

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

Pós-Graduação em Genética

**ISABELA DE MACEDO GOMES DIAS**

**ANÁLISE GENÉTICA E FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO  
DE *Micoureus paraguayanus* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDADE)  
NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE, MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética.

Área: Genética Evolutiva e de Populações

Orientadora: Dra. Cleusa Graça da Fonseca

**Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
UFMG – ICB  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



*Universidade Federal de Minas Gerais*  
*Instituto de Ciências Biológicas*  
*Programa de Pós-Graduação em Genética*

Tese defendida e aprovada, em 04 de Maio de 2007, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:

Cleusa Graça da Fonseca

Evangelides Kalapothakis

Maria Raquel Santos Carvalho

Carlos Eduardo de Viveiros Greife

Ana Paula Madureira

## DEDICATÓRIA

À Terra, meio ambiente maravilhoso em que vivemos,  
que sofre assustadoramente, com o desprezo dos seres humanos.

A minha Família, aos meus Amigos  
e a todos aqueles de alguma forma  
me ajudaram nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Professora Cleusa Graça da Fonseca, pela amizade, atenção e liberdade na escolha dos meus caminhos.

Aos meus Co-Orientadores Dr. George Amato e Dr. Rob DeSalle por toda atenção e disponibilidade oferecidos durante o Estágio realizado no “Institute of Systematic Genomics” do “American Museum of Natural History” em Nova Iorque .

Aos Doutores que se disponibilizaram para participar da comissão examinadora (titulares e suplentes) e que colaboraram no aprimoramento do trabalho: Dra. Ana Paula Madureira, Dr. Carlos Eduardo de Viveiros Grelle, Dr. Evanguedes Kalapothakis, Dra. Maria Raquel Santos Carvalho e Dra. Marta Svartman.

A Marina, secretária da Pós-Graduação em Genética, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos.

Aos colegas do “Institute of Systematic Genomics” do “American Museum of Natural History” em Nova Iorque pelo apoio incondicional.

Aos colegas dos Laboratórios de Mastozoologia, de Genética Humana e Animal, de Genética Quantitativa, de Evolução e Diversidade Molecular, de Genética Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por permitirem e ajudaram na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de coleta, em especial Heitor Cunha e Adriano Paglia.

A Raquel Moura, Tudi Câmara e Cibele Bonvicio pelas amostras e apoio fornecidos.

A Francisca Almeida, Paula Lara, Michele M. Moraes, Leonardo Meneguini, pela ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto Pesquisas Ecológicas de Longa Duração na Mata Atlântica e Sistema Lacustre do Médio Rio Doce (PELD – PERD).

A Fundação CAPES pela bolsas de doutorado e de estágio de doutorando (Processo: 170705-1) concedidas.

Ao Instituto Estadual de Floresta e IBAMA pelas licenças concedidas para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO _____	4
ABSTRACT _____	5
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO _____	7
2. REVISÃO DE LITERATURA _____	9
2.1. A Mata Atlântica _____	9
2.2. A fragmentação de habitats e seus efeitos _____	10
2.3. O PERD e a importância do seu estudo _____	12
2.4. O gênero <i>Micoureus</i> sp. (Didelphidae) e suas características _____	14
2.5. Aplicação de marcadores moleculares: a caracterização da diversidade genética e outros parâmetros ecológicos, evolutivos e taxonômicos _____	22
2.6. Métodos estatísticos disponíveis _____	23
CAPITULO II	
1. ARTIGO: <b>Delineating species boundary of the woolly mouse opossum, <i>Micoureus paraguayanus</i> (Didelphimorphia: Didelphidae).</b> _____	28
CAPÍTULO III	
1. ARTIGO: <b>Characterization of eight microsatellites loci in the woolly mouse opossum, <i>Micoureus paraguayanus</i>, with isolation and cross-species amplification in <i>Micoureus demerarae</i>.</b> _____	56
CAPITULO IV	
1. ARTIGO: <b>Genetic and phenotypic population structure of the woolly mouse opossum, <i>Micoureus paraguayanus</i> Tate 1931 (Didelphimorphia: Didelphidae), in a fragment of Atlantic Forest, Brazil.</b> _____	64
CONSIDERAÇÕES GERAIS _____	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	94

## RESUMO

A compreensão dos efeitos do isolamento de uma reserva de bioma e de biodiversidade está diretamente ligada ao conhecimento das espécies nele presentes, bem como de suas corretas classificações taxonômicas. É de fundamental importância conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações ali existentes, o comportamento e a biologia adaptativa destas espécies para que, a partir dos resultados gerados, possa ser estimada a viabilidade a longo prazo das populações em habitats fragmentados, facilitando as decisões de manejo a serem tomadas. Diversas ferramentas hoje disponíveis, tanto no campo da Ecologia quanto da Genética, que devem ser utilizadas em conjunto para se obter um melhor resultado nas estimativas dos parâmetros biológicos, demográficos, genéticos, viabilidade entre outros, que poderão determinar os sistemas de manejo. Este trabalho visou averiguar as características genéticas, fenotípicas e suas correlações da população de *Micoureus* spp. no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), um dos últimos remanescente do bioma Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, mediante a avaliação da variação gênica, genotípica e fenotípica de amostras de animais capturados-marcados-recapturados durante o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006. Após a análise filogenética feita por marcador molecular de DNA mitocondrial (Cytb) conclui-se que a espécie presente no parque é *Micoureus paraguayanus*, como proposto para a região sudeste do Brasil. Para análises de variabilidade e estrutura genéticas foram utilizados 12 loci de marcadores moleculares polimórficos do tipo microssatélite, quatro loci anteriormente descritos para a espécie e mais oito desenvolvidos no presente estudo, para o gênero *Micoureus paraguayanus*. Segundo o resultado dessas análises, conclui-se que a população do PERD não está dividida geneticamente em sub-populações. Os resultados de análise de estrutura populacional utilizando os dados de medidas corporais repetidas confirmaram os resultados genéticos quanto à integridade da população do parque. Foram ainda estimados valores de herdabilidade para as medidas corporais pelo método de Ritland (1996). Os valores de herdabilidade encontrados para cada uma das medidas foram não significativos. Este resultado se deve provavelmente ao excesso de diversidade na população do PERD, desde que não temos informação de pedigree, ou ainda devido ao pequeno número de amostras analisadas ou ambos.

## ABSTRACT

In order to understand the effects of isolation within a biome and biodiversity reserve, one must have knowledge of the species occurring in it, as well as on the adequate taxonomic classification of them. It is fundamental to understand the genetic structure and diversity of the populations as well as their behavior and adaptive biology in order to be able to estimate the long term viability of the populations in fragmented habitats, providing base line information to help management decisions. Today there are several ecological and genetic tools that have to be integrated in order to provide better estimates viability and biological, demographic and genetic parameters (among others). This information is then used to determine the appropriate management systems. This work studied the genetic and phenotypic characteristics and their correlation in a population of *Micoureus paraguayanus* from the Parque Estadual do Rio Doce (PERD), one of the last Atlantic Forest remnants found in the state of Minas Gerais. In order to do this we used data from animals that were captured-marked-recaptured from January 2001 to December 2006, to evaluate their genetic, genotypic and phenotypic variation. The phylogenetic analysis was done using partial sequences from the mitochondrial DNA *Cyt b* gene and showed that the species present in the reserve is *Micoureus paraguayanus*, the species present in the southeast of Brazil. The analyses of genetic variability and structure were performed using 12 polymorphic microsatellite loci. Of these, four were already available in the literature and eight were developed during this work for the genus *Micoureus* spp. The results from the genetic analysis as well as data obtained by replicated morphological measurements showed that the population found at the PERD is not structured. The Ritland (1996) method was used to estimate heritability values for the morphological characteristics. Not significant heritability values for BL and BW were found. This can be resulted from the excess of diversity in structure of the PERD population, since we do not have the pedigree information, or because of small amount of sample analyzed or even both.





# **CAPITULO I**

## **1. INTRODUÇÃO**

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. Introdução

A compreensão dos efeitos do isolamento de uma reserva de bioma e de biodiversidade está diretamente ligada ao conhecimento das espécies nele presentes, bem como de suas corretas classificações taxonômicas. É de fundamental importância conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações ali existentes, o comportamento e a biologia adaptativa destas espécies para que, a partir dos resultados gerados, possa ser estimada a viabilidade a longo prazo das populações em habitats fragmentados, facilitando as decisões de manejo a serem tomadas (Ritland, 2000; DeSalle e Amato, 2004; Brito e Fonseca, 2006).

Para tanto, diversas ferramentas estão hoje disponíveis, tanto no campo da Ecologia quanto da Genética, que devem ser utilizadas em conjunto para se obter um melhor resultado nas estimativas dos parâmetros biológicos, demográficos, genéticos, viabilidade populacional entre outros, que poderão determinar os sistemas de manejo. Dentre as ferramentas ecológicas, a técnica de captura-marcação-recaptura é uma das mais seguras para avaliação do *status* das populações dentro de unidades de conservação (Petit e Valiere, 2006). Já no campo da genética é consagrado o uso de marcadores moleculares. Para estudos de filogenia, os marcadores de DNA mitocondrial proporcionam melhores resultados, principalmente inter-específicos. Quando se trata de estudos de paternidade, estrutura e diversidade genética ao nível populacional, são os microssatélites os marcadores mais utilizados, devido ao seu conteúdo informativo, facilidade de obtenção e custos (DeWoody, 2005).

O Parque Estadual do Rio Doce - PERD, criado pelo Decreto Estadual 1.119 de 14 de julho de 1944, é um dos últimos remanescente do bioma Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais. Considerado um importante repositório da vegetação original e estoque da biodiversidade, encontra-se nele 60% da biodiversidade deste bioma. Seu tamanho, 35.976 hectares, pode ser considerado razoável como unidade de preservação de espécies, mas está praticamente isolado do que resta da Mata Atlântica. No seu entorno existem pequenos

fragmentos de mata pertencentes às fazendas, que são em sua maioria de cultivo de eucalipto e de pecuária, o que torna difícil a conectividade pela *matriz* de habitat (Fonseca, 1997, Seeliger e cols., 2002; IEF-MG, 2007).

Segundo estudos realizados anteriormente no PERD e em fragmentos do seu entorno, os marsupiais são as espécies de pequenos mamíferos não-voadores mais abundantes. Dentre estes, *Micoureus spp.* tem sido das espécies mais capturadas (Grelle, 1996; Fonseca, 1997). Graças à sua abundância relativa, torna-se uma espécie interessante para ser utilizada como modelo para estudos de fragmentação de habitat e seus efeitos sobre a diversidade genética, a vulnerabilidade das espécies, a habilidade de dispersão e a persistência das populações de pequenos mamíferos da Mata Atlântica (Quental e cols., 2001, Brito & Fernandez, 2002, Viveiros de Castro & Fernandez, 2004; Rodrigues, 2004).

O sub-projeto “Análise Genética de Características Quantitativas Associadas à Adaptação em Populações de Mamíferos da Região do Rio Doce” está inserido no PELD – Pesquisas Ecológicas de Longa Duração na Mata Atlântica e Sistema Lacustre do Médio Rio Doce, um projeto do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com duração de dez anos (2001-2010). Como parte desse sub-projeto, este trabalho visa averiguar a existência de efeitos da fragmentação de habitat sobre a população de *Micoureus spp.* no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), mediante a avaliação da variação gênica, genotípica e fenotípica de amostras de animais capturados-marcados-recapturados durante o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006. Com o auxílio de marcadores moleculares do tipo DNA mitocondrial e microssatélites, foram testadas as seguintes hipóteses: a espécie presente no parque é *Micoureus paraguayanus*, como proposto para a região sudeste do Brasil; a população sofreu perda de variabilidade genética e está dividida em sub-populações, entre as quais existem diferenças fenotípicas.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. A Mata Atlântica

O bioma da Mata Atlântica brasileira é hoje considerado o quarto “hotspot” (área com excepcional concentração de espécies endêmicas e que passa por extrema perda de habitat) em prioridade para conservação de biodiversidade no planeta, devido aos fatores: número de espécies de plantas e de vertebrados endêmicos, taxa de endemismo para plantas e para vertebrados (em espécies por área) e apenas 8,1 % de vegetação remanescente em relação à extensão da área original. A área original de 1.300.000 km<sup>2</sup>, abrangia 17 estados do Brasil, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, por toda a costa mais trechos no interior, além de parte do Paraguai e Argentina. Bastante heterogênea devido à sua extensão latitudinal, o que determina diferenças climática (4°C a 32°C) e à diversidade de altitudes (do nível do mar até 2.900m), a Mata Atlântica constituiu-se de diversas formações florestais: Florestas Ombrófila Densa, Mista e Aberta; Floresta Estacional Decidual e Semidecidual; manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (Morellato e Haddad, 2000; Myers e cols., 2000; Capobianco, 2001; Brooks e cols., 2002; Mittermeier e cols., 2005; Tabarelli e cols., 2005).

A exploração predatória da Mata Atlântica iniciou-se em 1502 com a exploração do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*). Atravessou períodos de extensa extração de outras madeiras nobres como tapinhoã, sucupira, canela, jacarandá, canjarana, aribá, pequi, peroba, entre outras hoje ameaçadas de extinção, plantas medicinais como a ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha*) praticamente extinta no Rio de Janeiro, epífitas como bromélias, cactos e orquídeas cuja extração se faz à custa de grande derrubada de matas. Até meados de 1970 a Mata Atlântica ainda contribuía com 47% da produção de madeira no país. No período de 1985 a 1995, 11% do bioma foi destruído. Apesar de toda a legislação existente, ainda hoje é

feita exploração predatória do pinheiro do paraná nos estados do Paraná e Santa Catarina (Capobianco, 2001). Além de possuir somente 99.966 km<sup>2</sup> e estar bastante fragmentada em pequenas fra es, a Mata Atlântica sofre grande pressão antrópica, tendo em vista que a maior parte da popula o brasileira (mais de 100 milhões de pessoas em mais de 3.000 cidades) vive nos domínios desse bioma (Morellato e Haddad , 2000; Capobianco, 2001; Mittermeier e cols., 2005).

O Dossiê Mata Atlântica 2001, uma avalia o feita por meio de parceria entre a Rede de Organiza es Não Governamentais da Mata Atlântica, o Instituto Sócio-ambiental e a Sociedade Nordestina de Ecologia, revelou uma situa o ainda mais crítica no estado de Minas Gerais, que originalmente possuía 281.311 km<sup>2</sup> de mata, em 588.384 km<sup>2</sup> de sua área total (Capobianco, 2001). A extensa fragmenta o de mata em Minas tem sua origem na cultura do café, na minera o (principalmente do minério de ferro) e na implementa o da indústria siderúrgica, devido   grande disponibilidade das florestas nativas. A explora o mais intensa ocorreu a partir da década de 1940, com o crescimento da agropecuária e das indústrias siderúrgicas, que usam carvão vegetal para alimentar os altos fornos. Na década de 1970, o uso levou   quase exaustão os recursos naturais. Entre 1995 e 2000, o desmatamento foi de 121.000 hectares (Drummond e cols., 2005). Hoje, o bioma possui apenas 11.251 km<sup>2</sup> de área remanescente no estado, composto de pequenas ilhas de vegeta o nativa e que representa apenas 4% do original (Capobianco, 2001; Drummond e cols., 2005).

## **2.2. A fragmenta o de habitats e seus efeitos**

Quando habitats são fragmentados, popula es contínuas são subdivididas em um conjunto de popula es locais, que podem estar isoladas em maior *ou* menor grau, dependendo de diversos fatores biológicos inerentes   espécie ou relacionados ao ambiente. No que diz respeito   biologia das espécies, devemos considerar: a habilidade de dispersão, a

interação intra e inter-específica, a capacidade de adaptação às mudanças de habitat e a densidade populacional. Já os fatores ambientais que influenciam na magnitude do isolamento são: o grau de destruição, os efeitos de borda, o tipo de *matriz*, a qualidade, o tamanho e a estrutura dos fragmentos, o tempo de isolamento, a distância entre fragmentos, o clima da região e a presença de espécies exóticas (Murcia, 1995; Berry e cols., 2005; Harper e cols., 2005; Rambaldi e Oliveira, 2005). Portanto, a fragmentação de ecossistemas influencia de forma distinta as populações em diferentes habitats.

Pesquisadores vêm estudando características populacionais para verificar suas alterações sob o evento da fragmentação, entre elas, a diminuição do tamanho da população, o desempenho reprodutivo e o tempo médio de sobrevivência dos indivíduos. Algumas populações não manifestam alteração do desempenho reprodutivo sob condições de isolamento em pequenos fragmentos, mantendo-o tão efetivo quanto em grandes fragmentos (Tewksbury e cols., 1998; Smith e Hellmann, 2002; Kolb e Diekmann, 2005). Modelos de metapopulação permitem prever a persistência de populações em habitats fragmentados, por meio de inferências sobre sua demografia em relação à área do fragmento e à sua capacidade de dispersão (Hanski e Ovaskainen, 2000). Entretanto, muitos desses modelos não permitem quantificar a perda que as características adaptativas sofrem com a fragmentação (Smith e Hellmann, 2002). Estudando a dinâmica populacional do pássaro *Malurus pulcherrimus*, em uma área total de 320 km<sup>2</sup> de fragmentos de floresta na Austrália, Brooker e Brooker (2002) observaram características demográficas semelhantes em todos os tamanhos de fragmentos e, por meio de estudos de simulação, concluíram que a longevidade média das populações de áreas menores melhoraria em função do grau de conectividade entre os fragmentos. Além disso, a conectividade entre os fragmentos pode proteger a diversidade genética dos efeitos da fragmentação sobre as populações (Jaenike, 1978).

A ampla fragmentação do bioma Mata Atlântica limita a migração e a colonização de espécies necessárias à persistência de suas populações a longo prazo (Tabarelli e cols., 2005). Efeitos dessa fragmentação em algumas espécies de plantas e animais têm sido estudados. (Renjito, 1999; Chiarello, 2000; Brito e Fernandez, 2002; Galetti e cols., 2003; Viveiros de Castro e Fernandez, 2004; Brito e Grelle, 2004; São Bernardo e Galetti, 2004; Pardini, 2004; Brito e Fonseca, 2006). Dentre estes, alguns trabalhos com plantas, invertebrados, mamíferos e aves foram desenvolvidos no Parque Estadual do Rio Doce e seus arredores em Minas Gerais, um dos últimos e o maior remanescente de Mata Atlântica no estado (Grelle, 1996 e 2003; Fonseca, 1997; Machado e Fonseca, 2000; Ribeiro e cols., 2005; Nemésio e Silveira, 2006).

### **2.3. O PERD e a importância do seu estudo**

O Parque Estadual do Rio Doce (PERD) foi criado em 14 de julho de 1944 pelo Decreto Lei Estadual nº. 1119, com ajuda de Dom Helvécio Gomes de Oliveira, arcebispo de Mariana que, desde 1930, já percebia a necessidade de salvar suas matas da destruição pela mineração e expansão agropecuária. Situado no sudoeste do estado de Minas Gerais, a 248 km de Belo Horizonte, na região do Vale do Aço, o PERD abrange os Municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo (42°38', 48°38'W e 19°45', 19°30'S). Possui 36.976 hectares de área de superfície e 120 km de perímetro, sendo o maior remanescente de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais. Formado por um amplo sistema lacustre, o parque tem como limites ao norte o Rio Piracicaba, ao leste o Rio Doce e ao sul o Rio Mumbaça. Possui características de Floresta Estacional Semi-decidual (IEF-MG, 2007).

A borda oeste do PERD é delimitada pela estrada MG 320, não asfaltada e de fluxo intenso, que liga os municípios de Timóteo e São José do Goiabal e por fazendas de criação de gado e produção de eucalipto (IEF\_MG, 2007). Partindo da MG 320, no Distrito de Cava



Grande, na porção centro-sul do parque, está situada a estrada interna não pavimentada ativa e de fluxo constante, MG 122, que representa um grande risco de degradação e perda de biodiversidade, segundo o estudo realizado sobre os efeitos da estrada na fauna do parque. Ficou constatado que a MG 122 afeta a riqueza de espécies de mamíferos que utilizam suas margens pela significativa mortalidade que provoca (Scoss, 2002). Dividindo o parque em dois fragmentos e com dez metros de largura (Norte-Centro e Sul), a estrada vai da borda oeste à borda leste do parque, num total de 22 km de extensão. Tem como finalidade de uso a ligação e diminuição do isolamento dos distritos de Cava Grande (Oeste) e Pingo D'água, Entre Folhas e Córrego Novo (Leste) (IEF-MG, 2007). Nenhum estudo foi ainda realizado para saber se a estrada funciona como barreira isolando as populações do parque.

Classificado na categoria A de importância biológica pelo Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira – PROBIO, o Parque Estadual do Rio Doce possui prioridade extremamente alta e é recomendado para estudos de inventário biológico no Segundo Relatório Nacional para a Convenção sobre a Diversidade Biológica. (Brasil. Ministério do Meio Ambiente – DCBio, 2004). Inserido neste contexto e com objetivo de fazer um amplo inventário biológico, foi iniciado em 2000 o Programa Ecológico de Longa Duração – PELD, Site Mata Atlântica e Sistema Lacustre do Médio Rio Doce, realizado no PERD. O projeto foi desenvolvido mediante colaboração entre várias áreas da biologia (Genética, Ecologia, Limnologia, Zoologia e Botânica) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, departamentos de Biologia Geral, Botânica e Zoologia e financiado pelo CNPq, o projeto conta com o apoio da rede científica “International Long Term Ecological Research – ILTER” (Seeliger e cols., 2002).

Como resultado do programa PELD – PERD, alguns trabalhos já foram publicados. Dentre eles, destaca-se o estudo de comparação da variação genética de *Dalbergia nigra* (Papilionidae) da população do parque com dois pequenos fragmentos próximos. O estudo

demonstra diferenças na variação genética e na estrutura das populações das três localidades, o que mostra certo grau de isolamento entre o parque e os fragmentos de seu entorno, no que diz respeito à flora (Ribeiro e cols., 2005) .

O sub-projeto “Análise Genética de Características Quantitativas Associadas à Adaptação em Populações de Mamíferos da Região do Rio Doce” em conjunto com o sub-projeto “Levantamento da Fauna de Pequenos Mamíferos não-voadores da Região do Rio Doce” visa fazer o inventário da fauna e analisar todas as características biológicas destas espécies (riqueza, demografia, genética, características adaptativas), assim como os efeitos que a fragmentação exerce sobre as mesmas (Seeliger e cols., 2002).

#### **2.4. O gênero *Micoureus sp.* (Didelphidae) e suas características**

Segundo os poucos estudos realizados no PERD e em fragmentos do seu entorno com a fauna de pequenos mamíferos, os marsupiais são as espécies de pequenos mamíferos não-voadores mais abundantes. Dentre estes, *Micoureus sp* tem sido dos mais capturados (Grelle, 1996; Fonseca, 1997; Cunha, H.M. e cols., 2004). Graças à sua abundância relativa, torna-se interessante como modelo para estudos de fragmentação de habitat e seus efeitos na diversidade genética, na vulnerabilidade das espécies, na habilidade de dispersão e na persistência das metapopulações de pequenos mamíferos não-voadores da Mata Atlântica (Quental, e cols., 2001, Brito e Fernandez, 2002, Viveiros de Castro e Fernandez, 2004).

