

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



APARECIDA PILAR E SILVA

**Análise genética da população de *Thrichomys apereoides*  
(RODENTIA, Echimyidae) no Norte de Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Genética do Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cleusa Graça da Fonseca

**Belo Horizonte**

Março de 2011

**“ Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”**

**Cora Coralina**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me dar a vida, saúde e a capacidade de decidir o percurso a seguir, e por colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas com as quais tenho o prazer de conviver.

À Professora Cleusa pela oportunidade de ingressar em seu laboratório, pelo incentivo e confiança a mim depositadas.

Ao Gustavo Lacorte por me ensinar as primeiras práticas no laboratório e como manter tudo bem organizado (a extração de DNA utilizando o protocolo de clorofórmio-fenol). Pelo constante apoio nas práticas de laboratório.

À Luciene Cássia, que assim como todos do laboratório se tornou minha grande amiga. Conseguiu o material para que esse trabalho fosse desenvolvido, me ensinou todas as etapas de PCR, sequenciamento, análises, e, me incentivou a não desistir. Teve o cuidado de esperar meu tempo para compreender alguns ensinamentos e, mesmo com tantos problemas me ajudou a vencer essa etapa na minha vida.

Ao Leo, por ajudar com a parte de “computador” e pela amizade.

Sinara, sempre pronta para ajudar no que fosse com paciência, cuidado e dedicação. À sua eterna calma e paciência. Aprendi a desenvolver tranquilidade, a não ficar “acabada” quando um experimento não dava certo e acreditar que na próxima tentativa, daria!

Jordana, pelo companheirismo, amizade e a ajuda com “aquele gel”.

Também a Latife, Roxana, Jonatas, Juliano, Janaína, Luciana, Juliana, enfim, aos colegas de disciplinas e de corredor.

Ao meu querido esposo, China, que “vendeu muitas vacas” para que esse mestrado acontecesse. Pela paciência, incentivo, por acreditar sempre na minha capacidade, “segurar as pontas” para que eu pudesse me dedicar ao mestrado. Por me mostrar que vale a pena investir nos nossos sonhos.

Ao Carlos e o André, estudantes do ICB, que muito me ajudaram com as extrações de DNA, com a quantificação no laboratório de Bioquímica.

Aos amigos de café, Patrícia, Adilson, Toninho, Dener, Helen, Fa. Patrícia por sempre me servir café quando eu ia na “minha casa”. Amigos sempre presentes em minha vida.

Helen, amiga desde a graduação, que também ajudou com dados sobre a região de São João das Missões.

Aos meus amigos de caminhada pela busca de auto conhecimento.

A Professora Tudy, da PUC Minas, por colocar à minha disposição o material do laboratório de mamíferos da PUC de *Necromys lasiurus*. Apesar de não tê-lo usado.

A Professora Gisele Lessa da UFV também por dar acesso às amostras de roedores da coleção do Museu da UFV.

A Patrícia Quaresma, do Laboratório de Leishmanioses do René Rachou, por ceder as amostras de *Thrichomys apereoides*.

Ao Helbert Botelho pelas informações de coleta, presteza em colaborar.

Aos meus pais por se preocuparem com a educação e a formação dos filhos.

A minha mãe, que sempre me apoiou, incentivou, por fazer parte das minhas conquistas. Por dar o exemplo de uma vida de respeito e trabalho dedicada aos filhos.

Aos meus irmãos e sobrinho.

Aos professores da pos graduação. Principalmente, professor Álvaro pelo incentivo.

Ao programa de Pós Graduação em Genética do ICB UFMG.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram dessa conquista.

