamento 6X 1 mL

0,400g de Sacarose

0,0011g de Azul de bromofenol (1mg/mL)

1mL de Água Mili Q

Proteinase K 0,01 mg/µl

5 mg de proteinase K (100mg)

0,5 mL de água Mili Q