Pertencentes à classe dos mamíferos (Mammalia), à subclasse Theria e à infraclasse Metatheria, os marsupiais são uma superordem (Marsupialia), cuja principal característica é o tipo de gestação: os embriões saem precocemente do útero e vão se desenvolver no marsúpio (bolsa localizada na região ventral, cobrindo as tetas) ou simplesmente na região ventral destes animais, agarrados às tetas e expostos ao meio externo (Tyndale-Bisco e Renfree,

1987). Essa superordem possui sete ordens, segundo o ITIS – Integrated Taxonomic Information System ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), Março, 2007):

- Dasyuromorphia, à qual pertence os gêneros *Sarcophilus*, conhecido como Diabo da Tasmânia e *Thylacinus* ou Lobo da Tasmânia;
- Didelphimorphia, comumente conhecidos como marsupiais americanos: gambás e cuicas;
- Diprotodontia, à qual pertencem os conhecidos canguru (família Macropodidae) e coala (Gênero *Phascolarctos*);
- Microbiotheria, cuja única espécie descrita é o *Dromiciops gliroides* ou Monito Del Monte, restrito à região dos Andes e Patagônia;
- Notoryctemorphia, cujo único gênero conhecido é o *Notoryctes* (*N. carinus* e *N. typhlops*) ou toupeira marsupial;
- Paucituberculata, com a única família Caenolestidae ou gambá “musaranho”;
- Peramelemorphia onde estão os “bandicoots”.

A Ordem Didelphimorphia possui apenas uma família descrita, a Didelphidae, geograficamente distribuída por toda América, da Patagônia ao Canadá. Esta, por sua vez, tem duas subfamílias: Caluromyinae Kirsch, 1977 e Didelphinae Gray, 1821. A subfamília Caluromyinae possui três gêneros: *Caluromys* (*C. derbianus*, *C. lanatus* e *C. philander*); *Caluromysiops* (*C. irrupta*); *Glironia* (*G. venusta*).

A subfamília Didelphinae possui 12 gêneros descritos e válidos atualmente, segundo o ITIS – Integrated Taxonomic Information System ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), março, 2007). São eles:

- *Chironectes* ou cuica de água: *C. minimus*. Encontrado na América Central e do Sul

- *Didelphis* ou grande gambá americano: *D. albiventris*, *D. aurita*, ambos encontrados apenas América do Sul, *D. marsupialis*, encontrado nas Américas Central e do Sul, *D. virginiana* encontrado em todo continente americano.
- *Gracilinanus*: *G. aceramarcae*, *G. agilis*, *G. dryas*, *G. emiliae*, *G. marica*, *G. microtarsus*, todos seis gêneros encontrados apenas na América do Sul.
- *Lestodelphys*, gambá da patagônia: *L. Halli*.
- *Lutreolina*: *L. crassicaudata*, presente apenas na América do Sul.
- *Marmosa*, gambá camundongo, que possui nove gêneros distribuídos: *M. robinsoni* (Caribe, Sul e Central), *M. canescens* e *M. mexicana* (Central), *M. andersoni*, *M. lépida*, *M. murina*, *M. rubra*, *M. tylerian* e *M. xerophila* (Sul).
- *Marmosops* que também possui nove gêneros conhecidos: *M. cracens*, *M. dorothea*, *M. fuscatus*, *M. handleyi*, *M. impavidus*, *M. incanus*, *M. noctivagus* e *M. parvidens* (Sul) e *M. invictus* (Central).
- *Metachirus*, cuica ou gambá marrom de quatro olhos: *M. nudicaudatus* (Am. Central e do Sul).
- *Micoureus*: *M. alstoni* (Caribe e Am. Central), *M. constantiae*, *M. demerarae*, *M. paraguaianus*, *M. phaeus* e *M. regina* (Am. do Sul).
- *Monodelphis*, gambá de rabo-curto, possui 15 gêneros, 14 encontrados apenas na Am. do Sul e apenas *M. adusta* na Am. Central e do Sul.
- *Philander*, gambá cinza de quatro-olhos: *P. andersoni* (Sul) e *P. opossum* (Central e Sul).
- *Thylamys*: *T. elegans*, *T. macrura*, *T. pallidior*, *T. pusilla* e *T. velutinus* (Am. Sul, costa do Pacífico: Chile, Argentina, Bolívia e Peru).

O gênero *Micoureus* Lesson, 1842 se distribui do norte ao sul da América do Sul. Segundo o GBIF – Global Biodiversity Information Facility ([www.gbif.net](http://www.gbif.net), Março, 2007), o

ITIS – Integrated Taxonomic Information System ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), Março, 2007) e o livro de referência taxonômica, “Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference” (Wilson e Reeder, 2005), possui seis espécies: *M. alstoni* J.A. Allen, 1900, a única espécie encontrada na América Central (do Belize ao Panamá e Ilhas do Caribe adjacentes); *M. constantiae* Thomas, 1904, distribuída no leste da Bolívia, no sul do Brasil e no norte da Argentina; *M. demerarae* Thomas, 1905, na região Amazônica (Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Brasil, leste do Peru e da Bolívia); *M. paraguayanus* Tate, 1931, na Mata Atlântica (da Bahia, Brasil ao leste do Paraguai); *M. phaeus* Thomas, 1899, distribuída na região oeste dos Andes (do sudoeste da Colômbia ao sudoeste do Equador); *M. regina* Thomas, 1898, encontrado na Colômbia, no Equador, no Peru, no Brasil e na Bolívia e mais três em tentativa de posição na taxonomia, que são elas: *M. cinerea*, *M. cinereus*, *M. rapposa*. O número de cromossomos é de  $2n = 14$ , o mesmo número que diversos gêneros da família (*Thylamys*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Micoureus* e *Metachirus*) (Carvalho e cols., 2002). Dois estudos, um comparando padrões de bandas C e NOR de indivíduos amostrados no Cerrado e na Mata Atlântica e o outro de morfologia das espécies da família Didelphidae, sugeriram a existência de espécies diferentes entre estes dois biomas (Svartman e Vianna-Morgante, 1999; Argot, 2001).

Estudos morfológicos e filogenéticos utilizando seqüências do exon 1 do gene IRBP – Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein, sugerem a nomenclatura *M. paraguayana* Tate, 1931 para a espécie do centro-sul da Mata Atlântica, porém, considerando sua distribuição não bem definida (Jansa e Voss, 2000; Voss e Jansa 2003). Utilizando DNA mitocondrial (mtDNA – gene do citocromo *B*) e morfologia, Patton e Costa (2003) sugerem a classificação taxonômica das espécies de *Micoureus* como (Fig. 01): *M. demerarae* Thomas, 1905, para grupos da Região Amazônica Leste, incluindo Guianas, seguindo a costa leste até o estado da Bahia; *M. regina* Thomas, 1898 para grupos do oeste da Região Amazônica; *M. alstoni*

J.A.Allen, 1900 como única espécie da América Central; *M. travassosi* Miranda-Ribeiro, 1936 para o grupo localizado na Mata Atlântica da região centro-sul da costa Brasileira (Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo).

Análises filogenéticas com DNA mitocondrial *citocromo B* mostram que os animais da Região das Guianas são estreitamente relacionados com os do sudeste do Rio Amazonas e da Região da Mata Atlântica: a distância genética média entre eles é de 4,3% (Steiner e Catzeflis, 2004). Segundo Costa (2003), porém, os haplótipos do leste da Amazônia estão mais intimamente relacionados com os da Mata Atlântica do que com os de outras localidades da Amazônia. O gênero seria, então, representado por duas espécies: a do norte (da Amazônia até o centro-norte de Minas e sul da Bahia), que seria chamada de *M. demerarae* Thomas, 1905 e a do sul do Brasil (centro-sul de Minas até a Argentina), que seria chamada de *M. travassosi* Miranda-Ribeiro, 1936, tendo o cerrado e a caatinga como importantes áreas de dispersão na distribuição longitudinal. Utilizando sequências do exon 1 de dois genes nucleares, IRBP e DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), Jansa e colaboradores (2006) voltam a sugerir a nomenclatura *M. paraguayanus* Tate, 1931 como sendo mais adequada para a espécie da Mata Atlântica, porém afirmam ser necessário maior número de amostras para se definir melhor a região onde ocorre a divergência. Devido à localização do PERD em área de divisão de espécies, leste de Minas Gerais, não existe ainda uma definição de qual é exatamente a espécie amostrada no PERD (Costa, 2003).

Sabemos que a conservação efetiva da biodiversidade requer um mínimo de conhecimento sobre o alvo da proteção (Brito, 2004), ainda que não deva ser baseada apenas neste critério (Goldstein e cols., 2000). Portanto, o gênero *Micoureus* necessita de mais estudos genéticos para uma definição de nomenclatura e classificação taxonômica correta, já que estudos até agora apresentados divergem em suas definições.

*Micoureus* spp são os mais arbóreos entre os didelfídeos de pequeno tamanho. O comprimento de cabeça-corpo de um animal adulto varia de 130 mm a 200 mm. A cauda muito preênsil varia de 170 mm a 270 mm de comprimento e o peso adulto médio de 80g a 200g (Hildebrand, 1961; Charles-Dominique e cols., 1981; Julien-Laferrière, 1991; Richard-Hansen e cols., 1999; Viveiros de Castro e Fernandez, 2004; Delciellos e Vieira, 2006). Podem ser encontrados em todos os estratos de acordo com a disponibilidade de alimentos, mas ocupam principalmente o segundo extrato de florestas tropicais Atlânticas (Vieira e Monteiro-Filho, 2003; Viveiros de Castro e Fernandez, 2004; Delciellos e Vieira, 2006). Movem-se mais rapidamente que o *Caluromys*, saltando facilmente entre fendas, correndo de forma rápida e irregular (Charles-Dominique e cols., 1981). Segundo Argot (2001), possuem escápula mais triangular, músculos peitorais e flexores dos dígitos bem desenvolvidos, o que confirma a atividade ser prioritariamente arbórea.

Segundo estudo feito por Quental e colaboradores (2001), com as populações de pequenos fragmentos de Mata Atlântica na Reserva Biológica de Poço das Antas, no estado do Rio de Janeiro, o modelo de reprodução de *M. demerarae* (nomenclatura do autor) condiz com o de outras espécies de marsupiais, que em geral têm uma estação reprodutiva bem definida, na estação chuvosa de florestas tropicais, ou seja, de setembro a março (Cerqueira, 2005). Segundo Viveiros de Castro e Fernandez (2004), a espécie *M. demerarae* (nomenclatura do autor) tem fecundidade média de 17 a 24 proles por ano e longevidade média de 15 a 30 meses. É polígama, sendo que o território dos machos sobrepõe-se ao das fêmeas (Pires e Fernandez, 1999; Moraes-Jr. e Chiarello, 2005). A densidade populacional varia de 0,5 ind./ha (Quental e cols., 2001) a dois ind./ha (Guillemin, 2001; Viveiros de Castro e Fernandez, 2004) de acordo com o estado de fragmentação dos habitats em que se encontram as populações. O tamanho populacional médio encontrado por Quental e

colaboradores (2001) foi de 7,6 a 12,5 indivíduos o que está de acordo com valores encontrados por outros autores (Guillemin, 2001).

Quanto à dieta, segundo estudos realizados, *M. demerarae* (nomeclatura dos autores) é uma espécie principalmente insetívora. Alimenta-se de pequenos artrópodes (Coleoptera e Hymenoptera, seguidos de Orthoptera, Arachnida e Hemiptera com frequência intermediária e Lepdoptera e Diptera, representados por larva e pupa, com menor frequência), porém, pode se alimentar de frutas (Piperaceae, Moraceae e Cecropiaceae) dependendo da abundância relativa dos alimentos. É considerada por outros autores como insetívora/frugívora ou até omnívora e importante agente de dispersão de sementes (Pinheiro e cols., 2002; Fernandes e cols., 2006).

Os marsupiais da fauna brasileira, família Didelphidae estão todos fora da Lista Vermelha Brasileira de Espécies Ameaçadas, com exceção da espécie *Caluromysiops irrupta* Sunborn, 1951, que é encontrada em Rondônia e consta como “Criticamente em Perigo” ([www.biodiversitas.org.br](http://www.biodiversitas.org.br). Março, 2007). As demais espécies da família estão fora da lista vermelha brasileira de animais ameaçados, provavelmente por falta de informação. Entretanto, algumas das espécies conhecidas de didelfídeos que possuem status taxonômico válido constam da Lista Vermelha da IUCN - International Union for Conservation Nature, em sua maioria como baixo risco (LR – Lower Risk), sendo algumas próximas à ameaça (nt – near threat) e outras como menos preocupante (lc – least concern) ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Março, 2007). Face a essas constatações, existe uma grande necessidade de estudos em ecologia e genética para melhor definir a real situação destas espécies no Brasil. Com este objetivo, alguns estudos foram realizados, mas são poucos e insuficientes para determinar o risco de extinção e vulnerabilidade da espécie *Micoureus paraguayanus* no Brasil, que não consta na Lista Vermelha da IUCN, pois os estudos limitam-se a algumas pequenas unidades de conservação em que a espécie é encontrada.



Segundo um estudo feito na Reserva de Poço das Antas/RJ, as populações de *Micoureus paraguayanus* são seriamente afetadas pela redução da área dos fragmentos e pela diminuição da conectividade entre elas, levando à depressão endogâmica (Brito e Fernandez, 2004).

No estudo feito com amostras de 95 indivíduos da espécie *M. paraguayanus* do Parque Estadual do Morro do Diabo/SP e em outros seis fragmentos de Floresta Atlântica do seu entorno, Rodrigues (2004) encontrou uma variabilidade genética menor do que a usualmente relatada para loci de microssatélites em outras espécies de mamíferos, utilizando apenas quatro loci de microssatélites por ele desenvolvidos. Quatro a seis alelos por locus e heterozigosidade observada variando de 0,261 a 0,625 foram encontradas nas populações estudadas (heterozigosidade média total igual a 0,42). A maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações, havendo pouca variação entre elas ( $F_{ST}=0,07$  and  $Rho=0,05$ ). Apesar disso, foram encontrados alelos exclusivos na área do parque e em um dos fragmentos florestais, indicando que o movimento de indivíduos entre as populações é restrito.

Para testar a hipótese de gradientes ecológicos (quando pode ocorrer diferenciação e especiação entre populações contíguas, apesar de haver fluxo gênico, devido a fortes pressões seletivas ao longo de gradientes ambientais) foi feito um estudo comparando os gradientes Mata Atlântica e Cerrado no Brasil, com os marsupiais *Marmosops icanus* e *Micoureus paraguayanus*. Utilizando dados morfológicos e moleculares (mtDNA, gene do citocromo B) foram encontradas diferenças significativas tanto entre os gradientes para ambas as espécies quanto dentro dos gradientes (Soares, 2003).

Steiner e Catzefflis (2004) estudaram o modelo de variação genética e estrutura geográfica de cinco espécies de didelfídeos distribuídos na Região das Guianas e Rio Amazonas, utilizando variação no mtDNA (gene do citocromo B). Encontraram baixa

diversidade genética para a espécie *Micoureus demerarae*, que é amplamente distribuída na região.

## **2.5. Aplicação de marcadores moleculares: a caracterização da diversidade genética e outros parâmetros ecológicos, evolutivos e taxonômicos.**

A variação individual ocorre, em parte, devido à variação na seqüência do genoma, nos genes individuais (variação gênica) ou no genótipo (variação genotípica) e, em parte, devido as condições a que cada indivíduo está sujeito no ambiente em que vive. A variação genética, que deve ser medida em determinado tempo e espaço, será influenciada pela biologia individual e circunstâncias as quais cada indivíduo está sujeito, dentre as quais podemos citar o sucesso reprodutivo, migração, tamanho populacional, seleção natural e eventos históricos. (Falconer e Mackay, 1996; Sunnucks, 2000; Frankham, 2003). Os processos que afetam cada indivíduo têm seus efeitos acumulados em uma população e, por conseguinte, na especiação (Sunnucks, 2000). Medindo a variação genética e usando modelos populacionais é possível fazer inferências sobre a biologia dos organismos (Hastings, 1998). Utilizando marcadores genéticos e suas taxas de mutação, pode-se obter informação sobre quase todas as populações e o processo evolucionário a que estão sujeitas, como tamanho populacional, história, ecologia e capacidade de adaptação (Bazin e cols., 2006).

Marcadores genéticos são, simplesmente, características herdáveis com múltiplas formas cada uma. Hoje estão disponíveis diversos tipos de marcadores genéticos moleculares que refletem diferenças nas seqüências de DNA (Sunnucks, 2000; DeSalle e Amato, 2004). Faz-se então necessária a escolha correta do marcador para cada tipo de estudo que se deseja realizar. Essa escolha deve ser baseada nas características de cada marcador e no objetivo do estudo em questão.

Para estudos de filogenia (para este propósito, o estudo da morfologia das espécies não deve ser deixado de lado) e filogeografia entre espécies, história populacional, sistemática e levantamento de riqueza de espécies, os marcadores do tipo mtDNA têm sido mais usados e com maior sucesso (Sunnucks, 2000; DeSalle e Amato, 2004; Bazin e cols., 2006; Eyre-Walker, 2006).

Estudos de diversidade genética populacional e individual, algumas vezes, requerem marcadores com maiores taxas de mutação (Sunnucks, 2000). Para esta finalidade, os microssatélites, pequenas seqüências repetidas em tandem, que tem taxa de mutação média de  $10^{-5}$  a  $10^{-3}$ , têm sido muito usados, pois permitem: a) a avaliação do parentesco entre animais cujas genealogias não são conhecidas; b) o cálculo mais preciso do tamanho efetivo da população e das taxas de migração; c) a averiguação da variação genética das populações e subpopulações e da correlação genética entre elas; d) a averiguação do impacto da perda de diversidade genética sobre as características de variação contínua. Para tanto, o parentesco dos indivíduos deve ser comparado com suas informações fenotípicas e os parâmetros genéticos, estimados por meio de regressão. São necessários, porém, números relativamente grandes de indivíduos e de marcadores genéticos para essa finalidade (Mitchell-Olds, 1995; Ritland, 1996 e 2000; Ruzzante, 1998; Goldstein e Schlötterer, 1999; Sunnucks, 2000).

## **2.6. Métodos estatísticos disponíveis.**

Em uma análise de filogenia utilizando-se seqüências de marcadores de DNA, a primeira etapa a ser cumprida é a caracterização das seqüências obtidas, que pode ser feita pelo número de bases variáveis e pelo número de bases informativas e pela taxa de transição/transversão (Kumar e cols., 2004; Excoffier e cols., 2005). As árvores filogenéticas podem ser obtidas usando os métodos de distâncias evolucionárias e os algoritmos de máxima parcimônia (MP) e probabilidade máxima (ML). Os métodos de distâncias são

fáceis de implementar e rápidos, porém informações são perdidas quando a matriz de seqüências de DNA é resumida como matriz de pareamento de distâncias e os comprimentos dos ramos podem não ter interpretação evolucionária. Os métodos de parcimônia são de fácil interpretação, podendo ser muito úteis para estudos dentro de gêneros, apesar de serem inconsistentes em alguns modelos evolucionários. Os métodos de probabilidade máxima dependem de um modelo evolucionário prévio para encontrar um modelo apropriado e parâmetros adequados ao modelo. Em geral, uma única árvore de probabilidade máxima é produzida (Lowe e cols., 2004).

Os métodos atuais de genética de populações permitem obtermos informações acuradas da demografia de uma população, que são necessárias para interpretar corretamente modelos de desequilíbrio de ligação, reconhecer regiões do genoma que estão sob seleção ou ajudar no desenvolvimento de boas estratégias e prioridades de conservação. Com o advento de genotipagem em larga escala, o acesso à diversidade genética das populações ficou facilitado (Excoffier e Heckel, 2006).

A diversidade genética entre as subpopulações pode ser comparada pelo número de alelos por locus, pelo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e pela comparação entre heterozigotidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) para cada locus. Desvios nas frequências genotípicas permitem inferir a ação de fatores evolutivos (Falconer e Mackay, 1996). Riqueza de alelos na população pode ser calculada pelo número de alelos esperados em uma população infinita segundo a simulação de Monte Carlo (Roy e cols., 1994). Cada subpopulação e o *pool* de amostras podem ser testados para uma evidência de recente expansão ou redução no tamanho efetivo da população, mediante o excesso ou deficiência de heterozigotos (Piry e cols., 1999).

Análises de parentesco entre os indivíduos de uma população podem ser feitas com os dados obtidos da genotipagem dos indivíduos com os marcadores de microssatélites. Com

estes dados estimamos o coeficiente de parentesco (similar ao coeficiente de conancestralidade) entre indivíduos de uma população pela probabilidade de possuírem alelos idênticos por descendência (IBD – *identical-by-descent*) (Blouin, 2003). Para isso, podem ser usados os métodos estatísticos descritos por Wright (1922, 1965) ou descritos por Weir (Weir e Cockerham, 1984; Weir e Hill, 2002). Visando avaliar o grau de diferenciação entre as subpopulações, podem ser calculados os parâmetros  $F_{st}$  e  $R_{st}$  e as correlações entre eles (Weir e Cockerham, 1984; Weir e Hill, 2002).

A similaridade fenotípica entre os indivíduos pode ser avaliada utilizando-se modelos lineares. Podem ser testados modelos estatísticos que incluam variáveis explicativas pertinentes, como o modelo linear generalizado (GLM), tanto para as variáveis contínuas como para as discretas, para diferenciação de sub-populações (Lynch e Walsh, 1998; Sorensen e Gianola, 2002). Técnicas de análise multivariada podem ser aplicadas a todo o conjunto de dados, que possui diversas medidas de um mesmo indivíduo em diferentes fases de sua vida, visando: simplificar ou facilitar a interpretação do fenômeno estudado, pela construção de índices ou variáveis alternativas que sintetizem as informações originais; constituir grupos de elementos amostrais com similaridade entre si, possibilitando a segmentação do conjunto de dados original; investigar as relações de dependência entre as variáveis com objetivo de predição; comparar populações ou validar suposições por meio de testes de hipóteses. Um dos métodos de análises multivariadas bastante usado, é a análise de componentes principais (PCA) que tem como finalidade tomar  $p$  variáveis aleatórias  $X = (X_1, X_2, \dots, X_p)$  e encontrar uma combinação linear delas para produzir novas variáveis  $Z = (Z_1, Z_2, \dots, Z_p)$  que são não correlacionadas. Facilita, então, o estudo das relações existentes entre as variáveis, a análise de dispersão das observações e evidencia possíveis agrupamentos (Asensio, 1988; Barbosa, 1993; Mingoti, 2005).

Os valores de herdabilidade, que expressam a proporção da variância total de uma característica metríca que é atribuída as diferenças genéticas aditivas, podem ser estimados pela regressão da covariância da similaridade fenotípica estimada em relação ao coeficiente de coancestralidade (Falconer e Mackay, 1996; Ritland, 1996 e 2000; Garant e Kruuk, 2005). Esse método facilita a avaliação de parâmetros genéticos em populações naturais em que a ausência de pedigrees dificulta a estimativa pelos métodos tradicionais, baseados na semelhança entre parentes . (Ritland, 2000; Garant e Kruuk, 2005).

Estão publicamente disponíveis numerosos pacotes computacionais para a implementação dos métodos e técnicas de análise de dados aqui descritos (Luikart e England, 1999; Frankham e cols., 2002; Lowe e cols., 2004; Excoffier e Heckel, 2006).