## Índice

|  |      |
|--|------|
| Lista de Figuras   | vi   |
| Lista de Tabelas   | vii  |
| Lista de Abreviaturas  | viii |
| Resumo   | ix   |
| 1 – Introdução   | 10   |
| Família Echimyidae   | 12   |
| Taxonomia de <i>Thrichomys</i>                                     | 13   |
| Importância do <i>T. apereoides</i> como reservatório de patógenos | 15   |
| Área de estudo e coleta  | 16   |
| Genética de populações e a conservação da biodiversidade           | 21   |
| Alguns estudos genéticos de populações de roedores                 | 23   |
| Marcadores moleculares mitocondriais                               | 25   |
| <br>   |      |
| 2 – Objetivos  | 26   |
| 3 – Material e Métodos   | 27   |
| 3.1 – Amostras   | 27   |
| 3.2 – Extração de DNA  | 29   |
| 3.3 – Reação em cadeia da polimerase                               | 29   |
| 3.4 – Purificação e Sequenciamento                                 | 30   |
| 3.5 – Análises Populacionais                                       | 30   |
| <br>   |      |
| 4 – Resultados e Discussão   | 32   |
| <br>   |      |
| Conclusões   | 38   |
| <br>   |      |
| Referências  | 39   |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Distribuição de <i>Thrichomys apereoides</i> no nordeste, centro do Brasil, Bolívia e Paraguai | 10 |
| Figura 2 – Localização do Município de São João das Missões   | 28 |
| Figura 3 – Mapa com os Pontos de coleta   | 29 |
| Figura 4 - Distribuição das diferenças pareadas   | 37 |

**Lista de Tabelas**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Coordenadas geográficas dos locais de coleta      | 28 |
| Tabela 2 – Taxas de substituições nucleotídicas             | 33 |
| Tabela 3 – Distribuição dos haplótipos nos pontos de coleta | 34 |
| Tabela 4 – Índices de diversidade e de neutralidade totais  | 35 |

## **Lista de Abreviaturas**

Cyt – b – Citocromo b

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

HVSI – região hipervariável I

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IEF – Instituto Nacional de Florestas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

KB – kilobases

mtDNA – DNA mitocondrial

NF – Número fundamental

PCR – Polymerase Chain Reaction

PEG – Polietileno glicol

## RESUMO

A diversidade genética presente em uma população do roedor silvestre *Thrichomys apereoides* do norte de Minas foi analisada através do marcador mitocondrial da região controle, D – loop. Os indivíduos são provenientes de três pontos de coleta distintos.

Foram encontrados dezenove haplótipos os quais encontram – se distribuídos nos três pontos onde as coletas foram realizadas. A população apresentou alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica como já observado em alguns estudos de outras famílias de roedores.

As análises dos testes de neutralidade apontaram para uma população que está em recente expansão demográfica, o que não pode ser observado através das diferenças par a par nas frequências dos nucleotídeos.

Palavras – chave : *Thrichomys apereoides*, diversidade genética, DNA mitocondrial, norte de Minas Gerais.

**ABSTRACT**

The genetic diversity presented in a population of wild rodent *Thrichomys apereoides* from the northern of Minas was analyzed through the mitochondrial marker of control region, D – loop. The individuals came from three different collection points.

There were found nineteen haplotypes which were distributed in three points, where the collections were made. The population showed high haplotype diversity and low nucleotide diversity as observed in some studies of other rodents' families.

Tests analyzes of neutrality pointed to a population which is in recent demographic expansion, which cannot be observed through the pairwise differences in the frequencies of nucleotides.

Key – words: *Thrichomys apereoides*, genetic diversity, mitochondrial DNA, northern of Minas Gerais.

## INTRODUÇÃO

*Thrichomys apereoides* Lund, 1839 (Reis e Pessoa, 2004) também conhecido como punaré, ou rato-rabudo, pertence à Ordem Rodentia, Subordem Hystricognathi, Família Echimyidae, Subfamília Eumysopinae (Woods, 1993). A Localidade Tipo da espécie é Lagoa Santa, em Minas Gerais. O registro fóssil, de acordo com Paula Couto 1950, data do Pleistoceno de Lagoa Santa.

A área de distribuição de *Thrichomys apereoides* inclui o nordeste, centro – oeste e sudeste do Brasil, até o Paraguai e a Bolívia (ver Figura 1). Na Bolívia habita a margem norte do Chaco (Anderson, 1997).

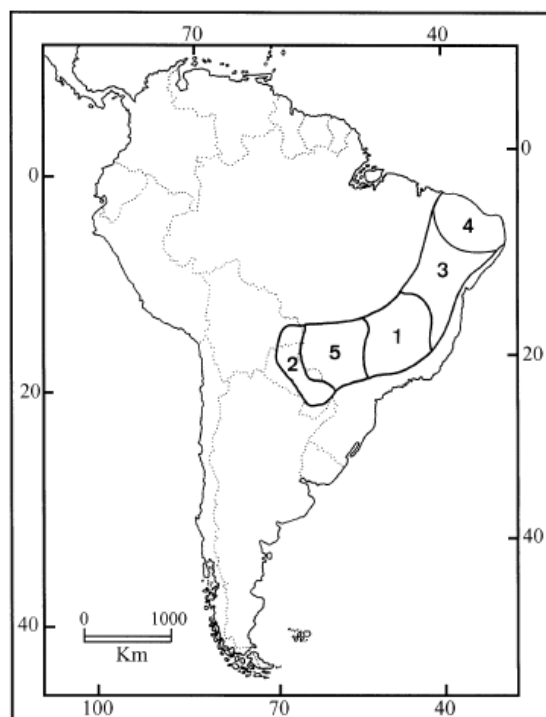


Figura 1 - Distribuição de *Thrichomys apereoides* no nordeste, Centro - oeste, sudeste do Brasil, Bolívia e Paraguai: 1- *T. a. apereoides*; 2- *T. a. fosteri*; 3- *T. a. inermis*; 4- *T. a. laurentius*; 5- *T. a. pachyurus* (Reis e Pessôa, 2004).

Nos biomas Caatinga e Cerrado, no Brasil, os punarés são encontrados em formações graníticas, incluindo lajeiros planos e pequenas elevações. A estrita associação com habitats rochosos também é característica das populações que vivem em ambientes que apresentam moderada umidade, remanescentes da Floresta Atlântica (Streilen, 1982 a). Normalmente, utilizam as fendas das rochas como moradia ou refúgio temporário e para construção de ninhos permanentes. Também vivem em plantações de algodão e em troncos ocos embutidos com palha ou em meio a um círculo de pedregulhos sob rochas (Novak e Paradiso, 1983).

São indivíduos muito ágeis e adeptos de manobras corporais bastante diversificadas, cujo repertório inclui uma série de exposições e posturas identificadas como semi eretas e completamente eretas (Streilein, 1982 a).

O *Thrichomys apereoides* distingue-se de outros roedores da família Echimyidae pela presença de pelo macio na região dorsal, ao longo da espinha, e cauda densamente peluda. Apresenta superfície dorsal cinza escura e ventral branca, e anel de pêlos brancos ao redor dos olhos. A superfície superior das patas é clara, e os dígitos tem pelos ungueais claros. A cauda é muito frágil e normalmente quebra-se na base. As fêmeas possuem três pares de mamas (Bonvicino, 2008).

Entre os adultos o peso corporal varia de 107g a 308g, o comprimento da cabeça e do corpo varia de 143 mm a 228 mm e o comprimento da cauda varia de 130 mm a 210 mm (FUNASA 2002). São mais ativos ao amanhecer, mas podem ser ativos durante curtos períodos do dia ou da noite. A melhor classificação para seu comportamento é escansorial, pois possuem habilidade de fazer, com rapidez, travessias, não muito longas, entre galhos com menos de meio centímetro de diâmetro (Streilen, 1982 a).

A reprodução no ambiente natural ocorre durante todo o ano com alguma redução em dezembro e janeiro, e o número de filhotes varia de um a seis. A maturidade sexual é atingida entre o sétimo e o nono mês de vida (Streilen, 1982 c).