## **CAPITULO II**

**Delineating geographic boundaries of the woolly mouse  
opossum, *Micoureus paraguayanus*  
(Didelphimorphia: Didelphidae).**

Isabela de Macedo Gomes Dias

Av. Otacílio Negrão de Lima, 12395 – Belo Horizonte – MG Brazil - 31365-450

e-mail: [imgdias@yahoo.com](mailto:imgdias@yahoo.com) or [igomes@amnh.org](mailto:igomes@amnh.org)

Phone: 55 31 34992589 - Fax: 55 31 34992570

## **DELINEATING GEOGRAPHIC BOUNDARIES OF THE WOOLLY MOUSE OPOSSUM, *Micoureus paraguayanus* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE).**

Isabela M.G. Dias\*<sup>1,2</sup>, Francisca C. Almeida<sup>2</sup>, George Amato<sup>2</sup>, Rob DeSalle<sup>2</sup>, Cleusa G. Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais– Belo Horizonte – MG – Brazil – 31270-010

<sup>2</sup> Sackler Institute for Comparative Genomics - American Museum of Natural History – 10024 – New York – NY

### **ABSTRACT**

When taxonomic classification and species boundary delineation are incomplete, conservation and management efforts are severely affected. This paper reports on species boundaries of the woolly mouse opossum, *Micoureus spp.*, in the southeastern Atlantic Forest in Brazil, a *hotspot* of biodiversity critically threatened. Phylogenetic analysis and diagnostic character were search using DNA sequences from mitochondrial cytochrome *b* gene (*cytb*) and cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (*COI*), and exon 6 of the nuclear dentine matrix protein 1 gene (*DMP1*). While the nuclear *DMP1* gene showed insufficient variation, the mtDNA analyses resulted in the robust grouping of samples of the *M. paraguayanus*/*M. demerarae* complex into three clades with distinct DNA sequence diagnostics for the species units in this study. The results indicate that *M. paraguayanus* Tate, 1931 is a distinct species unit from *M. demerarae* and *M. regina* and its geographic boundary in the Atlantic Forest can be delineated from Minas Gerais state along the coastal region of Brazil (excluding south of Bahia) and into Paraguay and Argentina. We show definitive DNA evidence of the species boundary for these organisms and provide diagnostics that will implement its listing in the IUCN Red List.

Keywords: *Micoureus*, Didelphidae, taxonomy, Atlantic Forest, species, phylogeny, opossum

\* Correspondent: [imgdias@yahoo.com](mailto:imgdias@yahoo.com)



A lack of precise taxonomic classification and knowledge on geographic distributions delays conservation and management efforts to save endangered species (Brito 2004; DeSalle and Amato 2004). A good example of this problem is the conservation status of the woolly mouse opossum in the genus *Micoureus* (Lesson, 1842, Didelphidae; Didelphimorphia). Although the family Didelphidae has been examined using phylogeographic, biogeographic and phylogenetic studies, with both morphological and genetic characters, the distribution pattern of some species of the genus *Micoureus* remains unclear on a fine scale (Costa 2003; Steiner and Catzeflis 2004; Steiner et al. 2005; Jansa et al. 2006). Because the species boundaries as well as geographic ranges of *Micoureus* are not well known, it is difficult to address conservation strategies for species of this genus, especially in the Atlantic Forest. The current scenario is most unfortunate as the Atlantic Forest is considered a “hotspot” of biodiversity and critically endangered (Brito and Fonseca 2006). Without a precise and proper taxonomy, species that are at risk of local extinction in certain areas (Rodrigues 2004; Brito and Grelle 2004; Viveiros de Castro and Fernandez 2004) do not have a defined conservation management program, nor can they be listed on the Endangered Fauna Red List of Brazil or the IUCN Red List – The World Conservation Union (Biodiversitas 2007 [www.biodiversitas.org.br](http://www.biodiversitas.org.br); IUCN 2007 [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).

The genus *Micoureus* is composed by small-sized species that exhibit typical arboreal behavior (Charles-Dominique et al. 1981). The main taxonomic resources for mammals, Wilson and Reeder (2005), Gardner (2007), and the Integrated Taxonomic Information System – ITIS ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), March, 26, 2008) suggest that the genus *Micoureus* has six species with valid taxonomic status (see Table 1). According to these lists, four species of *Micoureus* are found in Brazil. *M. regina* and *M. constantiae* are restricted to western South America, the former to the Amazon and the latter to northwestern Argentina, Bolivia, and west of the Brazilian state of Mato Grosso. *M. paraguayanus* is described as inhabiting the Atlantic Forest from Bahia State (Brazil) south to Paraguay. The geographic range description of *M. demerarae* is less clear concerning its distribution in Brazil and especially in the Atlantic Forest, since it is just referred to as “North Brazil”.

*M. demerarae* and *M. paraguayanus* are cryptic and their geographic boundaries have not been determined. Considerable taxonomic confusion exists among researchers with respect to the species

identity of *Micoureus* specimens collected in the Atlantic Forest. Separate researchers based on studies of animals from geographically close localities in the Atlantic Forest and more surprisingly studies using identical samples have used their results to infer different species nomenclature. The species names *M. demerarae* (Vieira et al. 2004; Grelle 2003) and *M. travassosi* (Cunha et al. 2004) were used for ecological studies undertaken at “Parque Estadual do Rio Doce” – PERD (one fragment of Atlantic Forest in Minas Gerais State). Studies carried out in Rio de Janeiro state were even more inconsistent. *M. demerarae* was the taxonomic epithet chosen for two studies at “Serra dos Órgãos” (Cunha and Vieira 2002; Delciellos and Vieira 2006) and five studies at “Poço das Antas” Biological Reserve (Pires and Fernandez 1999; Quental et al. 2001; Pinheiro et al. 2002; Brito and Fernandez 2002; Viveiros de Castro and Fernandez 2004). The name *M. travassosi* was used in one study concerning the effectiveness of a reserve network for conservation, (Brito and Grelle 2004) and the epithet *M. paraguayanus* was used in two papers (data were from “Poço das Antas” Biological Reserve - Soares 2003; Brito and Fonseca 2006). Studies carried out in São Paulo state used two species names, *M. demerarae* (Vieira and Monteiro-Filho 2003) and *M. paraguayanus* (Rodrigues et al. 2006). Studies focused on Atlantic Forest localities south of São Paulo State, Brazil, use the name *M. paraguayanus* (Goulart et al. 2006).

Here we focus on the two species of *Micoureus*, *M. demerarae* and *M. paraguayanus* (or *M. travassosi*), that have been suggested to occur in the vanishing Atlantic Forest of Brazil (Costa 2003; Wilson and Reeder 2005; Jansa et al. 2006; Gardner 2007). Our objective was to define the species boundaries of *Micoureus* species in the Atlantic Forest using molecular data. Therefore, we are most concerned with the taxonomy of specimens collected in the Brazilian states of Minas Gerais and Bahia. In accordance with the geographic distribution previously proposed for species occurring in Brazil (Costa 2003; Wilson and Reeder 2005; Gardner 2007), we assumed that specimens collected in the Atlantic Forest south of Minas Gerais state are most likely *M. paraguayanus*, while samples from habitats other than the Atlantic forest represent *M. demerarae*.

## MATERIALS AND METHODS

*Samples* - 23 samples of *Micoureus* from Brazilian states of Minas Gerais (MG), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ), Mato Grosso (MT), Amazonas (AM), and Goiás (GO), from a total of 18 localities, were analyzed. Fourteen additional *Micoureus* sequences were obtained from GenBank, including two sequences of *M. regina* from Peru (Patton et al. 1996; Steiner and Catzefflis 2004). We included samples of *Marmosa murina* and *Marmosa lepida* as outgroups in the phylogenetic analysis. Sequences were also obtained from the BOLD System in Barcode of Life Data Systems website (ABSMS555-06|ROM104494, ABSMS565-06|ROM105521, ABSMS587-06|ROM113431, ABSMS575-06|ROM 107034, and ABSMS116-06|ROM 117278); all localities and accession numbers are listed in Table 2 and Appendix 1. The 41 samples from Costa (2003) were not included because this author used a much shorter fragment of the cytochrome *b* gene (340bp) than the fragment used here (803 – 1147bp), which did not justify requesting them.

*Molecular techniques* - Genomic DNA extraction from ethanol-preserved liver tissue was carried out using QIAGEN DNeasy® Tissue kit (Quiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions, and from EDTA-preserved blood samples using Proteinase K-saline precipitation protocol (Sambrook and Russell 2001).

Fragments containing part of the mitochondrial gene cytochrome *b* (*cytb*, 803 bp) and part of the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase 1 (*COI*, 643 bp), and the exon 6 of the dentin matrix protein 1 gene (*DMP1*, 1203 bp) from the nuclear genome, were amplified and sequenced using a combination of primers and PCR conditions from previous publications. Longer fragment of the *cytb* gene (1147 bp) were obtained for a subsample of 12 specimens to clarify the taxonomic position of a sample from Urucu. For references, primers and PCR conditions see Table 3.

All PCRs were performed in 25 µL reaction volumes using PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads according to manufacturer's instructions (GE Healthy Care, Amersham Bioscience 2004), using the Eppendorf Gradient S – Mastercycle machine. The PCR products were sequenced using the BigDye® Terminator method (Applied Biosystems Inc.) on an ABI 3730xl automated sequencer. Sequences were edited and aligned manually using Sequencher 4.2 (Gene Codes Corporation).

*Sequence characterization* - Sequences were characterized for a number of variable bases and a number of informative bases using the program MEGA version 3.1 (Kumar et al. 2004) and DNASP version 4.20 (Rozas et al. 2003). Alignments were done by eye since gaps were not present in any of the genes.

*Population Aggregation Analysis* - Since character-based approaches are more appropriate to analyze DNA barcoding data (DeSalle et al. 2005); the sequences of mitochondrial DNA and nuclear DNA were examined using PAA (Population Aggregation Analysis). This method allows the identification of diagnostic sites on a species or population level (Davis and Nixon 1992). Attribute scores (presence/absence) for population samples of individuals were determined visually using MacClade version 4.08 (Maddison and Maddison © 2005). Our objective was to identify diagnostic sites for *M. demerarae* and *M. paraguayanus* on the two genes analyzed in this study.

*Phylogenetic trees* – Trees were obtained using both maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) algorithms. The MP analyses were carried out using PAUP\* version 4.10b (Swofford 2002). Trees were obtained using heuristic searches with 1,000 random stepwise additions and tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping. Bootstrap support values were obtained with 1,000 pseudo-replicates. ML trees were obtained using the online version of PHYML (Guindon and Gascuel 2003). The General Time Reversible model (GTR-I-R) of site substitution with an estimated proportion of invariable site and a gamma distribution parameter was chosen and parameters were estimated from the data. Topology robustness of ML trees was assessed through nonparametric bootstrap over 500 replicates, using the same program.

## **RESULTS**

*Sequence characterization* – The partial cytb sequences from the 37 individuals in our study comprised 28 different haplotypes, nearly one unique haplotype per individual. The vast majority of the nucleotide substitutions used to characterize these specimens was transitions (168 out of 207 substitutions). The number of informative bases for parsimony analysis was 194bp, from total number of 803bp. The partial COI sequences from the 19 individuals sequenced constituted 10 different haplotypes. These haplotypes were defined by nucleotide differences observed at 205 variable positions, from which 131 substitutions were transitions. The number of informative bases for

parsimony analysis of COI was 93bp, from total number of 643bp. The sequenced region of DMP1 gene (1203 bp, 25 variable sites) had few parsimony informative sites for phylogenetic analysis. The sequences from 28 individuals comprised 17 different haplotypes defined by 25 variable sites of which only 8 were parsimony informative. So we proceeded to analyze these sequence data only by PAA.

*PAA-DMP1:* The PAA analysis of DMP1 showed clear fixed differences between outgroups (17 characters fixed) and the genus *Micoureus*, and between *M. regina* (7 different fixed characters) and the other two *Micoureus* species. For the remaining individuals, the PAA analysis was used to see if diagnostics existed for *M. demerarae* from *M. paraguayanus*. This analysis revealed no diagnostic sites that were reliable for distinguishing these two species.

*PAA-cytb:* The *cytb* gene showed significant differences between samples assigned to *M. demerarae* and *M. paraguayanus*, including samples from Minas Gerais in the latter species. The PAA of this gene detected 32 exclusive substitutions of *M. regina* and 26 fixed differences between *M. demerarae* and *M. paraguayanus*. These results substantiated the species differentiation and are in agreement with the phylogenetic trees (Figure 1). The sequence of the sample from the Brazilian locality Urucu, in the Amazon (locality 13 in Table 2), obtained from GenBank (Patton et al. 1996), was highly divergent from the remaining in the *M. paraguayanus*/*M. demerarae* clade. This sequence was originally published as *M. demerarae*, but using the diagnostics we established with *cytb1* we were unable to identify this specimen to either pre-established taxon and as our phylogenetic analysis also suggests it might be a novel taxon yet undescribed (Table 4).

*PAA-COI:* The PAA analysis of COI gene sequences corroborated results obtained with *cytb* revealing 25 exclusive characters for *M. paraguayanus* and 24 exclusive characters for *M. demerarae*. We attempted to incorporate information from the Barcode of Life Database (BOLD). Three specimens in the BOLD are identified as *M. demerarae* (ABSMS555-ROM104494, ABSMS565-ROM105521, and ABSMS587-ROM113431). However, when compared to our data, these sequences had 30 exclusive characters that differentiated them from all the other *Micoureus* species. These specimens in the BOLD are clearly mislabeled and require further analysis.

*Phylogenetic Trees* - The MP analyses of *cytb* sequences were based on 194 parsimony informative characters, 174 of which were within *Micoureus* and 135 within the *M.paraguayanus/M.demerarae* complex. Thirty most parsimonious trees were recovered with length = 545 steps, CI = 0.624, RI = 0.828, and RC = 0.516. The strict consensus tree is shown in figure 1A. The genus *Micoureus* appears as monophyletic with 90% bootstrap support. *M. regina* is the first species to branch off in this analysis. The remaining samples, belonging to either *M. paraguayanus* or *M. demerarae*, clustered together in 81% of the bootstrap replicates. Three main clades can be observed within this group: one including one specimen from Urucu (Amazonas, Brazil), another including samples collected in southeastern Brazil, (referred to as southeastern clade; Rio de Janeiro and Minas Gerais samples), and a third one including samples from northeastern, central-northern, and northern South America (referred to as northern clade). Both the southeastern and the northern clades received high bootstrap support (> 90%) and were subdivided further into well-supported clades that largely reflect the geographic origins of the samples. This highly supported intraspecific clustering in accordance with geographic distribution suggests that *Micoureus* species have highly structured and stable populations.

The ML analyses of *cytb* were based on the model GTR+I+R, using the following parameters as estimated from the data: base frequencies: A = 0.306, C = 0.245, G = 0.130, T = 0.319; substitution rate matrix: [A-C] = 3.652, [A-G] = 18.392, [A-T] = 3.603, [C-G] = 2.492, [C-T] = 33.472, [G-T] = 1; proportion of invariable sites = 0.478; gamma distribution parameter = 1.002. The ML tree, shown in figure 1B, had a log likelihood of 3630.21. The results were very similar to those obtained in the MP analysis. One main difference between the two trees was the position of the sample from Urucu (Amazonas, Brazil). In the ML analysis this sample clustered with *M. demerarae* samples while in the MP analysis it clustered with *M. paraguayanus*, but neither result was statistically supported. Analyzing the complete *cytb* gene for a subset of the samples did not give extra support to either alternative arrangement (Figure 1C). These results together with the PAA results suggest that the sample from Urucu most likely represents a third taxon.

Phylogenetic analyses of the COI sequences also support differentiation between *M. paraguayanus* and *M. demerarae* (Figure 1D). MP analyses were based on 143 parsimony informative

sites and retrieved 5 equally parsimonious trees. ML analyses were based on the model GTR+I+R, using the following parameters as estimated from the data: base frequencies: A = 0.268, C = 0.222, G = 0.168, T = 0.341; substitution rate matrix: [A-C] = 6.384, [A-G] = 25.390, [A-T] = 11.701, [C-G] = 4.812, [C-T] = 48.103, [G-T] = 1; proportion of invariable sites = 0.133; gamma distribution parameter = 0.590.

In both the MP and the ML analyses of COI sequences *M. paraguayanus*, including specimens from Minas Gerais, and *M. demerarae*, including specimens from southern Bahia, clustered in two distinct monophyletic groups with 100% of bootstrap support. The main difference between the phylogenetic results obtained with COI as compared to *cytb* is that with the former gene *M. regina* clusters with *M. paraguayanus* while with the latter gene this species clusters with *M. demerarae*. It is interesting to note that while COI shows higher support for species clades, it reveals less interspecific structure than *cytb*. Although COI sequences and *cytb* sequences retrieved from the GenBank did not overlap for specimen distribution, we were able to include 3 sequences that were available in the BOLD Systems website. These 3 sequences were listed as being *M. demerarae*. No clear information on the collection sites of these samples is available, although they are likely to be from French Guyana. Neither our PAA nor phylogenetic analyses supports the identification of these samples as *M. demerarae*. In fact, given the high degree of divergence of these specimens from the ones examined in the present study, they may not even represent specimens in the genus *Micoureus*.

## DISCUSSION

The gene DMP1 has been used before in a study on the phylogenetic relationships among didelphid marsupials (Jansa et al. 2006). The study included two species of *Micoureus*, but these were recovered as monophyletic. Here, using PAA analysis of DMP1 sequences we observe that this gene has low information content at the genus level, despite the large number of samples included (Costa 2003; Jansa et al. 2006).

The *cytb* and the COI genes, on the other hand, showed higher levels of intrageneric and intraspecific variation as suggested by previous studies with *cytb* (Costa 2003). For these genes, we were able to include additional sequences from the GenBank and the BOLD to provide broader

sampling in our analyses (Patton et al. 1996, Steiner and Catzeflis 2004). The PAA and phylogenetic analyses done on cytb sequences allowed us to group samples of the *M. paraguayanus*/*M. demerarae* complex into three clades. The first one, representing *Micoureus paraguayanus*, consisted of one sample from Rio de Janeiro State and five samples from Minas Gerais State. This result confirms the phylogeny and phylogeographic structure proposed by Costa (2003), Patton and Costa (2003) and Steiner and Catzeflis (2004), where specimens from Minas Gerais, Rio de Janeiro, and São Paulo Brazilian states were grouped in a southeastern Atlantic Forest clade. The second clade, representing *Micoureus demerarae*, consisted of samples from the Amazon (North of Brazil, Venezuela, and Peru), the Guyanas (French Guyana and Guyana), Central Brazil (Goiás and Mato Grosso states), and the northeastern Atlantic Forest (Bahia State) (Figure 2). The third “clade” includes one sample from the Amazonian locality of Urucu. The three clades were highly supported in phylogenetic analyses using both MP and ML approaches. In agreement with the observed strongly supported divergence in phylogenetic analysis of these three entities is the discovery of strong diagnostics for the two species *M. demerarae* and *M. paraguayanus*.

The PAA analysis of COI sequences and subsequent use of these sequences as barcodes demonstrates that some attention has to be addressed to the barcode database (BOLD). The discrepancies found between the BOLD COI sequences referred as *M. demerarae* and all other *M. demerarae* COI sequences we have generated are most likely due to identification error of the voucher specimens from Royal Ontario Museum. As occurs in a study with small mammal communities in Suriname (Borisenko et al. 2007) most discrepancies between field identifications and those inferred from DNA barcodes were due to identification errors, re-examination of museum-deposited voucher specimens should be done for *Micoureus* sp. specimens published in BOLD.

The southern Bahia and northern Minas Gerais samples, despite their geographical proximity, were grouped into different clades (Figure 2B). This observation contrasts with the results found by Costa (2003) and the boundaries described by Wilson and Reeder (2005) and Gardner (2007), which include northern Minas Gerais specimens into the *M. demerarae* clade. These contradictory results suggest that there might be a distribution overlap in this area. Further collection efforts in northern Minas Gerais will be necessary to clear the issue. Based on the literature, we had considered the



Jequitinhonha River as a potential barrier for the South of Bahia and North of Minas Gerais marsupials. This river has been previously shown to be a barrier for primate and lizard species (Rylands et al. 1988; Pinto and Tavares 1994; Pelegrino et al. 2005). However, our results contradict support for this hypothesis for *Micoureus*. All samples collected from both banks of the Jequitinhonha River in north of Minas Gerais were grouped into the *M. paraguayanus* clade.

According to our results, the geographic limits of *M. demerarae* and *M. paraguayanus* in the Atlantic Forest are congruent with the limits of different forest formations. The samples of *M. demerarae* from Bahia were collected in the Bahia coastal forest. Specimens of *M. paraguayanus* collected in Minas Gerais were found in the drier interior forest, while the specimen from Rio de Janeiro was collected in Serra do Mar coastal forest. The two most humid formations mentioned here, the Serra do Mar and the Bahia coastal forest, are believed to have been isolated refugia during the Pleistocene dry periods given their high levels of plant endemism (Thomas et al. 1998). The current presence of these species in the drier interior forest could be explained by more recent dispersal from these refugia. The distribution of *M. demerarae* in Bahia and in the Amazon is part of a wider pattern of disjunct distributions of arboreal mammals in the Amazon and the northeastern coastal forests of Brazil (de Vivo 1997). These mammalian distributions and the existence of plants found only in the Bahia coastal forest and the Amazon (Thomas et al. 1998) suggest a past connection between the two humid forests of northern Brazil (de Vivo 1997).

*Taxonomy* - The Southeastern Atlantic Forest clade has previously been called *Micoureus paraguayanus* Tate, 1931 by Voss and Jansa (2003) and Jansa et al. (2006) and *Micoureus travassosi* (Miranda-Ribeiro 1936) for the Middle-South Atlantic Forest by Patton and Costa (2003) and Costa (2003). Voss and Jansa (2003) had two arguments favoring the taxonomic identity for the Southeastern clade as *M. paraguayanus*, which we agree with. The first was one of primacy; *Micoureus paraguayanus* is the oldest name. The second was that morphologically, the specimens, recently studied, match almost perfectly with Tate's (1931) original diagnostic description (white-tipped long tail). Here we also present DNA sequence diagnostics that further shore up the inferences of Voss and Jansa (2003). This description conflicts with that of Miranda-Ribeiro (1936), *M. travassosi*, in which the key specimens had short tails.

In conclusion, we report genetic evidence that the species *Micoureus paraguayanus* (Tate, 1931) is distributed in the Atlantic Forest from southeastern Brazil, in the Minas Gerais state, to Paraguay and Argentina. This species does not occur in Bahia state as was recorded by Wilson and Reeder (2005) and Gardner (2007). On the basis of our analysis of species boundaries in this isolated group of mammals, we concur with Brito and Fonseca (2006) that *Micoureus paraguayanus* should be included in the IUCN - *Red List*, category lower Risk / near threat (LR/nt) and in the Endangered Species Brazilian Red List, as the others species of the same genus such as *M. demerarae* already are included. We have presented DNA sequence diagnostics for both *M. demerarae* and *M. paraguayanus* that will assist conservation biologists and taxonomists in identifying new specimens of this taxon in the field.

### **Acknowledgements**

We would like to thank our colleagues from the Sackler Institute of Comparative Genomics, especially Matt Leslie; colleagues from the Mammalogy Lab of the General Biology Department of ICB-UFMG, who helped us with the field work, especially Heitor Cunha and Raquel Moura; and Tudy Camara from the Museum of Natural Sciences of PUC-MG who furnished samples. Thanks to Cibele R. Bonvincio (RJ) for kindly providing samples. This study is funded by the CNPq Project PELD-PERD, the CAPES Foundation (PhD. student fellowship) and the Sackler Institute for Comparative Genomics - AMNH. In addition, the AMNH authors on this paper thank the Louis and Dorothy Cullman Program in Molecular Systematics at the AMNH.