Os neonatos de *Thrichomys apereoides* são precoces, nascem com olhos e ouvidos abertos, corpo totalmente coberto por pêlos, os incisivos superiores e inferiores já presentes. Coordenam movimentos e já fazem ingestão de comida sólida com poucas horas do nascimento. Exibem alguns comportamentos típicos de indivíduos adultos, tais como, coprofagia, fuga de predadores e manobras corporais (Roberts *et al.*, 1988).

Alguns autores caracterizam o hábito alimentar de *Thrichomys apereoides*, como frugívoro – herbívoro (Oliveira e Bonvicino, 2006). Outros autores, como Lessa e Costa (2009), propõem que *Thrichomys* seja um roedor insetívoro, mas que também possa consumir frutos e outras partes de plantas em diferentes proporções durante as estações chuvosa e seca.

Devido à capacidade de ingerir sementes, os roedores podem ser vistos como dispersores ou predadores de muitas espécies de vegetais (Paschoal e Galetti, 1995). Em alguns estudos, os roedores da família Echimyidae foram identificados como importantes agentes dispersores de sementes nas florestas neotropicais (Adler e Kestell, 1998).

### **Família Echimyidae**

A família Echimyidae tem 15 gêneros recentes e cerca de 70 espécies viventes, segundo Woods (1993). Leite e Patton (2002) propõem que os ratos espinhosos da família Echimyidae são os que apresentam maior diversidade taxonômica, ecológica e morfológica de todos os Hystricognathi vivos. Segundo Patterson e Wood (1982) a família Echimyidae data do Oligoceno da Bolívia, período Deseadiano, cerca de 25 milhões de anos atrás. Entretanto, estudos sistemáticos estão ainda pouco claros.

A primeira análise das relações evolutivas entre os Echimídeos foi realizada por Lara *et al.* (1996) com o uso da seqüência completa do gene mitocondrial citocromo-b

(cyt *b*) de 32 indivíduos pertencentes a 12 taxa supraespecíficas. Os resultados dessa análise foram favoráveis à hipótese de monofilia da família Echimyidae, porém a relação entre muitas taxa supraespecíficas deixou algumas relações ainda pouco esclarecidas (Lara *et al.*, 1996).

### **Taxonomia de *Thrichomys***

De acordo com a classificação proposta por Anderson (1997); Cabrera (1961); Moojen (1952); a espécie *Thrichomys apereoides* compreende cinco subespécies, considerando-se a área de ocorrência e os padrões de coloração: *T. a. apereoides* (Lund, 1839); *T. a. fosteri* Thomas, 1903; *T.a. inermis* Pictet 1843; *T.a. laurentius* Thomas, 1904; *T.a. pachyurus* Wagner, 1845. (Figura 1).

Braggio e Bonvicino (2004), através de análises de dados de seqüências do gene do citocromo-*b* de 17 espécimes do gênero *Thrichomys*, pertencentes a três espécies: *T. inermis*, *T. apereoides* e *T. pachyurus*, confirmaram a monofilia do gênero. Nesse estudo as distâncias genéticas estimadas (Kimura dois parâmetros) entre as espécies variaram entre 6 e 9% e as distâncias interindividuais dentro dessas espécies variaram entre 1% e 3%.

Estas análises moleculares reforçadas por diferenças cariotípicas e padrão de distribuição geográfica sugerem a composição do gênero *Thrichomys* em quatro linhagens evolutivas diferentes: *T. pachyurus*, *T. apereoides*, *T. inermis* e *T. sp. nov.* (Braggio e Bonvicino, 2004). Eles são geograficamente isolados e ocupam habitats diferentes. Por exemplo, *Thrichomys pachyurus* vive no charco do Pantanal (sudoeste do Brasil), *T.a. laurentius* é comum ao redor de fontes de água no bioma Caatinga (nordeste do Brasil) e as populações de *T. a. apereoides* vivem nas rochas relativamente úmidas espalhadas no bioma Cerrado do Brasil Central.

Estudos morfométricos relacionados ao formato do crânio e da mandíbula foram realizados com a espécie *T. apereoides*, e concluíram que as maiores diferenças

encontradas no formato da mandíbula entre os grupos das populações estudadas eram devido a mudanças localizadas em pequenas escalas relativas ao limite anatômico que aproxima os processos coronóide e angular com a região alveolar anterior da mandíbula (Duarte *et al.*, 2002).

Um estudo realizado no Brasil com análises morfométricas do formato do crânio de *T. apereoides* provenientes de 20 populações do nordeste, centro e sudeste detectou a existência de duas unidades geográficas morfometricamente diferenciadas. Uma, incluía as amostras das populações do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Alagoas e a outra, amostras das populações da Bahia, Minas Gerais e Goiás (Reis *et al.*, 2002 a, 2002 b).

*Thrichomys apereoides* apresenta variações no número e na forma de alguns cromossomos (Leal-Mesquita *et al.* 1993; Souza e Yonenaga-Yassuda 1982). Observa-se um cariótipo diplóide com  $2n=30$  e  $NF=54$ , que ocorre nos estados de Pernambuco (Floresta do Navio, Bom Conselho, São Caetano, Exu e Buique) e Bahia (Ibiraba e Queimadas). Um segundo cariótipo com  $2n=26$  e  $FN=48$  ocorre no estado da Bahia, em Santo Inácio, Mucujê e Vacaria (Leal – Mesquita *et al.*, 1993).

A similaridade que foi estabelecida entre esses dois cariótipos foi feita com base no padrão de bandeamento-G e constatou-se que as diferenças cromossômicas entre esses dois cariótipos é devido a rearranjos complexos que incluem fusão/fissão cêntricas e inversões pericêntricas (Leal-Mesquita *et al.*, 1993).

Em Corumbá, no Mato Grosso do Sul, encontra-se um cariótipo  $2n=34$  e  $FN=64$  (Bonvicino *et al.*, 2002);  $2n=30$  e  $FN=56$  ocorre em Teresina, Goiás;  $2n=28$  e  $FN=52$  em Jaborundi no estado da Bahia, e um quarto cariótipo de  $2n=28$  e  $FN=50$  em Matosinho e Juramento no estado de Minas Gerais (Bonvicino *et al.*, 2002).

Com base em evidências cromossômicas, Leal-Mesquita *et al.*, 1993; Yonenaga-Yassuda (1996) sugerem a existência de uma espécie constituída por três

subespécies e uma espécie distinta: *T.a.apereoides* (2n=28, FN=50), *T.a.laurentius* (2n=30, FN=54), *T.a. pachyurus* (2n=34, FN=64) e *T. inermis* (2n=26, FN=48 Bonvicino *et al.*, 2002).

Bonvicino *et al.*, (2002) após análise dos cariótipos de espécimes de *Trichomys* sugeriu nomes próprios para esses grupos cariotipicamente distintos: *T. inermis* para 2n=26, *T. pachyurus* para 2n=34; *T. apereoides apereoides* para 2n=28, FN=50; *T.a. laurentius* para 2n=30, FN=54 e *Thrichomys* sp.nov. para 2n=30, FN=56.

### **Importância do *Thrichomys apereoides* como reservatório de patógenos**

*T. apereoides* é um roedor comum em regiões onde existe endemismo de doença de Chagas no Brasil servindo como importante reservatório do agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (Roque *et al.*, 2005).

Em recente estudo com espécimes de *Thrichomys apereoides* coletados em uma zona de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado através de análises histológicas detectou - se uma nova espécie de verme nematódeo, *Trichuris thrichomysi* n. sp. *T. apereoides* foi designado como hospedeiro-tipo do parasita e *T. pachyurus* como outro possível hospedeiro, com intensidade de infecção menor (Torres *et al.*, 2010).