## LITERATURE CITED

- Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Herbert PDN (2007) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Notes*. OnlineEarly Articles (24-Set-2007)
- Brito D (2004) Lack of adequate taxonomic knowledge may hinder endemic mammal conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 13:2135-2144
- Brito D, Fernandez FAS (2002) Patch relative importance to metapopulation viability: the neotropical marsupial *Micoureus demerarae* as a case study. *Animal Conservation* 5:45-51
- Brito D, Fonseca G (2006) Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: An endemic marsupial of the Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 15(5):1713-1728
- Brito D, Grelle CED (2004) Effectiveness of a reserve network for the conservation of the endemic marsupial *Micoureus travassosi* in Atlantic Forest remnants in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation* 13(13):2519-2536
- Charles-Dominique P, Atramentowicz M, Gerard H et al (1981) Les mammiferes frugivores arboricoles nocturnes d'une forêt guyanaise: inter-relations plantes-animaux. *Revue d'Ecologie Terre et la Vie* 35:341-435
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30:71-86
- Cunha AA, Vieira MV (2002) Support diameter, incline, and vertical movements of four didelphid marsupials in the Atlantic Forest of Brazil. *Journal of Zoology of London* 258:419-426
- Cunha HM, Costa BA, Paglia AP, Vieira CEG (2004) Variação sazonal da abundância relativa de pequenos mamíferos não voadores de "site" PELD do Parque Estadual do Rio Doce. In: *Simpósio Internacional de Projetos Ecológicos de Longa Duração: Manaus, AM. PELD-INPA*. p 28

- Davis JI, Nixon KC (1992) Population, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41(4):421-435
- Delciellos AC, Vieira MV (2006) Arboreal walking performance in seven didelphid marsupials as an aspect of their fundamental niche. *Austral Ecology* 31(4):449-457
- DeSalle R, Egan MG, Sidall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Trans. of the Royal Society B* 360:1905-1916
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 5:702-712
- Dias IMG (2007) *Análise genética e fenotípica da população de Micoureus paraguayanus (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) no Parque Estadual do Rio Doce, MG.* Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte. *Thesis*
- Gardner LA (2007) *Mammals of South America. Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats: The University of Chicago Press*
- Goulart FVB, Souza FL, Pavese HB, Graipel ME (2006) Estrutura populacional e uso do estrato vertical por *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia, Didelphidae) em fragmentos de Floresta Atlântica de planície no sul do Brasil. *Biotemas* 19(3):45-53
- Grelle CEV (2003) Forest structure and vertical stratification of small mammals in a secondary Atlantic forest, southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 38(2):81-85
- Guindon S, Gascuel O (2003) PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5):696-704
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7 (4): 544–548
- Jansa SA, Forsman JF, Voss RS (2006) Different patterns of selection on the nuclear genes IRBP and DMP-1 affect the efficiency but not the outcome of phylogeny estimation for didelphid marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:363-380
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163

- Patton JL, Costa LP (2003) Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: Jones M, Dickman C, Archer M, editors. Predators with Pouches: The Biology of carnivorous marsupials: CSIRO Publishing
- Patton JL, dos-Reis-Maria SF, Silva NF (1996) Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome-b gene. *Journal of Mammalian Evolution* 3(1):3-29
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN et al (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with rivers systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:13-26
- Pinheiro PS, Carvalho FMV, Fernandez FAS, Nessimian JL (2002) Diet of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 37(3):213-218
- Pinto LPS, Tavares LI (1994) Inventory and Conservation Status of Wild Populations of Golden-Headed Lion Tamarins, *Leontopithecus chrysomelas*. *Neotropical Primates* 2:24-27
- Pires AdS, Fernandez FAdS (1999) Use of space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 15:279-290
- Quental TB, Fernandez FAD, Dias ATC, Rocha FS (2001) Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 17:339-352
- Rodrigues FP (2004) Análise da estrutura genética em populações naturais de pequenos mamíferos, no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes. São Paulo: Universidade de São Paulo. 87 p
- Rodrigues FP, Rocha FS, Garcia JE et al (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia : Didelphimorphia). *Molecular Ecology Notes* 6(3):686-688
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messegué X, Rozas R (2003) DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497

- Rylands AB, Spironelo WR, Tornisielo VL, et al (1988) Primates of the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Primate Conservation* 9:100-109
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: CSHL Press. 6.28 p
- Smith MF, Patton JL (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biology Journal of the Linnean Society* 50:149-177
- Soares PP (2003) Morfologia e ADNmt nos marsupiais *Marmosops icanus* e *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia, Didelphidae): um teste de diversificação ao longo de gradientes ecológicos. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. p. 133 (Thesis: Master degree, portuguese)
- Steiner C, Catzefflis FM (2004) Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossums (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography* 31(6):959-973
- Steiner C, Tilak M, Douzery EJP, Catzefflis FM (2005) New DNA data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene diversification of living South America opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35(2):363-379
- Swofford DL (2002) PAUP\*. Phylogenetic analysis using Parsimony, version 4. Sinauer Associates
- Thomas WM, Carvalho W, Amorim AMV et al (1998) Plant endemism in two forests in Southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 7, pp. 33–322
- Toyosawa S, O'Huigin C, Klein J (1999) The Dentin Matrix Protein 1 gene of Prototherian and Metatherian Mammals. *Journal of Molecular Evolution* 48:160-167
- Vieira EM, Monteiro-Filho ELA (2003) Vertical stratification of small mammals in the Atlantic rain forest of south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19:501-507
- Viveiros de Castro EB, Fernandez FAS (2004) Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, 119, 73-80

- de Vivo M, Carmignotto AP (1997) Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. *Journal of Comparative Biology*, 2, 65–73
- Vieira MV, Grelle CEV, Gentile R (2004) Differential trappability of small mammals in three habitats of Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 64(4):895-900.
- Voss RS, Jansa SA (2003) Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: Separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History*(276):1-82
- Wilson DE, Reeder D-AM (2005) *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press

## TABLE AND FIGURES LEGEND

Table 1 – List of species epithets and localities extracted from Wilson and Reeder (2005) and from the Integrated Taxonomic Information System – ITIS ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), March, 26, 2008), and body measurements (body length: head and body (mm); tail length (mm), weight (g)).

Table 2 - Samples and localities of didelphid marsupials which mDNA (cytb and COI) sequences were analyzed in the present study and GeneBank sequences numbers. AMCC, AMNH (*The Ambrose Monell Cryo Collection at American Museum of Natural History – NY*). CRB (Cibele Rodrigues Bonvincio – RJ). MCN PUC-MG (Museu de Ciências Naturais – Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais). UFMG-PELD/PERD (*Universidade Federal de Minas Gerais – Programa Ecológico de Longa Duração / Site: Parque Estadual do Rio Doce*).

Table 3 – Primers, PCR conditions and references used to amplify 800bp and 1147bp from mDNA cytB gene, 643bp from mDNA COI gene, and 1200bp from Exon6 of DMP1 (Dentin Matrix Protein) gene.

Table 4 – Population Aggregation Analysis (PAA) using cytochrome B sequences with 803bp (37 individuals) and 1147 bp (13 individuals) and using DMP1 sequences (1203bp).

Fig.1 - Phylogenetic trees. A) Bootstrap tree (CytB 803bp). B) ML tree obtained under GTR-I-R model (CytB 803bp) (parameters are described in the text). C) Parsimony Bootstrap Tree: CytB 1147bp. Numbers on the tree represent bootstrap support values obtained with 500 bootstraps replicants. D) ML (left) and MP (right) trees (COI 643bp).

Fig.2 - Maps of sample localities. A) South America map that shows our samples localities and main rivers positions. Open balls represent *M. demerarae*, the black square represents *M. paraguayanus*, triangles represent *M. regina*, and interrogation symbols represent our sample targets to determine which species they are. The main groups of *M. demerarae* were: Guyana region (localities 3 to 9), North Amazon (localities 10 to 12), Mato Grosso state (locality 15), Góias state (locality 19), and Peru (locality 14). B) This map detailed the square area in map of figure 2A, the Brazil Central-Southeastern region, showing how samples were grouped. Triangles represent *M. demerarae* samples and circles represent *M. paraguayanus* samples.



APPENDIX 1: Population Aggregation Analysis results for 1203 bp of DMP1 (Dentin Matrix Protein 1) nuclear gene: sample numbers and names (same ones from Table 2), localities, GenBank number, and bases of variable sites.

**Table 1 – List of species epithets and localities extracted from Wilson and Reeder (2005) and from the Integrated Taxonomic Information System – ITIS ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov), March, 26, 2008), and body measurements (body length: head and body (mm); tail length (mm), weight (g)).**

Species name	Geographic location	Body Weight	Body length	Tail length
<i>M. alstoni</i> J.A.Allen, 1900	Central America – from Belize to Panama and Caribbean Islands			
<i>M. constantiae</i> Thomas, 1904	East Bolivia, South Brazil and North Argentina			
<i>M. demerarae</i> Thomas, 1905	Amazon Region – Colombia, Venezuela, French Guyana, Guyana, Surinam, North Brazil, East Peru and East Bolivia (Amazon Forest)	100-200 <sup>1</sup>	158-180 <sup>1</sup>	
<i>M. paraguayanus</i> Tate, 1931	Atlantic Forest – from Bahia, Brazil to East Paraguay	100-305 <sup>1</sup>	82-225 <sup>1</sup>	105-326 <sup>1</sup>
<i>M. phaeus</i> Thomas, 1899	West slope of the Andes – from SW Colombia to SW Equador			
<i>M. regina</i> Thomas, 1898	Colombia, Equador, Peru, Brazil e Bolivia (Amazon Forest)			

<sup>1</sup>Charles-Dominique (1981); Viveiros de Castro and Fernandez (2004); Dias (2007)

**Table 2 - Samples and localities of didelphid marsupials which mtDNA (cytb and COI) sequences were analyzed in the present study and GeneBank sequences numbers. AMCC, AMNH (*The Ambrose Monell Cryo Collection at American Museum of Natural History – NY*). CRB – RJ biology collection (Cibele Rodrigues Bonvincio – RJ). PUC-MG Museum biology collection (Museu de Ciências Naturais – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais). UFMG-PELD/PERD field samples (*Universidade Federal de Minas Gerais – Programa Ecológico de Longa Duração / Site: Parque Estadual do Rio Doce*).**

Locality <sup>1</sup>	Sample	GeneBank (cytb)	GenBank (COI)	Species	Locality	Source
1	DWF659 (AMNH273164)	EF587310	EU597272	<i>M. regina</i>	Peru, Loreto: Rio Galvez	AMCC, AMNH
2	MVZ154766	1041859	-	<i>M. regina</i>	Peru, Huampami	Patton et al. (1996)
3	ISEM V-1570	47457397	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Paracou	Steiner and Catzeflis (2004)
4	ISEM V-1308	47457399	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Cayenne	Steiner and Catzeflis (2004)
4	ISEM V-1320	47457419	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Cayenne	Steiner and Catzeflis (2004)
5	ISEM V-1040	47457405	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Nouragues	Steiner and Catzeflis (2004)
6	ROM 97932	47457395	-	<i>M. demerarae</i>	Guyana:Potaro-Siparuni	Steiner and Catzeflis (2004)
7	ISEM N-644	49168684	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Pic Matecho	Steiner and Catzeflis (2004)
8	ISEM N-568	49168683	-	<i>M. demerarae</i>	French Guiana:Saul	Steiner and Catzeflis (2004)
9	ROM 98124	47457407	-	<i>M. demerarae</i>	Guyana:Takutu-Essequibo	Steiner and Catzeflis (2004)
10	USNM560731	1041847	-	<i>M. demerarae</i>	Venezuela:Cerro Neblina, Camp VII	Patton et al. (1996)
11	2101	EF587290	EU597275	<i>M. demerarae</i>	Brasil, AM:Barcelos	CRB - RJ
12	2178	EF587291	EU597274	<i>M. demerarae</i>	Brasil, AM:Santa Isabel	CRB - RJ
13	MNFS187	1041845	-	<i>M. demerarae</i>	Brasil, AM:Alto Rio Urucu	Patton et al. (1996)
14	MUSM 13294	47457409	-	<i>M. demerarae</i>	Peru:Loreto	Steiner and Catzeflis (2004)
14	DWF568 (MUSM15312)	EF587309	EU597273	<i>M. demerarae</i>	Peru, Amazonas:Rio Galvez	AMCC, AMNH
15	2791	EF587295	EU597282	<i>M. demerarae</i>	Brasil, MT:São José do Xingu	CRB - RJ
16	RM198	EF587300	-	?	Brasil, BA:Itamari, Fazenda Alto São Roque	Zoology - UFMG
17	RM109	EF587297	EU597277	?	Brasil, BA:Itacaré, Fazenda Rio Capitão	Zoology - UFMG
17	RM108	EF587299	-	?	Brasil, BA:Itacaré, Fazenda Rio Capitão	Zoology - UFMG
18	RM116	EF587298	EU597276	?	Brasil, BA:Uruçuca, Fazenda Caititu	Zoology - UFMG
19	2304	EF587292	EU597279	<i>M. demerarae</i>	Brasil, GO:Mimoso	CRB - RJ
19	2320	EF587293	EU597280	<i>M. demerarae</i>	Brasil, GO:Mimoso	CRB - RJ
19	2324	EF587294	EU597281	<i>M. demerarae</i>	Brasil, GO:Mimoso	CRB - RJ
21	RM219	EF587296	EU597278	?	Brasil, BA:Porto Seguro, Pau Brasil Nac. Park	Zoology - UFMG
22	JEQ01	EF587303	EU597284	?	Brasil, MG:Berilo, Usina Hidrelétrica de Irapé	PUC-MG Museum
23	A1091	EF587301	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Campolina	UFMG - PELD/PERD
23	A1427	EF587302	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Campolina	UFMG - PELD/PERD
23	A890	EF587308	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Campolina	UFMG - PELD/PERD
23	266	EF587288	EU597283	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Campolina	UFMG - PELD/PERD
24	A1317	EF587304	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Vinhático	UFMG - PELD/PERD
24	A315	EF587305	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Vinhático	UFMG - PELD/PERD
24	A1421	EF587306	-	?	Brasil, MG:Marliéria, PERD <sup>2</sup> , Vinhático	UFMG - PELD/PERD
25	CB01	EF587307	-	?	Brasil, MG:Casa Branca, Rola Moça	PUC-MG Museum
26	1287	EF587289	EU597285	<i>M. paraguayanus</i>	Brasil, RJ:Guapimirim	CRB - RJ
27	ROM F-41351	49168685	-	<i>Marmosa murina</i>	Suriname:Brownsberg	Steiner and Catzeflis (2004)
28	ROM 107034	47457431	-	<i>Marmosa lepida</i>	Guyana:Potaro-Siparuni	Steiner and Catzeflis (2004)

<sup>1</sup>Number of localities in the map of the figure 2A. <sup>2</sup>PERD: Rio Doce State Park, MG, Brazil

**Table 3 – Primers, PCR conditions and references used to amplify 800bp and 1147bp from mtDNA cytb gene, 643bp from mtDNA COI gene, and 1200bp from Exon6 of DMP1 (Dentin Matrix Protein) gene.**

Primers name	Primers sequences (5' - 3')	PCR conditions	Reference
To mtDNA cytb		95°C/10min; 30X(94°C/30s,45°C/90s,72°C/60s); 72°C/10min	Smith and Patton (1993)
MVZ05 (803bp)	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG		
MVZ16 (803bp)	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT		
MVZ39 (1147bp)*	CAYTTACTATTTYTHCAYGARAC		
MVZ14 (1147bp)*	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC		
To mtDNA COI gene		95°C/5min; 35X(94°C/30s,50°C/40s,72°C/60s); 72°C/10min	Borisenko et al. (2007); Ivanova et al. (2007)
VF1i_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG		
VR1i_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCIAAIAAICA		
To 1200bp exon 6 DMP1		95°C/5min; 35X(94°C/60s,50°C/60s,72°C/3min);72°C/10min	Toyosawa et al. 1999; Jansa et al. 2006
DEN-2	ATCTTGGCAATCATTGTGCATC		
DEN-12	GATGAAGACGACAGTGGAGATGACACCTT		
DEN-13	ATCRCTGTCCTGAGGTCTAGACTC		
DEN-14	GAGAACAGCAAAAGCAAATCCCAAG		

\* *Primes for a second PCR were first PCR product (using MVZ05 an MVZ16) was used as template.*

**Table 4 – Population Aggregation Analysis (PAA) done using CytB sequences with 803bp (37 individuals), COI sequences with 643bp (19 individuals) and 1147 bp (13 individuals) and using DMP1 sequences (1203bp). Mpar x Mdem = fixed differences between *M. demerarae* and *M. paraguayanus*; Mreg x (Mpar + Mdem) = diagnosis characters for Mreg; Mdem from BOLD x Others = fixed differences between *M. demerarae* sequences from BOLD System and all others.**

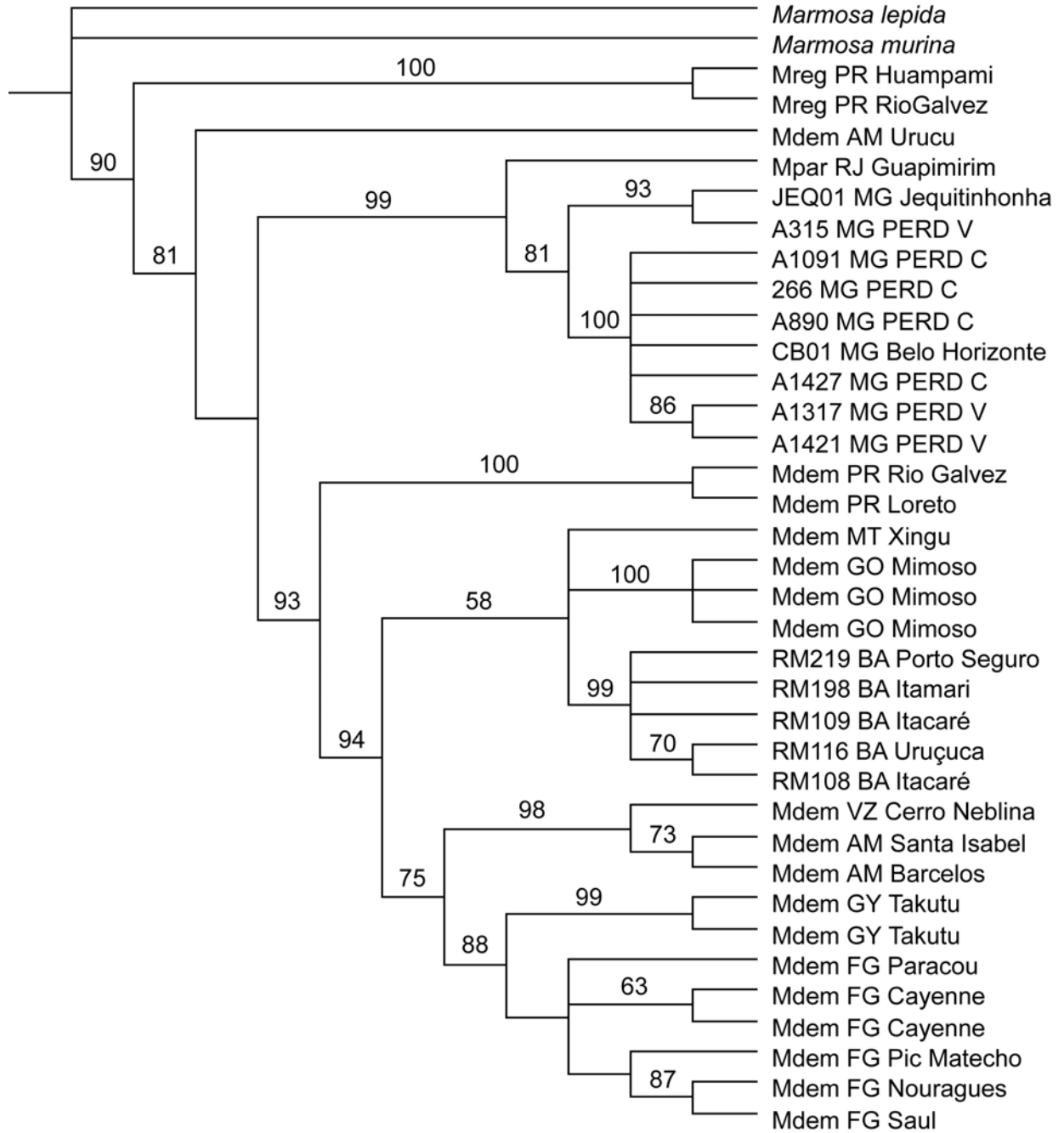
Assuming Urucu sample belongs to a 4th species

Locus	Lenght (variable sites)	Mpar x Mdem	Mreg x (Mpar + Mdem)	Mdem from BOLD x Others
Cytb	803 bp (207)	26	32	
COI	643 bp (205)	25		30
DMP 1	1203 (52)	0	5	

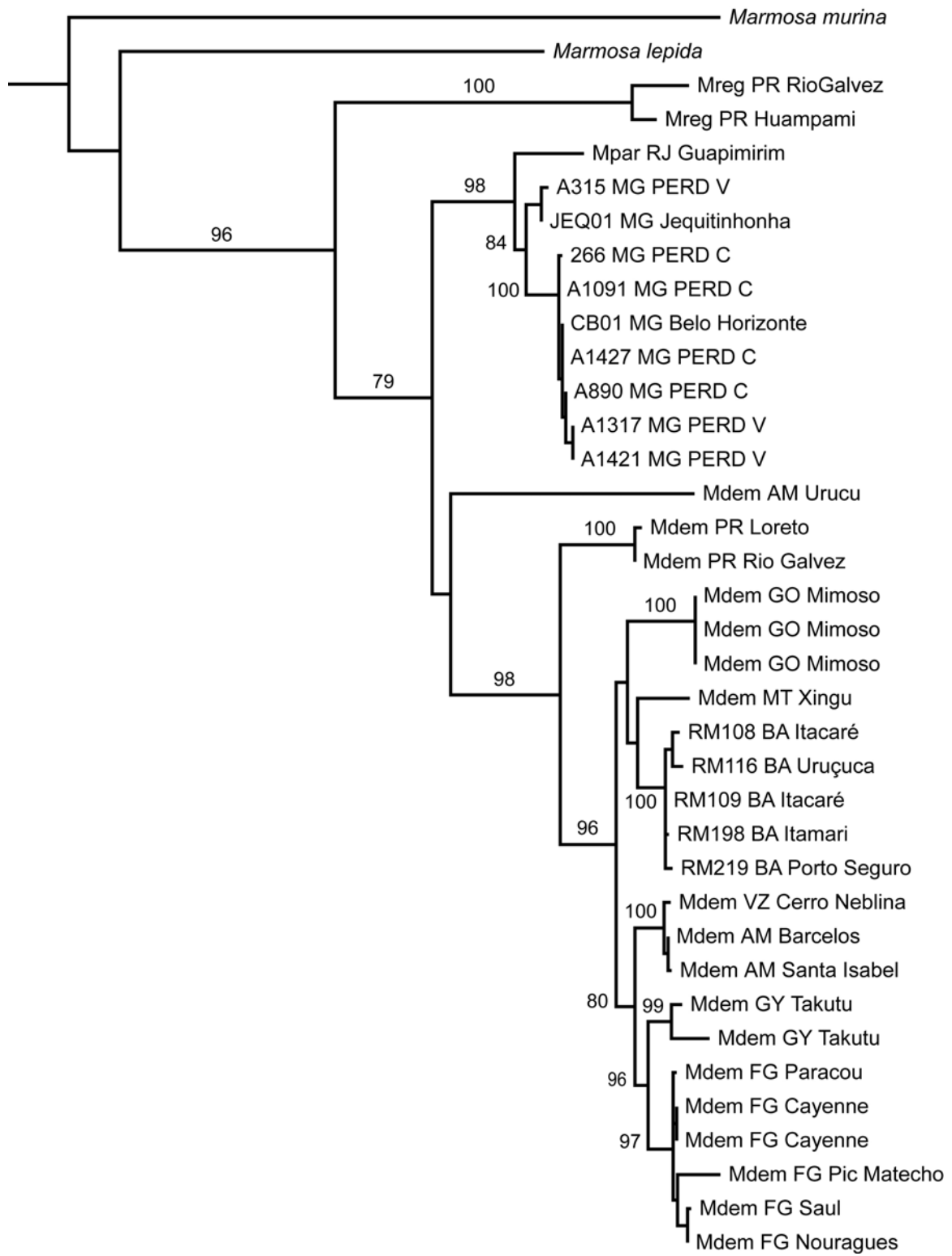
Comparing Urucu sample with the other three species

	Lenght (variable sites)	Unique Urucu	Unique Urucu + Mdem	Unique Urucu + Mpar	Unique Urucu + Mreg
Cytb	1147 bp (?)	29	17	12	12

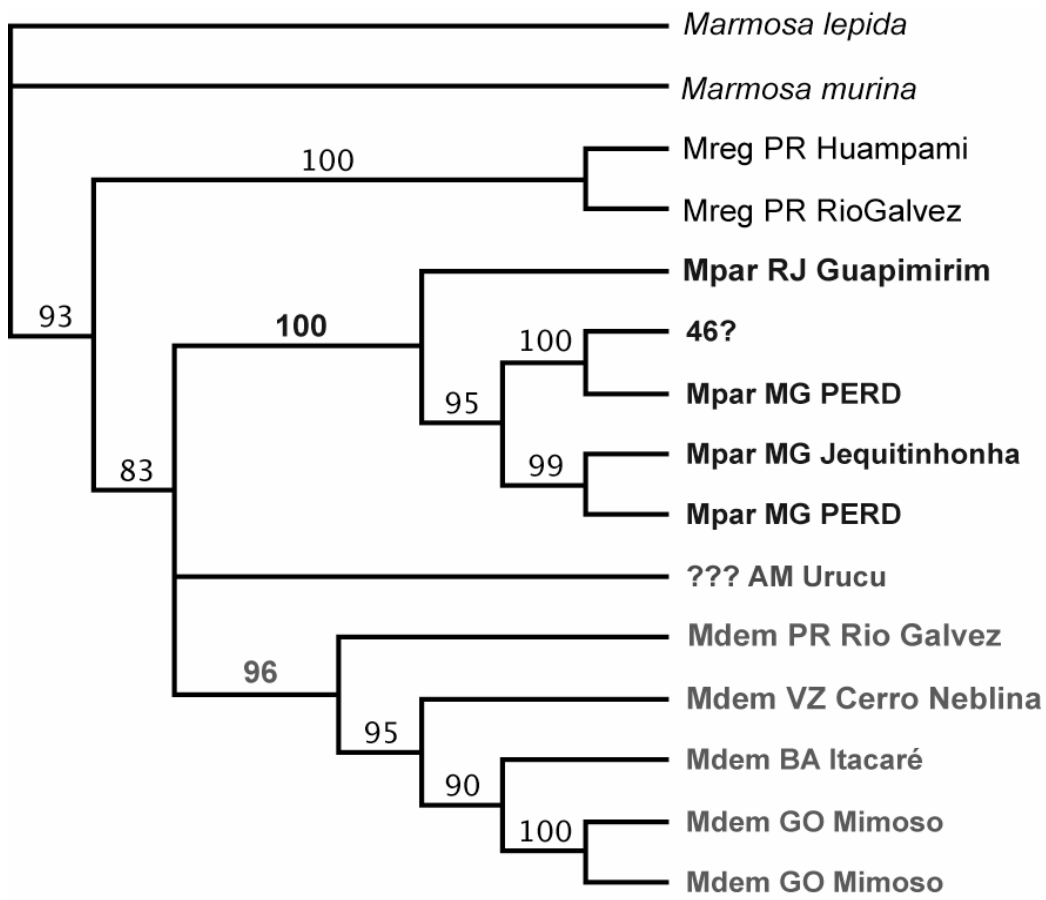
**Figure 1A**  
MP tree (cytb)



**Figure 1B**  
ML tree (cytb)



**Figure 1C**  
 Bootstrap (cytb)



**Figure 1D**  
ML and MP trees (COI)

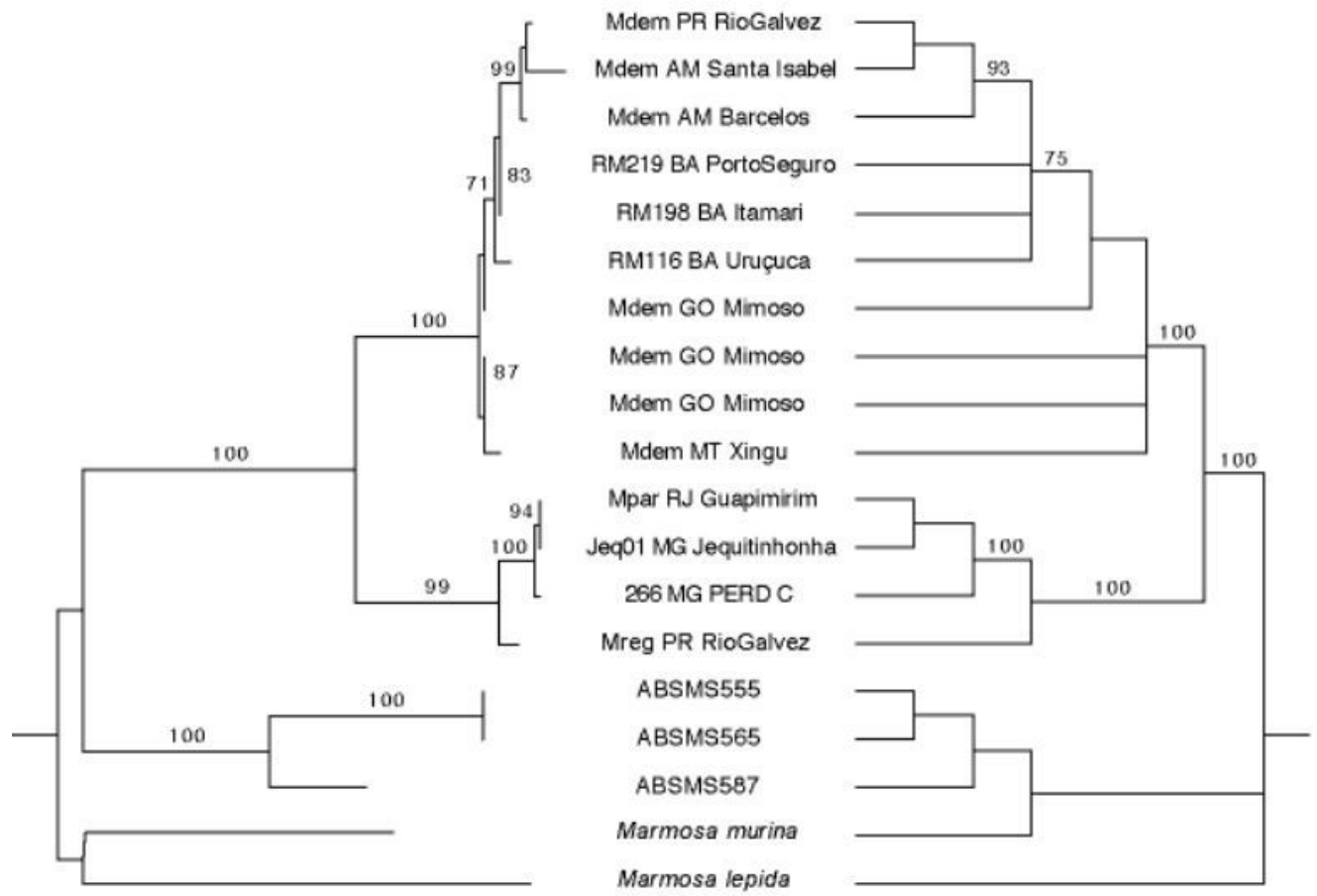




Figure 2A

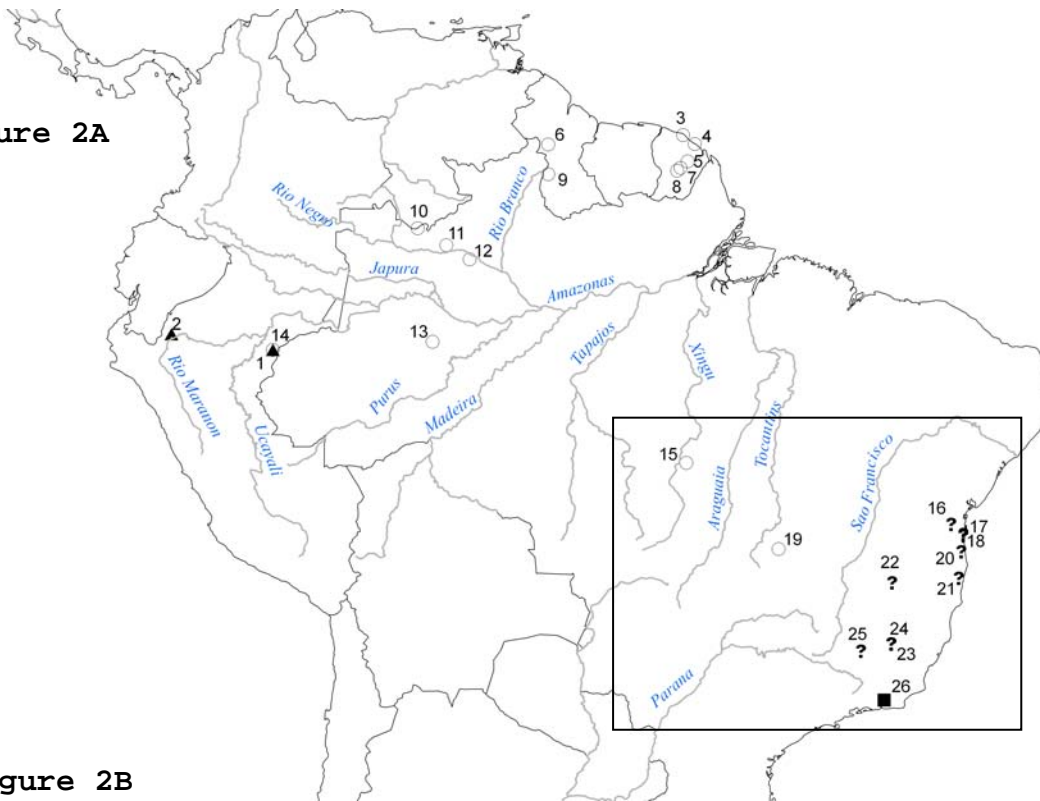
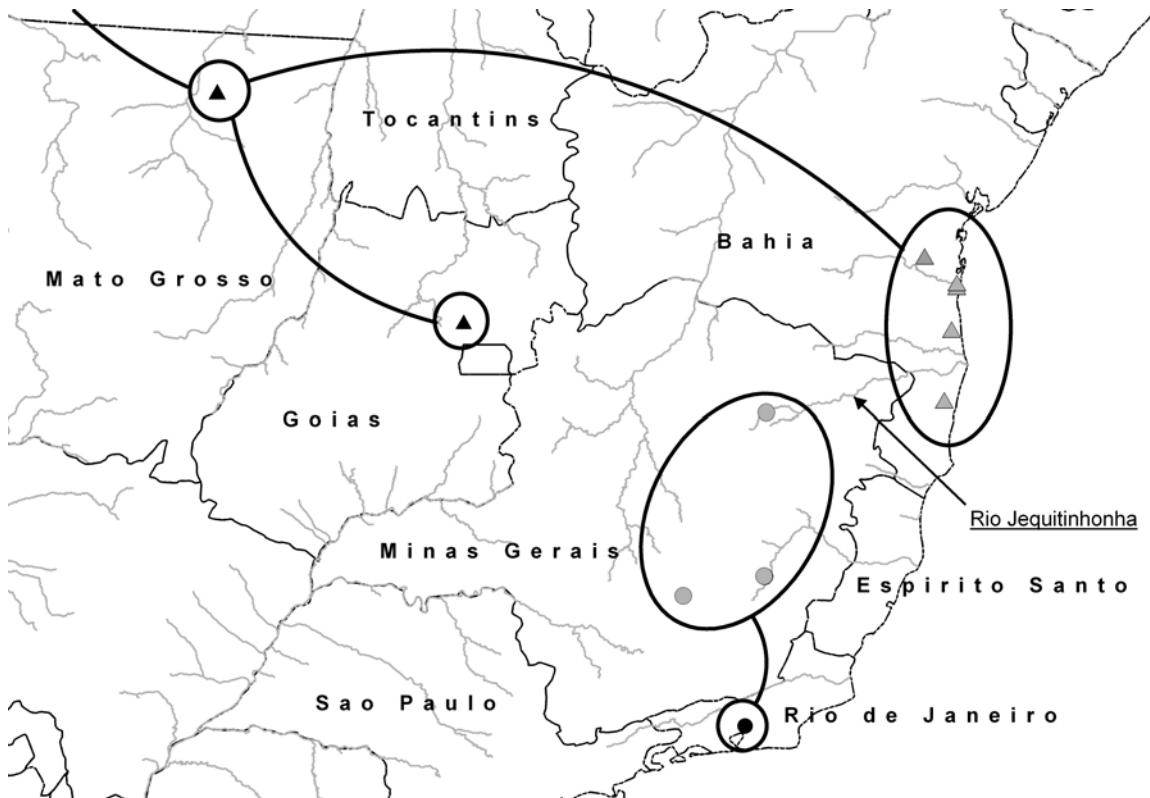


Figure 2B



APPENDIX 1:

Population Aggregation Analysis results for 1203 bp of DMP1 (Dentin Matrix Protein 1) nuclear gene: sample numbers and names (same ones from Table 2), localities, GenBank number, and bases of variable sites.

No.	Sample Name	Localities	Genbank	Bases position												
				57	159	160	161	163	180	211	249	255	275	317	340	356
1	DWF568	Peru, Loreto: Rio Galvez	EU327795	C	-	-	-	A	G	A	T	T	A	T	C	C
29	<i>Micoureus demerarae</i>	Peru, Loreto: Rio Galvez	gi71388223	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	2178	Brasil, AM: Santa Isabel	EU327796	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	2791	Brasil, MT: São José Xingu	EU327799	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	JEQ01 MG	Brasil, MG: Berilo, UHrapé	EU327805	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	JEQ05 MG	Brasil, MG: Berilo, UHrapé	EU327806	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	A1308 MGC	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Campolina	EU327808	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	A1427 MGC	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Campolina	EU327810	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	A1091 MGC	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Campolina	EU327811	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	266 MGC	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Campolina	EU327807	.	-	-	-	.	.	.	.	G	.	.	.	.
21	A1421 MG	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Vinhático	EU327814	.	-	-	-	.	.	.	.	G	.	.	.	.
16	A1317 MG	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Vinhático	EU327809	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	A315 MG	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Vinhático	EU327812	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	A815 MG	Brasil, MG: Marlieria, PERD <sup>1</sup> , Vinhático	EU327813	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	CB01 MG	Brasil, MG: Casa Branca	EU327815	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23	1287RJGuapimirim	Brasil, RJ: Guapimirim	EU327816	.	-	-	-	.	.	.	.	G	.	.	.	.
24	SaoPaulogi71388225	Brasil, SP: Capao Bonito	gi71388225	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	2304 GO Mimoso	Brasil, GO: Mimoso	EU327797	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	2320 GO Mimoso	Brasil, GO: Mimoso	EU327798	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	RM108 BA	Brasil, BA: Itacaré, Faz. Rio Capitão	EU327800	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	RM109 BA	Brasil, BA: Itacaré, Faz. Rio Capitão	EU327801	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	RM116 BA	Brasil, BA: Uruçuca, Faz. Caititu	EU327802	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	RM198 BA	Brasil, BA: Itamri, Faz. Alto S. Roque	EU327803	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	RM219 BA	Brasil, BA: Porto Seguro, PN Pau Brasil	EU327804	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	Mreggi71388227Acre	Brazil, AC: Igarapé Porongaba, right Rio Jurua	gi71388227	.	G	G	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.
25	MReg DWF659 Peru	Peru, Loreto: Rio Galvez	EU327817	.	A	G	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.
27	Mmurinagi71388205	Peru, Loreto: Rio Galvez	gi71388205	T	A	G	A	.	A	.	C	.	G	.	.	T
28	Mlepidagi71388201	Guyana, Potaro-Siparuni: Iwokrama Reserve	gi71388201	.	A	G	A	.	.	T	C	.	.	G	T	.
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	14	15

No.	Sample Name																										
		365	366	367	468	471	530	540	597	603	606	610	612	633	662	732	753	783	784	795	835	954	1000	1002	1010	1017	1146
1	DWF568	G	A	C	A	C	G	G	G	C	T	A	C	G	A	A	A	C	G	C	G	C	C	A	A	T	G
29	<i>Micoureus demerarae</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	2178	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	2791	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	JEQ01 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	JEQ05 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	A1308 MGC	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	A1427 MGC	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	A1091 MGC	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	266 MGC	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	A1421 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	A1317 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	A315 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	A815 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	CB01 MG	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23	1287RJGuapimirim	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24	SaoPaulogi71388225	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	2304 GO Mimoso	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
5	2324 GO Mimoso	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
7	RM108 BA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
8	RM109 BA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
9	RM116 BA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
10	RM198 BA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
11	RM219 BA	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
26	Mreggi71388227Acre	.	.	.	.	.	A	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
25	MReg DWF659 Peru	.	.	.	.	.	A	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
27	Mmurinagi71388205	.	.	G	.	.	.	.	A	.	C	.	T	.	.	.	G	.	.	.	A	.	G	.	.	C	A
28	Mlepidagi71388201	.	G	G	G	.	.	T	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	C	G	.	A
		16	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42

<sup>†</sup>PERD: Rio Doce State Park, MG, Brazil

## **CAPITULO III**

**Characterization of eight microsatellites loci in  
the woolly mouse opossum,  
*Micoureus paraguayanus*,  
isolated from *Micoureus demerarae*.**

**Characterization of eight microsatellites loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus*, isolated from *Micoureus demerarae*.**

I.M.G. DIAS<sup>†\*</sup>, G. AMATO<sup>‡</sup>, M.R.S. CARVALHO<sup>†</sup>, H.M. CUNHA<sup>†</sup>, A.P. PAGLIA<sup>†</sup>, R. DESALLE<sup>‡</sup>, C.G. FONSECA<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Departamentos de Biologia Geral e Zoologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-010, MG, Brazil. <sup>‡</sup>Sackler Institute for Comparative Genomics, American Museum of Natural History, New York, 10024, NY, USA.

\* Corresponding author

Isabela de Macedo Gomes Dias  
Av. Otacilio Negrão de Lima, 12395 – Belo Horizonte – MG – Brazil - 31365-450  
e-mail: [imgdias@yahoo.com](mailto:imgdias@yahoo.com)  
Fax: 55 31 34992570

**ABSTRACT**

Eight novel microsatellite markers were isolated from the woolly mouse opossum from the Amazon Forest in Peru, *Micoureus demerarae*, using a partial genomic DNA library and an enrichment protocol. These loci were polymorphic in *M. demerarae* and *Micoureus paraguayanus* populations from the Atlantic Forest in Brazil with the number of alleles ranging from 2 to 23. Those eight loci plus another five already described for *M. paraguayanus* will allow for the evaluation of genetic diversity of populations from the “Rio Doce” Park, one of the last Atlantic Forest fragments in Minas Gerais state, Brazil.

*Keywords:* microsatellites, conservation, *Micoureus*, opossum, Marsupialia, genomic library.

Neutral DNA markers, like microsatellites, find applications in many kinds of molecular genetics studies of wild populations; for instance they can provide information about the relatedness among individuals of unknown pedigree (DeSalle & Amato, 2004; Russello & Amato, 2004). The power to estimate relatedness, genetic distance and population structure using this type of markers depends on the genetic variability of the markers, the number of markers used, and the sample size (Ruzzante, 1998).

Widespread in South America rain forests, the genus *Micoureus* is composed of five species including *M. demerarae* and *M. paraguayanus* (Steiner & Catzeflis, 2004). These marsupials are

nocturnal, arboreal, and insectivorous-frugivorous (Pinheiro *et al.*, 2002). Until now these species have only been examined for five microsatellites loci (Rodrigues *et al.*, 2006).

We developed eight novel primer pairs for microsatellite loci from a *Micoureus demerarae* tissue sample, accessioned in the Ambrose Monell Frozen Collection – AMNH (ID: 110092, Amazon Forest, Peru). DNA extraction was carried out from ethanol-preserved liver using QIAGEN DNeasy® Tissue kit (Quiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions.

DNA concentration was estimated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide. Our library was constructed according to the Glenn & Schable (2005) protocols with few modifications here described. DNA was digested with RsaI enzyme (New England BioLabs, Inc.). Fragments were bound into SuperSNX24 linkers and a 25 µL PCR was performed to ensure successful ligation following Glenn & Schable (2005) recipe. Dynabeads (Dynal, Oslo, Norway) were used to enrich the PCR products (10µL) with a probe mix of twelve biotinylated oligonucleotide (1µM each) at 60°C. The probes were: (AC)<sub>10</sub>, (AG)<sub>10</sub>, (ACC)<sub>6</sub>, (AGG)<sub>6</sub>, (AGC)<sub>6</sub>, (ACG)<sub>6</sub>, (CCG)<sub>5</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (AAT)<sub>10</sub>, (ATC)<sub>8</sub>, (ACT)<sub>8</sub> and (AAC)<sub>8</sub>. Cloning was performed using 2µl of enriched PCR product with Topo TA Cloning Kit 45-0641 pCR® 2.1, One Shot TOP 10F Chemically Competent cells and imMedia™ agar plates following manufacturer's protocols (Invitrogen). One thousand and fifty six positive colonies were selected and incubated at 95°C for 10 minutes in 200 µL of TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH = 8.0). PCRs were performed with 1.5 µL of TE-colony templates and M13 forward and reverse primers (Glenn & Schable, 2005). PCR products were checked for inserts of desired size range (400 to 800 bp) by electrophoresis of 1.0% agarose gel with Sodium Borate running buffer (Brody & Kern, 2004), and selected products were sequenced using BigDye® Terminator method (Applied Biosystems Inc.) on an ABI 3730xl sequence analyzer. Sequences were edited in Sequencher 4.1 (Gene Codes Corp.) and 41 short tandem repeats (STR) were found using the Simple Sequence Repeat Identification Tool (Temnykh, 2001). We designed primers for seventeen promising loci using Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

Eighty-one *Micoureus* individuals were sampled in the Atlantic Forest in Brazil, including 76 *M. paraguayanus* and five *M. demerarae*. Total genomic DNA was extracted from blood or mouth-swab samples using Proteinase K-saline precipitation protocol (Sambrook & Russel, 2001) or QIAGEN

DNeasy® Tissue kit (Quiagen, Valencia, CA). Fourteen microsatellite loci were successfully amplified in 25 µL reaction volume using PuReTaq™Ready-To-Go™ PCR Beads according to manufacturer's instructions (GE Healthy Care, Amersham Bioscience, 2004). PCR were conducted in Eppendorf Gradient S – Mastercycle machines and cycling conditions included a denaturation step of 95°C for 10min, 30 cycles of 94°C for 30s, 54-58°C for 30s, and 72°C for 30s, and a final extension step at 72°C for 25 min using. Genotyping with fluorescent labeled primers on an ABI 3730xl sequence analyzer and GeneMapper 3.5 software (Applied Biosystems Inc.) resulted in eight reliably amplified, and polymorphic loci.