A espécie *T. laurentius* está distribuída no norte do Brasil, do Ceará ao estado da Bahia, uma região que reporta numerosos casos tanto de leishmaniose tegumentar quanto de leishmaniose visceral (SVS-MS 2007. Maia-Elkhoury *et al.* (2008) em condições experimentais demonstraram que *T. laurentius* tem habilidade para reter o parasita por um longo período de tempo e é um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose humana no Brasil, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Roque *et al.* 2010).

A definição de *Thrichomys* ou algum outro mamífero como um reservatório compreende dados da prevalência da infecção e habilidade para manter o parasita em populações de hospedeiros, em condições de laboratório (Roque *et al.*, 2005). Um reservatório poderá ser considerado como um sistema ecológico representado por uma ou mais espécies hábeis para manter certo parasita no meio ambiente.

### **A Genética de Populações e a conservação da biodiversidade**

A genética de populações inclui o estudo de várias forças que resultam em mudanças evolutivas nas espécies ao longo do tempo, como deriva genética aleatória, seleção, mutação e migração. Organismos individuais são caracterizados por seus genótipos, ou a sua constituição genética, e pelos seus fenótipos, ou as características que eles manifestam. Apresenta muitas aplicações práticas, entre as quais, aconselhamento genético de pais e outros parentes de pacientes com doenças hereditárias; melhoramento genético de animais domésticos e plantas cultivadas; organização de programas de cruzamentos para a conservação de espécies ameaçadas em zoológicos e refúgios de vida silvestre; análises de genes e genomas entre diversas espécies para determinar as suas relações evolutivas e testar hipóteses sobre o processo evolutivo (Hartl e Clark, 2010).

A Genética de Populações foi revitalizada por três revoluções diferentes. A conceitual transformou a parte teórica, a partir da teoria da coalescência, que estabelece um arcabouço para que se estudem as populações e os genes em relação à sua história evolutiva. A empírica, que é resultante da genômica e que trouxe grandes contribuições para a determinação de seqüências de DNA completas de muitos genomas, incluindo o genoma humano, e proporcionou a utilização da tecnologia de sequenciamento de DNA para detectar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), proporcionando avanços nas tecnologias que envolvem análises evolutivas e de variabilidade genética. A computacional possibilitou que os avanços conceituais e os novos dados fossem reunidos (Hartl e Clark, 2010).

A história das populações pode influenciar a manutenção e a distribuição da diversidade genética em adição aos fatores ecológicos e demográficos em curso (Patton e Smith, 1989). A partir da década de 90, pesquisadores têm considerado efeitos da história da população em seus estudos (Moritz e Heidemann 1993; Patton *et al.*, 1996; Palumbi *et al.*, 1997).

De acordo com Patton *et al.*, 2000, a quantidade de diversidade genética contida dentro das populações e o grau com o qual as populações estão geneticamente estruturadas ao longo da série geográfica de espécies são determinados pela interação de processos ecológicos e evolutivos. A quantidade de variação intrapopulacional e o grau de diferenciação interpopulacional são influenciados por fatores evolutivos como deriva genética, mutação, seleção e fluxo gênico. Estudos que avaliam a correlação existente entre parâmetros ecológicos e história de vida com a diversidade genética têm sido desenvolvidos tanto para plantas quanto para animais (Hamrick e Godt, 1996). Essas pesquisas exploram características tais como distribuição geográfica, sistema de cruzamento e mecanismos de dispersão, as quais estão correlacionadas com diferenças na variabilidade genética dentro e entre populações. Longos períodos de isolamento geográfico têm efeitos permanentes no padrão de compartilhamento espacial da variação genética.

É importante conhecer o tamanho efetivo de uma população ( $N_e$ ), uma vez que as populações perdem variação genética numa proporção de  $1/(2N_e)$ . Para Nunney e Elam (1994) os fatores chave que determinam o tamanho efetivo populacional são: o tempo de maturação, tempo de vida, período de gestação, sucesso reprodutivo de macho e fêmea e razão sexual. Variações entre populações em algumas dessas características podem conduzir a diferenças em níveis de diversidade genética.