Table 1 lists the results of the analyses of these eight loci for the *M. paraguayanus* population and Table 2 shows the limited results available for the small *M. demerarae* sample. Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) was used to organize data and to measure polymorphism information content (PIC). Genetic polymorphism, expected and observed heterozygosity and the mean number of alleles per locus were estimated using GenePop version 3.4 software (Raymond & Rousset, 1995). Bonferroni correction for multiple tests was applied when testing for departure from Hardy-Weinberg Equilibrium (Rice, 1989). Loci polymorphisms ranged from low to high. With the exception of Mdem01, all loci showed significant heterozygote deficiency ( $P < 0.05$ ), and only two markers (Mdem01, Mdem12) did not depart significantly from Hardy-Weinberg Equilibrium. Those results are most likely due to high levels of inbreeding and not to the presence of null alleles. Linkage disequilibrium was not detected for any pair of loci ( $P < 0.01$ ). The eight loci here described plus the other five previously described (Rodrigues, 2004) will allow us to accurately study genetic diversity of populations from “Rio Doce” Park, as part of a long-term research project.

### **Acknowledgements**

We would like to thank colleagues from the Sackler Institute for Comparative Genomics, especially, Craig Starger, Matt Leslie, Francisca Almeida, Mohammad Faiz. The Mammalogy Laboratory of ICB-UFMG provided invaluable help for the field work. We especially thank Raquel Moura and Tudy Camara (Museum of Natural Sciences of PUC-MG) for supplying samples. This study was funded by

the CNPq Project PELD-PERD, CAPES Foundation (Ph.D. student fellowship) and the Sackler Institute for Comparative Genomics - AMNH.

## References

- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* **36**, 214-216.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**, 702-712.
- Glenn TC, Schable NA (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* **395**, 202-222.
- Park SDE (2001) *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection* University of Dublin.
- Pinheiro PS, Carvalho FMV, Fernandez FAS, Nessimian JL (2002) Diet of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **37**, 213-218.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing table of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rodrigues FP, Rocha FS, Garcia JE, *et al.* (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia : Didelphimorphia). *Molecular Ecology Notes* **6**, 686-688.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols* (eds. Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Russello MA, Amato G (2004) Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* **13**, 2829-2840.
- Ruzzante DE (1998) A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal Fish. Aquat. Science* **55**, 1-14.



Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. CSHL Press, New York.

Steiner C, Catzeflis FM (2004) Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossums (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography* **31**, 959-973.

Temnykh S, DeClerck, G., Lukashova, A. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research* **11**, 1441-1452.

Table 1: Characterization for a *Micoureus paraguayanus* population of eight microsatellites loci isolated from *Micoureus demerarae*. Ta = Annealing temperature; No. ind. = number of individuals successfully genotyped; Na = number of alleles at each locus; He = expected heterozygosity; Ho = observed heterozygosity; PIC = polymorphism information content.

Locus GeneBank n°.	Primer sequences (5'-3')	Repeat type	Ta(°C)	No. ind.	Alleles size (bp)	Na	He	Ho	PIC	P value (HWE)
Mdem01 EF486343	FAM-GGAAGGGGAGAGAAAAGAGAA TCAATCCATCATGGCAGCTA	(GGAA) <sub>14</sub>	57 °C	69	220-284	16	0.587	0.57	0.83	0.1281
Mdem06* EF486344	FAM-TGTGAAAACAGTAAAACAAATAAATGA TGAAATCTCCTTGTAGGGATGC	(TGAA) <sub>7</sub>	58 °C	76	188-256	8	0.336	0.25	0.46	0.0000
Mdem08* EF486345	FAM-AATTGTTTTCCGTTATTTGGA GTGGGCTAAAATGCAGAAGC	(ATG) <sub>7</sub>	58 °C	75	224-239	6	0.482	0.22	0.57	0.0000
Mdem09* EF486346	FAM-GCGTTATTTGAATTTTACAGAAACC TGTCCACTTCTCTCCAGTTGC	(AG) <sub>9</sub>	58 °C	74	244-260	9	0.52	0.32	0.61	0.0000
Mdem10* EF486347	HEX-ATCCATCCATTCATGCATTT TGCATGCATACATACACACAGAG	(CATC) <sub>8</sub>	54 °C	71	156-160	2	0.039	0.02	0.02	0.0416
Mdem11* EF486348	FAM-CTTTGCTCCATCACCCAGTT TCCTCTCCCTCTCTGTCTGC	(AG) <sub>9</sub> AC(AG) <sub>2</sub>	58 °C	73	257-315	23	0.544	0.49	0.72	0.0005
Mdem12 EF486349	FAM-GTACCATCACGGGCTTTGAC GGCTGTCCAAAAGAGGATG	(GT) <sub>29</sub>	57 °C	69	165-199	14	0.611	0.60	0.86	0.2326
Mdem15* EF486350	FAM-TGCTCTGTGGAGGATTGTGA CCCAGTGGGATAGCTCCTC	(TG) <sub>18</sub>	58 °C	69	194-246	12	0.594	0.49	0.84	0.0194

\* *H-W deviation loci*

Table 2: Characteristics of the microsatellite loci amplified in six samples of *M demerarae*.

No. ind.= number of individuals successfully genotyped.

Locus	No. ind.	No. of Alleles	Range Size
Mdem01	3	5	252-290
Mdem06	3	2	220-252
Mdem08	4	3	233-239
Mdem09	3	2	252-256
Mdem10	5	2	164-168
Mdem11	3	3	251-301
Mdem12	5	7	232-246
Mdem15	4	6	171-193

## **CAPITULO IV**

**Genetic and phenotypic population structure of the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* Tate 1931 (Didelphimorphia: Didelphidae), in a fragment of Atlantic Forest, Brazil.**

## MOLECULAR ECOLOGY

**Genetic and phenotypic population structure of the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* Tate 1931 (Didelphimorphia: Didelphidae), in a fragment of Atlantic Forest, Brazil.**

ISABELA M.G. DIAS<sup>†\*</sup>, GEORGE AMATO<sup>‡</sup>, HEITOR M. CUNHA<sup>†</sup>, ROB DESALLE,  
ADRIANO P. PAGLIA<sup>†</sup>, CLEUSA G. FONSECA<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Departamentos de Biologia Geral e Zoologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-010, MG, Brazil. <sup>‡</sup>Institute for Comparative Genomics, American Museum of Natural History, New York, 10024, NY, USA.

*Keywords:* microsatellites, *Micoureus*, opossum, population structure, morphology, heritability

\* Corresponding author

Isabela de Macedo Gomes Dias

Av. Otacilio Negrão de Lima, 12395 – Belo Horizonte – MG

Brazil - 31365-450

e-mail: [imgdias@yahoo.com](mailto:imgdias@yahoo.com)

Fax: 55 31 34992570

Opossum genetic and phenotypic structure

## ABSTRACT

Genetic and phenotypic structure of the woolly mouse opossum population, *Micoureus paraguayanus*, from an area of Atlantic Forest in Brazil, were analysed with 12 microsatellite loci and five repeated measures of body size: body length, tail length, tarsal length, ear size and body weight. To find out if this population is subdivided and to estimate heritability values for morphological traits, individuals were captured-marked-recaptured between the years 2000 and 2006. The mean heterozygosity found for park population was 0.67. Both sub-populations, Vinhático and Campolina, had significant values of heterozygote deficit. The estimated average of pairwise relatedness coefficient ( $k$ ) was 0.045 ( $0 < k < 0.55$ ). The morphological differentiation between subpopulations was not significant. The heritability values estimated for body length  $h^2 = 0.232$  and for body weight = 0.092 by Ritland (1996) method. Those results will help us in the near future to elucidate if this conservation unit is enough to maintain small mammal populations for long time.

## Introduction

Creation of a biodiversity reserve is not enough, by itself, to save threatened species (Fonseca 1997). If populations in a reserve cannot sustain themselves, the reserve will not fulfill its conservation objectives. It remains, thus, the challenge to design reserves and manage unprotected matrix habitats in such a way that ensures protection of the ecosystem and the maintainance of biological diversity (Salomon *et al.* 2006). To study population persistence in a conservation unit the knowledge of population characteristics is needed: genetic and phenotypic population structure, inbreeding rates, demography data like current population size and effective population size, reproductive season and mating systems (Hanski & Gaggiotti 2004; Salomon *et al.* 2006). Many tools are available to improve results in estimation of biological, demographic and genetics and other parameters, helping us to decide the best management program for a specific biodiversity reserve (DeSalle & Amato 2004; Brito & Fonseca 2006).

The capture-mark-recapture is one of the safest methods to evaluate population status in conservation units (Petit & Valiere 2006). It provides the means to collect morphological and reproductive informations at different individual's ages. It is also useful to estimate phenotypical covariances among traits and make inferences about population differentiation (Falconer & Mackay 1996). Multivariate analyses of morphological data have been used to elucidate different kinds of evolutionary and genetic problems. They proved to be useful to simplify the interpretation of the phenomena of interest, by building indices or alternative variables, as well as groups of measured units, synthesizing original information. They offer also the possibility to investigate dependence relations among variables with prediction objective, to compare populations or to validate estimations by testing hypothesis. One of the more useful of these methods is Principal Components Analysis (PCA) (Barbosa 1993; Meulman *et al.* 2004; Mingoti 2005).

Neutral markers like microsatellites (simple tandem repeats) are largely employed in studies of paternity, genetic structure and diversity of wild populations, because of their high informative content (DeWoody 2005). Such markers allow us to study quantitative genetic variation of fitness related traits and population viability (Lynch & Ritland 1999). Ritland (1996, 2000) developed a method-of-moments estimator to infer pairwise relatedness coefficient ( $r_{xy}$ ) at both genic and genotypic level. This method was improved by Lynch & Ritland (1999), who suggested that at least 10 multiallelic loci are needed to decrease the

estimation errors. Heritabilities are then estimated by regression of pairwise differences in trait values between individuals on their pairwise relatedness (Ritland 1996b; Ritland 2000; Kleunen & Ritland 2005). It is important to emphasize that, with small number of loci and/or small number of individuals sampled, it is difficult to make precise statements about differences in relatedness between particular pairs of individuals or precise estimation of heritabilities (Ruzzante 1998; Lynch & Ritland 1999; Charmantier & Réale 2005; Kleunen & Ritland 2005).

Heterogenic because of longitudinal extension, climatic (temperatures range from 4°C to 32°C) and altitude (ranging from ocean level to 2,900m) divergences, the biome Atlantic Forest is composed of various types of vegetation: semi-decidual and decidual forest, mangrove forest, costal low forests (restingas), Araucaria forest and shrubby montane savannas (Morellato & Haddad 2000). The Atlantic Forest is considered the fourth hotspot in conservation biodiversity priority, due to the number of endemic plants and vertebrates, plants and vertebrates endemism rates (species/area) and also to the reduction of its area to just 8.1% of the original vegetation (Capobianco 2001; Mittermeier *et al.* 2005; Tabarelli *et al.* 2005). At Minas Gerais, where just 11.251 km<sup>2</sup> of area remain, the situation of Atlantic Forest is still worst. This means 4% of Atlantic Forest original area, composed of small islands of original vegetation (Drummond *et al.* 2005).

Created in 1944, the Rio Doce state park (PERD – Parque Estadual do Rio Doce) is one of the last Atlantic Forest fragments in Minas Gerais state. Almost completely isolated, it has little forest fragments in their neighbourhood, owned by cattle and eucalypt farmers. Consequently, the connection across the matrix of habitat became difficult (Fonseca 1997; Seeliger *et al.* 2002; IEF-MG 2007). Considered a medium size conservation unit (360km<sup>2</sup>), the park is classified as category A of conservation priority by the “Conservation and Sustainable Use of Brazilian Biological Diversity Project” (PROBIO). Some studies about the species richness of the park have been done. Then, there is no doubt about the importance of the PERD for species richness and for representation of Atlantic Forest biome in Brazil (Grelle 1996; Fonseca 1997; Machado & Fonseca 2000; Grelle 2003; Nemésio & Silveira 2006). But, only one study with plants was already done about the genetic diversity (Ribeiro *et al.* 2005). With the goal of making a broad biological inventory of the PERD, a Long Term Ecological Research Project (LTER) began in 2000 and will be done in 2010. Part of this big project were the subprojects “Genetic analysis of quantitative traits associated with adaptation of small mammals of Rio Doce region (Minas Gerais, Brazil)” and “Survey of small non-flying mammals of Rio Doce region (Minas Gerais, Brazil)”. Here, small terrestrial



mammals were captured-marked-recaptured to study their ecological features and current genetic situation. Among them, the woolly mouse opossum (*Micoureus sp*) was chosen for this paper due to their attributes of short generation time, of less than one year, according to Brito & Grelle (2004), and their capture frequency in last years.

According to Dias *et al.* (2007) *Micoureus paraguayanus* Tate, 1931 is the most abundant marsupial species found at PERD. The most arboreal among small sizes didelphids, it is nocturnal and insectivore-frugivore. According to other studies, their body size range from 130 to 200 mm, their prehensile tail size range from 170 to 210 mm and their body weight range from 80 to 200 g (Hildebrand 1961; Charles-Dominique *et al.* 1981; Richard-Hansen *et al.* 1999; Viveiros de Castro & Fernandez 2004; Delciellos & Vieira 2007). Its breeding season is the rain season of Tropical Forests, from September to March (Cerqueira 2005). Polygynous, it has 17 to 24 youngs in a year and its life-span ranges from 15 to 30 months (Viveiros de Castro & Fernandez 2004).

This study purposes to define population genetic and phenotypic structure of the woolly mouse opossum population of the PERD, to find out if this population is divided into sub-populations and to estimate heritability values for morphological traits. Those results will helps us in the near future to elucidate if this conservation unit is enough to maintain small mammal populations for long time.

## **Methods**

### *Study area and sampling*

The study was conducted at Parque Estadual do Rio Doce (PERD), eastern of Minas Gerais state in Brazil (19°48'-19°29'S, 42°38'-42°28'W). Having a broad lacustrine system, PERD is a 35,976 ha state park, which vegetation is classified as Atlantic Semi-deciduous Forest. Its climate is Aw-Tropical Warm semi-humid as Köppen Classification; the average temperature is 22.0 + 2.2°C and the average annual precipitation is 1,478.8mm(Guilhuis 1986). At North its border is Piracicaba River, at east it is Doce River and at south Mumbaça River (IEF-MG 2007). At the West border there are the MG-320 road, not paved, 20m wide, and some cattle and eucalypt big farms. Starting at MG-320 road in Cava Grande village and crossing the park in the middle, from west to east sides, is the MG-122 not paved road, 10m wide, which shares the park into two fragments (North and South). Both roads have intensive flux of

vehicles, mainly trucks (Scoss 2002). The study was carried out at two park localities, having 13.9 km of distance between them. The Vinhático trail (S19°45'55", W 42°37'23.9"), forest in second suTBLeesion state because it was partially burned in 1967 (Bovini *et al.* 2001), is located at South Park. The Campolina (19°42'09"S, 42°37'51.2"W), a 130-ha area of the reserve which is considered a primary forest (Ribeiro *et al.* 2005), is part of the North park.

Sampling of *Micoureus paraguayanus* have been conducted at bimonthly periods of five nights each one, since November 2000 until September 2006. At each locality one trapping grid of 113.1m<sup>2</sup> area was established, with three parallel transects containing 15 trap stations, spaced 20-m intervals, 45 trap stations per grid. Each trap station had one Tomahawk live trap (41 x 13 x 13 cm; Tomahawk Live Trap Company, Tomahawk, Wisconsin) and one Sherman live trap (16 x 5 x 5 cm; H.B.Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Florida) placed alternately on the ground and in the understory (1.5 - 2 m aboveground), for a total of 90 by locality.

Each trap was baited with a mixture of bananas soaked with granulated corn and a cotton ball soaked with codfish oil. Each animal captured was marked with small animal ear-tag (National Band and Tag Co.) at left side and released at the point of capture after data collection. For each individual, the species name, sex, spatial localization (area, transect, trap station and trap position), body measurements and reproductive condition (pouch young, swollen and number of mammae and position of testes for males) were recorded. Body measurements were: body length (BL - tip of nose to inflection point of tail), tail length (T – inflection point with body to tip of flesh), left tarsal length (LT – heel to tip of claws), left ear length (LE), all in millimeters, and body weight (BW) in grams. For population genetic studies, since July 2003 we have been collecting blood samples from a tail base vein using 1ml syringe, and/or a mouth swab using a small brush. Blood was preserved in EDTA 5M and mouth cells were preserved in TE solution (Tris 10mM-EDTA 1mM).

### *Laboratory analysis*

DNA was extracted from blood or mouth-swab samples using Proteinase K - saline precipitation protocol (Sambrook & Russel 2001) or QIAGEN DNeasy® Tissue kit (Quiagen, Valencia, CA). A total of 61 individuals were genotyped using the same primers sequences and annealing temperature for all 13 microsatellite loci developed for the genus *Micoureus*(Rodrigues *et al.* 2006; Dias *et al.* 2007): Mpa01 (GeneBank aTBLeesion no.: DQ219428), Mpa02 (GeneBank aTBLeesion no.: DQ219429), Mpa03 (GeneBank

aTBLesson no.: DQ219431), Mpa04 (GeneBank aTBLesson no.: DQ219432), Mpa05 (GeneBank aTBLesson no.: DQ219430), Mdem01 (GeneBank aTBLesson no.: EF486343), Mdem06 (GeneBank aTBLesson no.: EF486344), Mdem08 (GeneBank aTBLesson no.: EF486345), Mdem09 (GeneBank aTBLesson no.: EF486346), Mdem10 (GeneBank aTBLesson no.: EF486347), Mdem11 (GeneBank aTBLesson no.: EF486348), Mdem12 (GeneBank aTBLesson no.: EF486349) and Mdem15 (GeneBank aTBLesson no.: EF486350). PCR reactions were performed for each locus separately in 25  $\mu$ L total volume reactions using 1  $\mu$ L of *M. paraguayanus* genomic DNA, fluorescent labeled primers, PuReTaq<sup>TM</sup>Ready-To-Go<sup>TM</sup> PCR Beads according to manufacturer's instructions (GE Healthcare, Amersham Bioscience, 2004) and Eppendorf Gradient S – Mastercycle machine. PCR standard conditions were: denaturation step of 95°C/10min, 30 cycles of 94°C/30s, annealing temperature/30s, 72°C/30s and final extension at 72°C/25min using. The products were analyzed in an ABI 3730xl automated sequencer and resulting patterns analyzed using the GeneMapper 3.5 software (Applied Biosystems Inc.).

#### *Data analysis*

Microsatellites data from 13 loci were first organized with Excel Microsatellite Toolkit (Park 2001) in order to have suitable files to use in different genetic analysis softwares. Genetic polymorphisms of each locus for each locality and across all PERD samples were measured as expected heterozygosity ( $H_E$ ), observed heterozygosity ( $H_O$ ) and the mean number of alleles per locus ( $A$ ) using GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995) and Polymorphism Information Content (PIC) using Excel Microsatellite Toolkit (Park 2001). PIC is closely related to the heterozygosity score and described as the chance of a given marker being informative in one given mating in a random breeding population (Botstein *et al.* 1980). One monomorphic locus (Mdem10) was excluded from statistical analysis. Departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and estimations of null allele frequency ( $n$ ) were calculated using CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.* 2006). Linkage Disequilibrium tests were performed for all possible combinations of loci. Genic and genotypic differentiation between the two park populations (Vinhático and Campolina) was tested using the default settings of GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995).

The genetic differentiation and distance between populations were tested using GENEPOP: version 3.4 (Raymond & Rousset 1995) and Arlequin: version 3.1 (Excoffier *et*

al. 2005). We estimated pairwise matrix distance ( $F_{wc\_st}$ ) (Weir & Cockerham 1984) and its analogous  $Rho\_st$  (Stalkin 1995). To calculate the average pairwise difference between localities the equation  $Pi_{XY} - (Pi_X + Pi_Y)/2$  was used ( $Pi_{XY}$  is average number of pairwise differences between populations and  $Pi_X$  is average number of pairwise differences within population) (Excoffier *et al.* 2005). Number of migrants were estimated using the private alleles model (Barton & Slatkin 1986) using GENEPOP: version 3.4 (Raymond & Rousset 1995).

ML-Relate program (Kalinowski *et al.* 2006) was used to estimate pairwise relatedness, meaning the probability that genotypes in a pair of individuals share zero, one or two alleles identical by descent by maximum likelihood equation (Wright 1922a; Blouin 2003). Then, we could estimate the average relatedness coefficient ( $k$ ) in the whole PERD population and each locality to test significant difference between them. The program Mark (Ritland 2006) was used to calculate pairwise relatedness ( $r$ ) by the method of Ritland (1996), which is a method-of-moments estimator. This approach is based upon the fact that between two individuals, each denoted  $i$ , each allele  $j$  at each locus gives an estimate of relatedness  $R_i$ . The Mark program (Ritland 2006) was used again to obtain heritability estimates by the regression of pairwise differences in each body measurement values between individuals on their pairwise relatedness, at all PERD population (Ritland, 1996).

For better understanding of morphological data of repeated body measurements in different animals' life times a multivariate statistical analysis was used, the principal components method (PCA). We made cluster analysis to classify different measurements of each individual into groups by total body size ( $TBL = BL + T$ ). After that, the PCA analysis was made to reduce the body measurements (BL, T, LT, LE, and BW) to one index of body size. The indices were calculated for each principal component ( $Y_i$ ),

$$Y_i = \lambda_1(BW) + \lambda_2(BL) + \lambda_3(T) + \lambda_4(LT) + \lambda_5(LE),$$

were  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5$  are eigenvalues for each body measurement in the covariance matrix. They allow us to understand the correlation between each pair of body measurement (Asensio 1988; Meulman *et al.* 2004; Mingoti 2005). Then, using those indices the phenotypic differentiation was analyzed for all PERD population in each class, by locality and by sex using the general linear model (GLM).

## Results

### *Genetic variation*

The twelve microsatellites were highly polymorphic in the whole PERD population. PIC values ranged from 0.524 to 0.891 and the mean number of alleles per locus, that ranged from six to 25, was 13.25. There were significant departures from HWE in three loci, Mdem06, Mdem08 and Mdem09 ( $p < 0.01$ ), all due to heterozygote deficiencies, after Bonferroni and Yate's correction. At the same loci, the average frequencies of null alleles were expressive. Levels of genetic diversity were moderate to high, with a mean expected heterozygosity of 0.8072 (Table 01), except for the loci with HWE deviation. Linkage disequilibrium was detected for locus pairs Mpa04 / Mpa05 ( $p < 0.01$ ) and Mdem08 / Mpa02 ( $p < 0.05$ ) by Markov Chain method (10,000 batches).

Both sub-populations (Vinhático and Campolina) had significant values of heterozygote deficit ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). Both genic and genotypic differentiation between Campolina and Vinhático were significant (genic:  $Chi^2 = 68.671 / p < 0.0001$ ; genotypic:  $Chi^2 = 54.194 / p < 0.001$ ) by Markov Chain method (10,000 batches). Allele size based correlation ( $Rho_{IS}$ ), over all loci, were measured for Vinhático ( $Rho_{IS} = 0.0255$ ) and for Campolina ( $Rho_{IS} = 0.1108$ ).

Estimation of genetic differentiation between the two localities were:  $F_{wc\_st} = 0.0141$  and  $Rho_{st} = 0.0209$ ; both values were significant ( $p < 0.01$ ). The average pairwise difference found was 0.12305 ( $p < 0.01$ ). The mean frequency of private alleles was 0.0305 and the number of migrants ( $Nm$ ) after correction for sample size were  $Nm = 4.37$ .

The estimated average of pairwise relatedness coefficient ( $k$ ) in PERD population was 0.045 ( $0 < k < 0.55$ ). The estimated mean of  $k$  coefficient was 0.040 for Vinhático ( $0 < k < 0.518$ ) and 0.038 for Campolina ( $0 < k < 0.555$ ). After we made classes of  $k$  values (class 1 for zeros; class 2  $0 < k \leq 0.25$ ; class 3  $k > 0.25$ ) we test the hypothesis of difference between the two localities. The difference between Campolina and Vinhático numbers of individuals in each class of relatedness was not significant. The estimated average of pairwise relatedness coefficient  $r$  in PERD population was 0.060 ( $0 < r < 0.316$ ).

### *Phenotypic variation*

By means of a cluster analysis the different measurements of each individual were grouped by total body size (TBL) : class 1 (TBL < 300 mm), class 2 (300 mm ≤ TBL < 360 mm), class 3 (360 mm ≤ TBL < 420 mm) and class 4 (TBL ≥ 420 mm) (Table 2). The values of coefficients of variation ( $CV_{BL}= 15.02$ ;  $CV_T=12.05$ ;  $CV_{LT}=10.97$ ;  $CV_{LE}=14.70$ ) were low. The normality of each body measurement was tested, using Kolmogorov-Smirnov test: all measurements, in all classes, showed significant non-normality deviation ( $p < 0.05$ ), with the exception of BW. BL, T, LT and LE presented positive skewness and were leptokurtic. This means that points are distributed in direction of higher values, with some small and outliers values (O'Rourke *et al.* 2005). (Figure 1 to see graphics). When Vinhático and Campolina were compared using body measurements the phenotypic difference were not significant. Significant differences between sexes were found.

The correlation matrix for each class at the PCA analysis showed some positive significant values especially for TBL3 and one negative value for BL x T for TBL 3 (Table 3). The correlations between other body measurements, not showed on Table 3, especially for TBL2, were not significant ( $p>0.05$ ). Then, the  $Y_i$  indices were calculated for the principal components which, together, represented at least 85% of the phenomenon, it means here, first ( $Y_1$ ), second ( $Y_2$ ), third ( $Y_3$ ) and fourth ( $Y_4$ ) principal components. These indices were used to make inferences about phenotypic differences by localities and by sex. We did not found significant effect of localities, for all classes and all  $Y_i$  indices, with  $F < 1.0$  when the model was significative. The sex had significant effect ( $p < 0.01$ ) in  $Y_i$  indices at some classes: TBL1 ( $Y_1$ ), TBL2 ( $Y_1$ ), TBL3 ( $Y_1, Y_3$ ) and TBL4 ( $Y_4$ ).

#### *Heritability analysis*

After genotypic phenotypic analysis, heritability values ( $h^2$ ) were estimated for each body measurement from TBL4 using Ritland (1996) method. This class was chose because represent the adult range size of the species. The heritability values were estimated for body length  $h^2 = 0.232$  and for body weight  $h^2 = 0.092$ . Both are significant at 100 bootstrap level. Other three body measurements, did not show significant values of heritability, whose can not be interpreted (negative values).

#### **Discussion**

### *Analysis of genetic variation*

Microsatellite heterozygosity level observed ( $He$  mean = 0.67) was higher than value 0.419 found for other *M. paraguayanus* from the fragmented population of Morro do Diabo State Park, SP, Brazil (Rodrigues 2004). Overall, the mean expected heterozygosity across all loci calculated from microsatellites falls within the interval ( $0.60 \pm 0.16$ ) found for 46 species of terrestrial animals (DeWoody & Avise 2000). This level of diversity and the non significant difference between two park localities appears to be result of the absence of population structure in the Park; it means the PERD samples came from a unique population. Despite the high values of allelic diversity, PIC and expected and observed heterozygosity for 75% of the microsatellite loci analysed, one from 13 loci was monomorphic (Mdem10,  $A = 2$ ) and other three have low levels of observed heterozygosity (Mdem06, Mdem08, Mdem09; see values, in table 1). These facts allow us to suggest that the *M. paraguayanus* population at PERD can be suffering a process of genetic diversity lost. The high frequencies of null alleles estimated for the same three loci cited above were due to deficits of heterozygosity from inbreeding effect or PCR failure regarding inconsistent DNA template (Dakin & Avise 2004).

### *Population genetic structure*

Low  $F_{wc\_st}$  and  $R_{ho\_st}$  values between two PERD localities indicated no structure at PERD population. The distance of 13.9 km of continues forest is not too big and permits horizontal dispersion across the forest. The maximum values of pairwise relatedness between individuals from Campolina and Vinhático localities, which are values considered for full-sibs or parent-offspring relationship ( $k = 0.50$ ), and for half-sib relationship ( $r = 0.30$ ) allow us to suggest that some *M. paraguayanus* individuals can disperse inside continues forest, which do not happen where forest fragmentation and the habitat matrix are not favorable to dispersions (Pires & Fernandez 1999; Quental *et al.* 2001).

### *Population phenotypic structure*

Most of body measurement found here were in agreement with body measures made in prior studies (Hildebrand 1961; Charles-Dominique *et al.* 1981; Richard-Hansen *et al.* 1999; Viveiros de Castro & Fernandez 2004; Delciellos & Vieira 2007). The explanation for outlier body measurements values that caused asymmetry of normal curve (they were leptokurtic and

skewness negative, figure 1) for BL, T, LT and LE, can be accidents that happen with animals, especially on tail and ear or in measurement field mistakes.

The classes of total body size allow us to have an idea about what was the development stage of each individual at the time they were captured (infant, juvenile, sub-adult and adult). It was confirmed by our personal observation at the field work. The positive correlations between body measurements at TBL1 were coherent with the idea that TBL1 is the second development stage, when the infant starts to be independent.

The lack of significant differences of  $Y_i$  by local confirm genetic results that indicates that the park is not subdivided, at least to *M. paraguayanus* population. For that population, males were bigger than females. This sexual dimorphism is in agreement with other studies for the Didelphidae family (Richard-Hansen *et al.* 1999; Cerqueira & Lemos 2000) although another study indicates monomorphism in their *Didelphis* sp. samples (Ventura *et al.* 2002).

#### *Heritability analysis*

Determination of the heritability is one of the first objectives in the genetic study of a metric character. Whenever a value is stated for the heritability of a given character it must be understood to refer to a particular population under particular conditions (Falconer & Mackay 1996). Heritability values estimated here for T, LT and LE measurements by Ritland (1996) method were outside the biological interpretation and had larger standard errors which indicate unstable estimations as suggested by Kleunen and Ritland (2005). Not significant heritability values for BL and BW were found. This can be resulted from the excess of diversity in structure of the PERD population, since we do not have the pedigree information, or because of small amount of sample analyzed or even both (Falconer & Mackay, 1996; Ritland, 2000). These values could provide a good qualitative indicator of the influence of genetic variation on corporal measurements (Kleunen & Ritland 2005). It is important to realize here that heritability is a property not only of a character but also of the population, of the environmental circumstance to which the individuals are subjected. Small populations maintained long enough for an appreciable amount of fixation to have taken place are expected to show lower heritabilities than large populations. The environmental variance is dependent on the conditions of habitat management: more variable conditions reduce the heritability and more uniform conditions increase it (Falconer & Mackay 1996). Since heritability cannot easily be estimated, more samples and more polymorphic microsatellites loci that amplify for *M. paraguayanus* species can improve the accuracy of the population



structure of Ritland (1996) method (Ritland 2000; Kleunen & Ritland 2005). Programs and new methods need to be created to correct errors that cause underestimation of heritability in natural populations with unknown pedigree.

### *Conclusions for conservation and management*

The MG-122 not paving road, that shares the park into two fragments, does not affect genetic and phenotypic diversity of the woolly mouse opossum within north and south park fragments as was suggested in prior study (Scoss 2002). It means that those animals, which have horizontal distribution (they are solitary, the female territories do not overlap and the male territories overlap female territories), because their behaviour and kind of spatial distribution, can spread at park area with facility (Pires & Fernandez 1999).

Here we can suggest that currently *M. paraguayanus* is not threatened at short time. To affirm that they have long term persistence, future studies using PVA analysis will be necessary (Brito & Fonseca 2006). Finally, our results support the importance of protection that conservation unit of Atlantic forest, as a way to save endangered species from threatens, although the PERD isolation can be a barrier to save those species at long term survival.

### **Acknowledgements**

We would like to thank all friends from the laboratory of Inst. Comp. Genomics, specially, Craig Starger, Matt Leslie, Francisca Almeida, Mohammad Faiz. Special thanks to friends from the Mammalogy Laboratory and the Genetics and Conservation Biology Laboratory from General Biology Department of ICB - UFMG, that helped us with the field work. This study is funded by CNPq Project PELD-PERD, CAPES Foundation (PhD. student fellowship) and Institute for Comparative Genomics - AMNH.

### **References**

- ASENSIO, L. J. (1988) *Técnicas de análisis de datos multidimensionales: Bases teóricas y aplicaciones en agricultura.*, Ministério da Agricultura, Pesca y Alimentacion.
- BARBOSA, C. G. (1993) Estudo morfométrico na raça Mangalarga Marchador. *Escola de Veterinária - Zootecnia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.

- BARTON, N. H. & SLATKIN, M. (1986) A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56, 409-415.
- BLOUIN, M. S. (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18, 503-511.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. & DAVIS, R. L. (1980) Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- BOVINI, M. G., CARVALHO-OKANO, R. M. D. & VIEIRA, M. F. (2001) Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, 52, 17-47.
- BRITO, D. & FONSECA, G. A. B. D. (2006) Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: An endemic marsupial of the Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 15, 1713-1728.
- BRITO, D. & GRELLE, C. E. D. (2004) Effectiveness of a reserve network for the conservation of the endemic marsupial *Micoureus travassosi* in Atlantic Forest remnants in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 13, 2519-2536.
- CAPOBIANCO, J. P. R. (2001) Dossie Mata Atlântica: Projeto monitoramento participativo da Mata Atlântica. Sao Paulo, Rede de ONGs da Mata Atlântica, Instituto Socioambiental, Sociedade Nordestina de Ecologia.
- CERQUEIRA, R. (2005) Fatores ambientais e a reprodução de marsupiais e roedores no leste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 63, 29-39.
- CERQUEIRA, R. & LEMOS, B. (2000) Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia*,
- CHARLES-DOMINIQUE, P., ATRAMENTOWICZ, M., CHARLES-DOMINIQUE, P., GERARD, H., HLADIK, C. M. & PREVOST, M. F. (1981) Les mammifères frugivores arboricoles nocturnes d'une forêt guyanaise: inter-relations plantes-animales. *Revue d'Ecologie Terre et la Vie*, 35, 341-435.
- CHARMANTIER, A. & RÉALE, D. (2005) How do misassigned paternities affect the estimation of heritability in the wild. *Molecular Ecology*, 14, 2839-2850.
- DAKIN, E. E. & AVISE, J. C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504-509.
- DELICIELLOS, A. C. & VIEIRA, M. V. (2007) Stride lengths and frequencies of arboreal walking in seven species of didelphid marsupials. *Acta Theriologica*, 52.

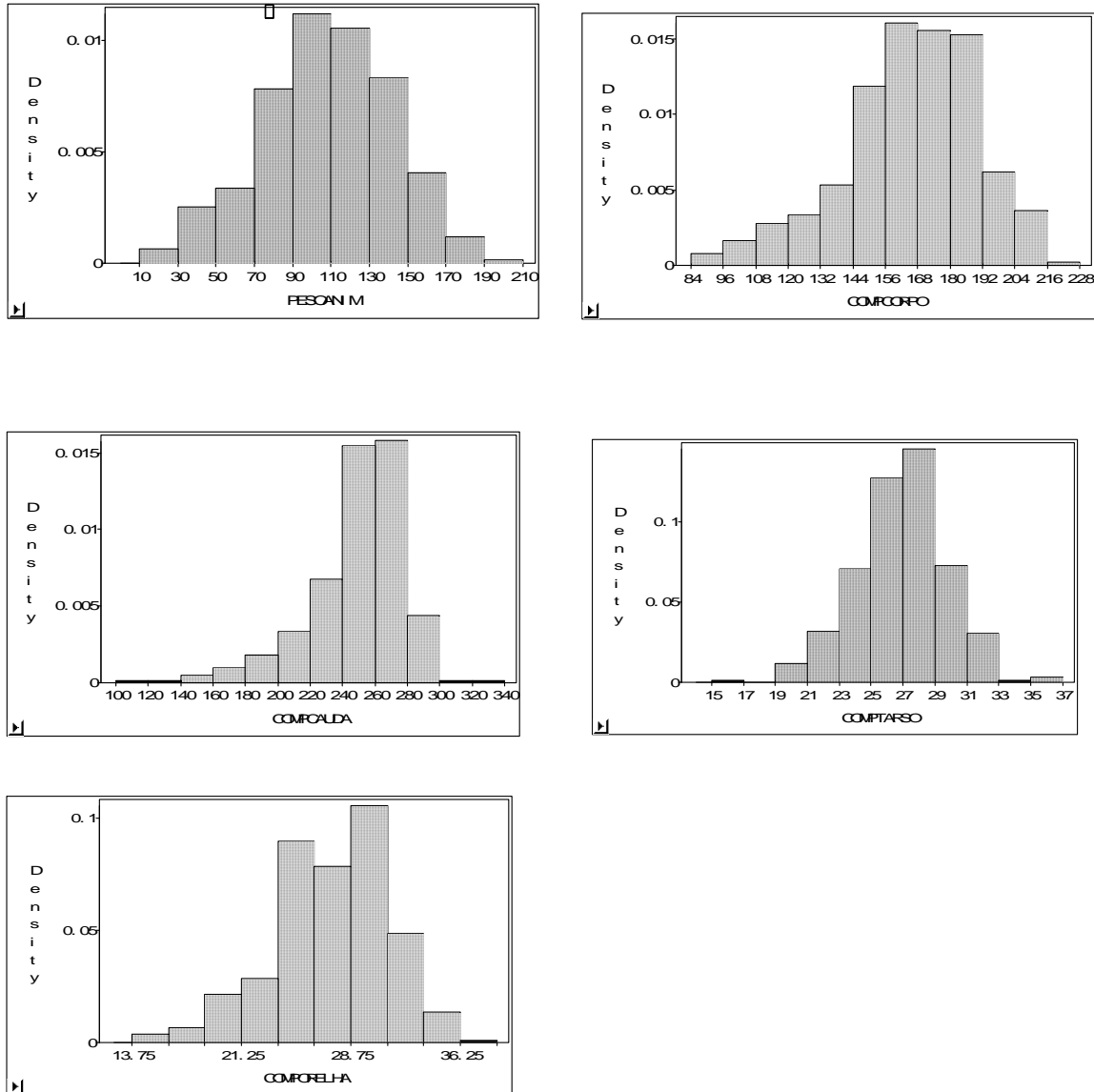
- DESALLE, R. & AMATO, G. (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5, 702-712.
- DEWOODY, J. A. (2005) Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals. *J. Wild. Manage*, 69, 1-19.
- DEWOODY, J. A. & AVISE, J. C. (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, 461-473.
- DIAS, I. M. G., AMATO, G., CUNHA, H. M., PAGLIA, A. P., CARVALHO, M. R. S., DESALLE, R. & FONSECA, C. G. (2007) Isolation and cross-species characterization of eight microsatellites loci from the woolly mouse opossum, *Micoureus demerarae*. *Molecular Ecology*.
- DRUMMOND, G. M., MARTINS, C. S., MACHADO, A. B. M., SEBAIO, F. A. & ANTONINI, Y. (Eds.) (2005) *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua preservação.*, Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- FALCONER, D. S. & MACKAY, T. F. C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, Essex, Longman.
- FONSECA, M. T. (1997) A estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata atlântica e monocultura de eucalipto: a importância da matriz de hábitat. . *Instituto de Ciências Biológicas*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- GRELLE, C. E. V. (1996) Análise tridimensional de uma comunidade de pequenos mamíferos. . *Instituto de Ciências Biológicas*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
- GRELLE, C. E. V. (2003) Forest structure and vertical stratification of small mammals in a secondary Atlantic forest, southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 38, 81-85.
- GUILHUIS, J. P. (1986) *Vegetation survey of the Parque Florestal Estadual do Rio Doce, MG, Brasil.* , Wageningen, Agricultural Univ. of Wageningen.
- HANSKI, I. & GAGGIOTTI, O. E. (2004) *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations.*, Burlington, Elsevier Academic Press.

- HILDEBRAND, M. (1961) Body proportions of didelphid marsupials. *American Journal of Anatomy*, 99, 239-249.
- IEF-MG (2007) Encarte 1: Informações gerais da Unidade de Conservação - Parque Estadual do Rio Doce. IEF - Instituto Estadual de Florestas / Projeto Doces Matas.
- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L. & MARSHALL, T. C. (2006) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, in press.
- KLEUNEN, M. V. & RITLAND, K. (2005) Estimating heritabilities and genetic correlations with Marker-based methods: an experimental test in *Mimulus guttatus*. *Journal of Heredity*, 96, 368-375.
- LYNCH, M. & RITLAND, K. (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152, 1753-1766.
- MACHADO, R. B. & FONSECA, G. A. B. D. (2000) The avifauna of Rio Doce Valley, Southeastern Brazil, a highly fragmented area. *Biotropica*, 32, 914-924.
- MEULMAN, J. J., KOOIJ, A. J. V. D. & HEISER, W. J. (2004) Principal Component Analysis with nonlinear optimal scaling transformations for ordinal and nominal data. IN KAPLAN, D. W. (Ed.) *The SAGE handbook of quantitative methodology for the social sciences.*, SAGE Publications, Inc.
- MINGOTI, S. A. (2005) *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada.*, Belo Horizonte, Editora UFMG.
- MITTERMEIER, R. A., GIL, P. R., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C. G., LAMOREUX, J. & FONSECA, G. A. B. D. (2005) *Hotspots Revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.*, Conservation International.
- MORELLATO, L. P. C. & HADDAD, C. F. B. (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, 32, 786-792.
- NEMÉSIO, A. & SILVEIRA, F. A. (2006) Edge effects on the Orchid-Bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at a large remnant of Atlantic Rain Forest in Southeastern Brazil. *Neotropical Entomology*, 35, 313-323.
- O'ROURKE, N., HATCHER, L. & STEPANSKI, E. J. (2005) *A Step-by-Step Approach to Using SAS for Univariate & Multivariate Statistics.*, Cary, NC, SAS Institute Inc.
- PARK, S. D. E. (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection Dublin, University of Dublin.

- PETIT, E. & VALIERE, N. (2006) Estimating Population Size with Noninvasive Capture-Mark-Recapture Data *Conservation Biology*, 20, 1062-1073.
- PIRES, A. D. S. & FERNANDEZ, F. A. D. S. (1999) Use of space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 15, 279-290.
- QUENTAL, T. B., FERNANDEZ, F. A. D., DIAS, A. T. C. & ROCHA, F. S. (2001) Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 17, 339-352.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- RIBEIRO, R. A., RAMOS, A. R., LEMOS FILHO, J. P. & LOVATO, M. B. (2005) Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, 95, 1171-1177.
- RICHARD-HANSEN, C., VIÉ, J.-C., VIDAL, N. & KÉREVEC, J. (1999) Body measurements on 40 species of mammals from French Guiana. *Journal of Zoology*, 247, 419-428.
- RITLAND, K. (1996b) A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, 50, 1062-1073.
- RITLAND, K. (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9, 1195-1204.
- RITLAND, K. (2006) Mark - Marker inferred relatedness and quantitative inheritance program. IN RITLAND, W. B. K. (Ed.) 2.1 ed., University of British Columbia.
- RODRIGUES, F. P. (2004) Analise da estrutura genetica em populacoes naturais de pequenos mamiferos, no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlantica adjacentes. *Instituto de Biociencias*. Sao Paulo, Universidade de Sao Paulo.
- RODRIGUES, F. P., ROCHA, F. S., GARCIA, J. E., GARCIA, J. F., DE VIVO, M. & MATIOLI, S. R. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia : Didelphimorphia). *Molecular Ecology Notes*, 6, 686-688.
- RUZZANTE, D. E. (1998) A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal Fish. Aquat. Science*, 55, 1-14.

- SALOMON, A. K., RUESINK, J. L. & DEWREEDE, R. E. (2006) Population viability, ecological processes and biodiversity: valuing sites for reserve selection. *Biological Conservation*, 128, 79-92.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, New York, CSHL Press.
- SCOSS, L. M. (2002) Impacto de estradas sobre mamíferos terrestres: o caso do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. *Ciência Florestal*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- SEELIGER, U., CORDAZZO, C. V. & BARBOSA, F. A. R. (2002) *Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração.* , Belo Horizonte, Os autores.
- STALKIN, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.
- TABARELLI, M., PINTO, L. P., SILVA, J. M. C. & HIROTA, M. (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology*, 19, 695-700.
- VENTURA, J., SALAZAR, M., PÉREZ-HERNADEZ, R. & LOPEZ-FUSTER, M. J. (2002) Morphometrics of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia:Didelphidae) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*, 83, 1087-1096.
- VIVEIROS DE CASTRO, E. B. & FERNANDEZ, F. A. S. (2004) Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, 119, 73-80.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- WRIGHT, S. (1922a) Coefficients of inbreeding and relationship. . *American Nature*, 56, 330-338.

**Figure 1:** The graphics showed normal distribution for body weight and significant non-normality deviation ( $p < 0.05$ ) for BL, T, LT and LE body measurements. PESOANIM = body weight. COMPCORPO = BL. COMPCAUDA = T. COMPTARSO = LT. COMORELHA = LE.



**Table 1:** Summary of microsatellite data: repeat motif, number of individual genotyped (N), number of alleles per locus (A), Polymorphism Information Content (PIC), heterozygosity observed ( $H_o$ ), heterozygosity expected ( $H_e$ ), deviation of Hardy-Weinberg equilibrium (HW)( $p$ -value: \*\*\* <0.0001, \* <0.01), null alleles frequency ( $F(\text{null})$ ).

Locus	Repeat type	$N$	A	PIC	$H_o$	$H_e$	HW	$F(\text{null})$	Allele size range (bp)
Mdem01	(GGAA) <sub>14</sub>	61	16	0.836	0.803	0.857	NS	0.0286	224 – 280
Mdem06	(TGAA) <sub>7</sub>	61	11	0.690	0.344	0.719	***	0.3749	188 – 256
Mdem08	(ATG) <sub>7</sub>	61	6	0.524	0.213	0.594	***	0.4785	224 – 239
Mdem09	(AG) <sub>9</sub>	61	7	0.606	0.393	0.644	*	0.2370	248 – 258
Mdem11	(CATC) <sub>8</sub>	61	25	0.736	0.672	0.752	NS	0.0599	183 – 315
Mdem12	(AG) <sub>9</sub> AC(AG) <sub>2</sub>	61	15	0.875	0.836	0.892	NS	0.0250	165 – 236
Mdem15	(TG) <sub>18</sub>	61	13	0.859	0.705	0.879	NS	0.1048	194 – 246
Mpa01	(CA) <sub>19</sub>	61	8	0.778	0.721	0.810	NS	0.0486	188 – 200
Mpa02	(AG) <sub>17</sub> TA(CA) <sub>5</sub>	61	14	0.815	0.689	0.839	NS	0.0873	139 – 167
Mpa03	(CA) <sub>18</sub>	61	15	0.886	0.852	0.902	NS	0.0224	148 – 180
Mpa04	(CA) <sub>17</sub>	61	16	0.891	0.700	0.907	NS	0.1256	189 – 221
Mpa05	(CA) <sub>22</sub>	59	13	0.874	0.797	0.892	NS	0.0535	134 – 168



Table 2: Descriptive analysis for each measurement for each class by locality and by sex. TBL = BL + T (Classes defined by total body size, in the text), N = no. individuals sampled, BL = body length, T = tail length, LT = left tarsal length, LE = left ear length, BW = body weight

Locality	TBL	N	BL (mm)			T (mm)			LT (mm)			LE (mm)			BW (g)		
Sex			Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.	Means	Min.	Max.	Means	Min.	Max.
Vinhático	1	9	108.2	92.0	170.0	152.4	105.0	179.0	21.0	19.0	26.0	21.33	18.0	28.0	118.6	90.0	215.0
	2	9	124.8	113.0	160	208.6	175.0	240.0	23.89	21.0	30.0	24.33	19.0	30.0	180.4	100.0	265.0
	3	61	154.8	126.0	180.0	242.9	210.0	265.0	25.95	16.0	34.0	27.23	15.0	36.0	172.3	108.0	340.0
	4	68	181.1	144.0	215.0	268.2	236.0	299.0	27.41	23.0	36.0	29.28	18.0	38.0	190.5	110.0	240.0
Campolina	1	1	-	110.0	-	-	188.0	-	-	22.0	-	-	25.0	-	-	155.0	-
	2	17	129.3	106.0	155	197.9	162.0	215.0	23.18	21.0	36.0	24.59	17.0	31.0	136.6	70.0	210.0
	3	52	156.5	123.0	190.0	240.6	190.0	271.0	26.46	19.0	35.0	26.61	15.0	34.0	161.0	81.0	250.0
	4	77	183.4	139.0	225.0	269.8	240.0	326.0	27.58	23.0	32.0	28.27	19.0	34.0	188.7	100	305.0
Male	1	1	-	170.0	-	-	105.0	-	-	26.0	-	-	28.0	-	-	215.0	-
	2	6	132.2	106.0	160.0	194.0	162.0	211.0	25.67	24.0	30.0	25.0	20.0	30.0	167.2	83.0	210.0
	3	45	156.5	126.0	175.0	243.6	190.0	271.0	27.0	19.0	35.0	27.13	15.0	33.0	173.8	81.0	340.0
	4	89	181.9	154.0	225.0	268.2	240.0	299.0	27.70	23.0	36.0	28.84	20.0	36.0	197.6	110.0	305.0
Female	1	9	101.6	92.0	111.0	161.7	136.0	188.0	20.56	19.0	22.0	21.0	18.0	25.0	111.9	90.0	180.0
	2	20	126.5	106.0	155.0	203.8	180.0	240.0	22.75	21.0	26.0	24.35	17.0	31.0	147.1	70.0	265.0
	3	68	155.0	123.0	190.0	240.7	195.0	269.0	25.65	16.0	32.0	26.82	15.0	36.0	162.8	108.0	270.0
	4	56	183.1	139.0	215.0	270.4	236.0	326.0	27.20	23.0	31.0	28.59	18.0	38.0	176.7	100.0	250.0
Total PERD	1	11	106.0	82.0	170.0	154.4	105.0	188.0	20.91	19.0	26.0	21.45	18.0	28.0	44.9	15.0	150.0
Samples	2	26	127.8	106.0	160.0	201.6	162.0	240.0	23.42	21.0	30.0	24.50	17.0	31.0	67.8	32.0	143.0
	3	113	155.6	123.0	190.0	241.9	190.0	271.0	26.18	16.0	35.0	26.95	15.0	36.0	98.4	46.0	185.0
	4	145	182.6	144.0	225.0	268.7	236.0	300.0	27.52	23.0	36.0	28.75	18.0	38.0	127.2	71.0	208.0

**Table 3:** Significant correlation values between body measurements for each class. NS = non significant values

Class	BL x T	BL x BW	BL x LT	BL x LE	T x BW	LT x BW	T x LE	LT x LE	LE x BW
TBL1	NS	0.8467***	0.9392***	0.7407**	0.8473***	0.7775**	NS	NS	0.6978*
TBL2	NS	NS	NS	NS	NS	0.5885**	NS	NS	NS
TBL3	-0.3387**	0.2276*	0.3144***	NS	NS	0.2058*	0.2695**	0.3050***	NS
TBL4	NS	0.2199**	0.2671**	NS	0.2829***	NS	NS	NS	NS

\*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Terra é um ecossistema muito rico sofrendo mudanças naturais e constantes, que a longo prazo levam à adaptação e evolução dos organismos nela presentes. Nas últimas décadas, tem sofrido pressões excessivas e alterações bruscas causadas pelo crescimento e evolução - talvez excessivos - de uma única espécie, a humana. Diversos estudos existentes indicam que essas mudanças podem estar além da capacidade de suporte da Terra em manter o “equilíbrio”.

No Brasil, um país amplo e com enorme biodiversidade, a pressão antrópica chegou a um nível extremamente alto, que levou ao quase desaparecimento de uma de suas maiores riquezas, a Mata Atlântica. Vale salientar aqui que, apesar de ser de conhecimento geral que pouco nos resta deste bioma, ele continua sofrendo pela ganância e desprezo humanos.

A preocupante alteração ambiental por nós provocada, tem atraído a atenção de diversos pesquisadores, que tentam compreender os efeitos causados por esta destruição nas populações de outros seres vivos. Esse interesse é facilmente visualizado pelo crescente número de publicações nas áreas de Ecologia, Zoologia, Botânica e Genética. Diversos projetos realizados por pesquisadores dessas áreas vêm desenvolvendo um estudo contínuo e sistemático do meio ambiente. O Projeto de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD) tem como missão promover a organização e consolidação do conhecimento sobre a composição e o funcionamento dos ecossistemas brasileiro, por tornar viável a criação de um banco de dados que nos permite acessar esses conhecimentos (Barbosa e Luizão, 2004) .

Os estudos feitos no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), um dos locais onde o PELD é realizado, estão gerando dados que poderão auxiliar na escolha e execução de programas

de manejo para tentar amenizar o problema da fragmentação da Mata Atlântica em Minas Gerais, cujo nível é alarmante.

Utilizando o banco de dados gerado como resultado da captura-marcação-recaptura de espécies de pequenos mamíferos presentes em diferentes localidades do parque e fragmentos de mata no seu entorno e usando marcadores moleculares do tipo DNA mitocondrial e microssatélites, obtivemos as seguintes respostas:

- foi aceita a hipótese levantada de que a espécie de marsupial do gênero *Micoureus* presente no parque é *M. paraguayanus*, como proposto para a região sudeste do Brasil, sendo aqui melhor definidos os limites entre esta espécie e a espécie *M. demerarae*, na Mata Atlântica brasileira.

- a hipótese levantada de que a população sofre perda de variabilidade genética e está dividida em sub-populações, entre as quais existem diferenças fenotípicas foi parcialmente rejeitada, por não terem sido encontradas diferenças genéticas e fenotípicas significativas entre os indivíduos das localidades amostradas.

Apesar de os resultados demonstrarem que a população de *M. paraguayanus* do Parque Estadual do Rio Doce não está fragmentada, eles indicaram que em termos gerais, existe perda de variabilidade genética. Em relação ao PERD, é importante salientar que permanece a preocupação com os efeitos nas populações de mamíferos causados pelo isolamento do parque.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram um pouco do que pode ser feito com o grande banco de dados gerados por programas de longa duração como o PELD/PERD e a grande jornada que os pesquisadores envolvidos ainda tem para percorrer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGOT, C. Functional-adaptive anatomy of the forelimb in the Didelphidae, and the paleobiology of the Paleocene marsupials *Mayulestes ferox* and *Pucadelphys andinus*. *Journal of Morphology*, v. 247, p. 51-79, 2001.
- ASENSIO, L.J. *Técnicas de análisis de dados multidimensionales: Bases teóricas y aplicaciones en agricultura.*: Ministério da Agricultura, Pesca y Alimentacion., 1988.
- BARBOSA, C.G. *Estudo morfométrico na raça Mangalarga Marchador.* (Master Degree). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- BARBOSA, F.A., LUIZÃO, F.J. Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD - Brasil). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL PROJETOS ECOLÓGICOS DE LONGA DURAÇÃO. INPA: Manaus,- AM, 2004.
- BAZIN, E., GLÉMIN, S., GALTIER, N. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, v. 312, p. 570-572, 2006.
- BERNARDO, C.S.S., GALETTI, M. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, p. 827-832, 2004.
- BERRY, O., TOCHER, M.D., GLEESON, D.M., SARRE, S.D. Effect of vegetation matrix on animal dispersal: genetic evidence from a study of endangered skinks. *Conservation Biology*, v. 19, p. 855-864, 2005.
- BLOUIN, M.S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 18, p. 503-511, 2003.
- BRITO, D. Lack of adequate taxonomic knowledge may hinder endemic mammal conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v. 13, p. 2135-2144, 2004.

- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - DCBio. Segundo Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2004. 347p.
- BRITO, D., FERNANDEZ, F.A.S. Patch relative importance to metapopulation viability: the neotropical marsupial *Micoureus demerarae* as a case study. *Animal Conservation*, v. 5, p. 45-51, 2002.
- BRITO, D., FONSECA, G.D. Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: An endemic marsupial of the Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v. 15, p. 1713-1728, 2006.
- BRITO, D., GRELE, C.E.D. Effectiveness of a reserve network for the conservation of the endemic marsupial *Micoureus travassosi* in Atlantic Forest remnants in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, v. 13, p. 2519-2536, 2004.
- BROOKER, L., BROOKER, M. Dispersal and population dynamics of the blue-breasted fairy-wren, *Malurus pulcherrimus*, in fragmented habitat in the Western Australian wheatbelt. *Wildlife Research*, v. 29, p. 225-233, 2002.
- BROOKS, T.M., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B.D., RYLANDS, A.B., KONSTANT, W.R., FLICK, P., PILGRIM, J., OLDFIELD, S., MAGIN, G., HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the Hotspots of Biodiversity. *Conservation Biology*, v. 16, p. 909-923, 2002.
- CAPOBIANCO, J.P.R. Dossie Mata Atlântica: Projeto monitoramento participativo da Mata Atlântica. São Paulo: Rede de ONGs da Mata Atlântica, Instituto Socioambiental, Sociedade Nordestina de Ecologia, 2001, p. 409.
- CARVALHO, B.D., OLIVEIRA, L.F.B., NUNES, A.P., MATTEVI, M.S. Karyotypes of nineteen marsupial species from Brazil. *Journal of Mammalogy*, v. 83, p. 58-70, 2002.

- CASTRO, E.B.V.D., FERNANDEZ, F.A.S. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, v. 119, p. 73-80, 2004.
- CERQUEIRA, R. Fatores ambientais e a reprodução de marsupiais e roedores no leste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v. 63, p. 29-39, 2005.
- CHARLES-DOMINIQUE, P., ATRAMENTOWICZ, M., CHARLES-DOMINIQUE, P., GERARD, H., HLADIK, C.M., PREVOST, M.F. Les mammifères frugivores arboricoles nocturnes d'une forêt guyanaise: inter-relations plantes-animaux. *Revue d'Ecologie Terre et la Vie*, v. 35, p. 341-435, 1981.
- CHIARELLO, A.G. Density and population size of mammals in remnants of Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology*, v. 14, p. 1649-1657, 2000.
- COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, v. 30, p. 71-86, 2003.
- CUNHA, H.M., COSTA, B.A., PAGLIA, A.P., VIEIRA, C.E.G. Variação sazonal da abundância relativa de pequenos mamíferos não voadores de "site" PELD do Parque Estadual do Rio Doce. *Simpósio Internacional. Projetos Ecológicos de Longa Duração.*, Manaus, AM. PELD-INPA, 2004, p. 28.
- DELICIELLOS, A.C., VIEIRA, M.V. Arboreal walking performance in seven didelphid marsupials as an aspect of their fundamental niche. *Austral Ecology*, v. 31, p. 449-457, 2006.
- DESALLE, R., AMATO, G. The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 702-712, 2004.
- DEWOODY, J.A. Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals. *JWildManage*, v. 69, p. 1-19, 2005.



- DRUMMOND, G.M., MARTINS, C.S., MACHADO, A.B.M., SEBAIO, F.A., ANTONINI, Y. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua preservação. (2nd. ed.). Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005, p. 222.
- EXCOFFIER, L., HECKEL, G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, p. 745-758, 2006.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, v. 1, p. 47-50, 2005.
- EYRE-WALKER, A. Size does not matter fo mitochondrial DNA. *Science*, v. 312, p. 537-538, 2006.
- FALCONER, D.S., MACKAY, T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. Essex: Longman, 1996, p. 464.
- FERNANDES, M.E.B., ANDRADE, F.A.G., JÚNIOR, J.D.S.E.S. Dieta de *Micoureus demerarae* (Thomas) (Mammalia, Didelphidae) associada às florestas contíguas de mangue e terra firme em Bragança, Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p. 1087-1092, 2006.
- FONSECA, M.T. *A estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata atlântica e monocultura de eucalipto: a importância da matriz de hábitat*. (Dissertation). Belo Horizonte: Universidade Feredal de Minas Gerais, 1997.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. *C R Biologies*, v. 326, p. S22-S29, 2003.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRISCOE, D.A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambride: Cambridge University Press, 2002, p. 617.
- GALETTI, M., ALVES-COSTA, C.P., CAZETTA, E. Effects of forest fragmentation, anthropogenic aedges and fruit colour on the consumption of ornithocoric fruits. *Biological Conservaion*, v. 111, p. 269-273, 2003.

- GARANT, D., KRUIK, L.E.B. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 1843-1859, 2005.
- GOLDSTEIN, D.B., SCHLÖTTERER, C. *Microsatellites. Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press, 1999, p. 352.
- GOLDSTEIN, P.Z., DESALLE, R., AMATO, G., VOGLER, A.P. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, v. 14, p. 120-131, 2000.
- GRELLE, C.E.V. *Análise tridimensional de uma comunidade de pequenos mamíferos*. (Master Degree). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- GRELLE, C.E.V. Forest structure and vertical stratification of small mammals in a secondary Atlantic forest, southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 38, p. 81-85, 2003.
- GUILLEMIN, M.-L., ATRAMENTOWICK, M., JULIEN-LAFERRIÈRE, D. The marsupial community. In: *Noruaques: Dynamics and plant-animal interactions in a Neotropical Rainforest*, edited by BONGERS, F., CHARLES-DOMINIQUE, P., FORGET, P.-M. THÉRY, M. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001, p. 421.
- HANSKI, I., OVASKAINEN, O. The metapopulation capacity of a fragmented landscape. *Nature*, v. 404, p. 755-758, 2000.
- HARPER, K.A., MACDONALD, E., BURTON, P.J., CHEN, J., BROSOFSKE, K.D., SAUNDERS, S.C., EUSKIRCHEN, E.S., ROBERTS, D., JAITEH, M.S., ESSEEN, P.-A. Edge Influence on forest structure and composition in fragmented landscapes. *Conservation Biology*, v. 19, p. 768-780, 2005.
- HASTINGS, A. *Population Biology. Concepts and Models*. New York: Springer-Verlag, 1998, p. 220.
- HILDEBRAND, M. Body proportions of didelphid marsupials. *American Journal of Anatomy*, v. 99, p. 239-249, 1961.

- IEF-MG. Encarte 1: Informações gerais da Unidade de Conservação - Parque Estadual do Rio Doce: IEF - Instituto Estadual de Florestas / Projeto Doces Matas, 2007, p. 9.
- JAENIKE, J. Effect of island area on *Drosophila* population densities. *Oecologia*, v. 36, p. 327-332, 1978.
- JANSA, S.A., FORSMAN, J.F., VOSS, R.S. Different patterns of selection on the nuclear genes IRBP and DMP-1 affect the efficiency but not the outcome of phylogeny estimation for didelphid marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 38, p. 363-380, 2006.
- JANSA, S.A., VOSS, R.S. Phylogenetic studies on Didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 7, p. 43-77, 2000.
- JULIEN-LAFERRIÈRE, D. Organization du peuplement de marsupiaux en Guyane Française. *Revue d'Ecologie Terre et la Vie*, v. 46, p. 125-144, 1991.
- KOLB, A., DIEKMANN, M. Effects of life-history traits on responses of plant species to forest fragmentation. *Conservation Biology*, v. 19, p. 929-938, 2005.
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.
- LOWE, A., HARRIS, S., ASHTON, P. *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Malden: Blackwell Science Ltd., 2004, p. 326.
- LUIKART, G., ENGLAND, P.R. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 14, p. 253-256, 1999.
- MACHADO, R.B., FONSECA, G.A.B.D. The avifauna of Rio Doce Valley, Southeastern Brazil, a highly fragmented area. *Biotropica*, v. 32, p. 914-924, 2000.

- MINGOTI, S.A. *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005, p. 297.
- MITCHELL-OLDS, T. The molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 10, p. 324-328, 1995.
- MITTERMEIER, R.A., GIL, P.R., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J., FONSECA, G.A.B.D. *Hotspots Revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*.: Conservation International, 2005, p. 392.
- MORAES-JR, E.A., CHIARELLO, A.G. A radio tracking study of home range and movements of the marsupial *Micoureus demerarae* (Thomas) (Mammalia, Didelphidae) in the Atlantic forest of South-Eastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, p. 85-91, 2005a.
- MORELLATO, L.P.C., HADDAD, C.F.B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, v. 32, p. 786-792, 2000.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implication for conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 10, p. 58-62, 1995.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B.D., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEMÉSIO, A., SILVEIRA, F.A. Edge effects on the Orchid-Bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at a large remnant of Atlantic Rain Forest in Southeastern Brazil. *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 313-323, 2006.
- PARDINI, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodiversity and Conservation*, v. 13, p. 2567-2586, 2004.
- PATTON, J.L., COSTA, L.P. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: *Predators with Pouches: The Biology of*

- carnivorous marsupials*, edited by JONES, M., DICKMAN, C. ARCHER, M.: CSIRO Publishing, 2003.
- PETIT, E., VALIERE, N. Estimating Population Size with Noninvasive Capture-Mark-Recapture Data *Conservation Biology*, v. 20, p. 1062-1073, 2006.
- PINHEIRO, P.S., CARVALHO, F.M.V., FERNANDEZ, F.A.S., NESSIMIAN, J.L. Diet of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 37, p. 213-218, 2002.
- PIRES, A.D.S., FERNANDEZ, F.A.D.S. Use of space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 15, p. 279-290, 1999.
- PIRY, S., LUIKART, G., CORNUET, J.-M. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, v. 90, p. 502-503, 1999.
- QUENTAL, T.B., FERNANDEZ, F.A.D., DIAS, A.T.C., ROCHA, F.S. Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 17, p. 339-352, 2001.
- RENJITO, L.M. Composition changes in a Subandean avifauna after long-term forest fragmentation. *Conservation Biology*, v. 13, p. 1124-1139, 1999.
- RIBEIRO, R.A., RAMOS, A.R., LEMOS FILHO, J.P., LOVATO, M.B. Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, v. 95, p. 1171-1177, 2005.
- RICHARD-HANSEN, C., VIÉ, J.-C., VIDAL, N., KÉREVEC, J. Body measurements on 40 species of mammals from French Guiana. *Journal of Zoology*, v. 247, p. 419-428, 1999.
- RITLAND, K. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, v. 50, p. 1062-1073, 1996b.

- RITLAND, K. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, v. 9, p. 1195-1204, 2000.
- RODRIGUES, F.P. *Análise da estrutura genética em populações naturais de pequenos mamíferos, no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004.
- RAMBALDI, D.M., OLIVEIRA, D.A.S.D. Fragmentação de Ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas. In: *Biodiversidade* (2nd ed.), edited by AMBIENTE, B.M.D.M. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - MMA/SBF, 2005, p. 508.
- ROY, M.S., GEFFEN, E., SMITH, D., OSTRANDER, E.A. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, v. 11, p. 553-570, 1994.
- RUZZANTE, D.E. A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal Fish Aquat Science*, v. 55, p. 1-14, 1998.
- SÃO BERNARDO, S.C., GALETTI, M. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 4, p. 827-832. 2004
- SCOSS, L.M. *Impacto de estradas sobre mamíferos terrestres: o caso do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais*. (Dissertation, Master of Science). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- SEELIGER, U., CORDAZZO, C.V., BARBOSA, F.A.R. *Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração*. . Belo Horizonte: Os autores, 2002, p. 184.
- SMITH, J.N.M., HELLMANN, J.J. Population persistence in fragmented landscapes. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 17, p. 397-399, 2002.

- SOARES, P.P. *Morfologia e ADNmt nos marsupiais Marmosops icanus e Micoureus paraguayanus (Didelphimorphia, Didelphidae): um teste de diversificação ao longo de gradientes ecológicos*. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.
- SORENSEN, D., GIANOLA, D. *Likelihood, Bayesian and MCMC Methods in Quantitative Genetics*. New York: Springer-Verlag, 2002, p. 740.
- STEINER, C., CATZEFLIS, F.M. Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossums (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography*, v. 31, p. 959-973, 2004.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 15, p. 199-203, 2000.
- SVARTMAN, M., VIANNA-MORGANTE, A.M. Comparative genome analysis in American marsupials: chromosome banding and *in-situ* hybridization. *Chromossome Research*, v. 7, p. 267-275, 1999.
- TABARELLI, M., PINTO, L.P., SILVA, J.M.C., HIROTA, M. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology*, v. 19, p. 695-700, 2005.
- TEWKSBUURY, J.J., HEJL, S.J., MARTIN, T.E. Breeding productivity does not decline with increasing fragmentation in a western landscape. *Ecology*, v. 79, p. 2890-2903, 1998.
- TYNDALE-BISCOE, H., RENFREE, M. *Reproductive Physiology of Marsupials*. New York: Cambridge University Press., 1987, p. 476.
- VIEIRA, E.M., MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Vertical stratification of small mammals in the Atlantic rain forest of south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 19, p. 501-507, 2003.
- VIVEIROS-DE-CASTRO, E.B., FERANDEZ, F.A.S. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, v. 119, p.73-80, 2004.

- VOSS, R.S., JANSA, S.A. Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: Separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p. 1-82, 2003.
- WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WEIR, B.S., HILL, W.G. Estimating F-statistics. *Annual Review Genetics*, v. 36, p. 721-750, 2002.
- WILSON, D.E., REEDER, D.-A.M. *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 2005.
- WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. . *American Nature*, v. 56, p. 330-338, 1922a.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, v. 19, p. 395-420, 1965.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)