### **Alguns estudos genéticos de populações de roedores**

O estudo comparativo dos padrões de diversidade e estrutura genética de *Proechimys steerei* e *P. simonsi* (Echimyidae) da região do Rio Juruá, na Amazônia brasileira, evidenciou que embora as duas espécies mantenham aproximadamente o

mesmo número de haplótipos para o marcador mitocondrial citocromo b (cyt b), elas diferem em níveis de diversidade genética, estrutura geográfica e fluxo gênico (Matocq *et al.*, 2000).

A estrutura genética populacional de duas espécies simpátricas de roedores sigmodontíneos (Cricetidae) *Oligoryzomys nigripes* e *Euryoryzomys russatus* foi examinada através da seqüência haplotípica da região controle do mtDNA. Os indivíduos foram amostrados em três localidades da Floresta Atlântica no sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal com diferentes tipos de habitats, totalizando 58 Km de extensão. As espécies não apresentaram estruturação genética, embora exibissem padrões similares de haplótipos compartilhados dentro dos diferentes tipos de habitats e altitudes na floresta. A diversidade nucleotídica de *Oligoryzomys* foi relativamente alta quando comparada a de *Euryoryzomys* e a diversidade haplotípica não apresentou diferenças significativas entre as duas espécies (Gonçalves *et al.*, 2009).

A estrutura genética populacional de três espécies simpátricas de roedores da região Amazônica, *Oligoryzomys microtis*, *Oryzomys capito* (Muridae: Sigmodontinae) e *Mesomys hispidus* (Echimyidae) foi examinada através do marcador mitocondrial citocromo b (cyt b) por análises de variância hierárquica e estimativas de fluxo gênico com base nos índices de fixação e métodos de coalescência. Os valores de fluxo gênico encontrados foram altos, porém sugerem que essas espécies ainda não alcançaram equilíbrio genético de acordo com a condição demográfica em curso (Patton *et al.*, 1996).

Yazbeck *et al.*, no prelo, avaliou a variabilidade inter e intrapopulacional do pequeno roedor *Akodon cursor* (Sigmodontinae) proveniente de 4 populações em regiões de abrangência dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. Para isto utilizou um marcador molecular dominante, RAPD (DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente). Nesse estudo encontrou marcante estrutura genética nas populações em questão.

Uma análise utilizando o marcador RAPD foi feita no intuito de estimar as distâncias genéticas e a estruturação da variabilidade genética em cinco populações

provenientes dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, de uma espécie de roedor com hábito semi aquático, *Nectomys squamipes* (Sigmodontinae). Os resultados evidenciaram uma diferenciação significativa entre as populações, mas com taxas de fluxo gênico suficientes para minimizar os efeitos da deriva genética. Não foi evidenciada a relação entre as distâncias genéticas e as geográficas, indicando não haver padrão de isolamento por distancia (Almeida *et al.*, 2000).

Um total de 193 indivíduos de seis espécies do gênero *Oligoryzomys*, distribuídos em 13 diferentes locais de coleta no Cerrado, Floresta Atlântica, Pampas e Amazônia, foram analisados com a utilização do marcador RAPD, com o objetivo de determinar os níveis de variabilidade genética dentro e entre as populações e espécies. As estimativas de diversidade apresentaram diferenças consideráveis entre as espécies e as populações, indicando uma grande variação genética entre os taxa do gênero investigados (Trott *et al.*, 2007).

Variações espaciais, observadas nas análises da região controle do mtDNA de 455 roedores da espécie *Peromyscus maniculatus*, evidenciaram uma ruptura geográfica ao longo de um transecto de 2000 Km no oeste da América do Norte. Para verificar se esta ruptura se refletiu no DNA nuclear foram isolados 13 loci microssatélites de 95 indivíduos. O resultado obtido demonstrou que a variação nuclear não estava de acordo com a diferença do mtDNA. A discordância nuclear observada foi provavelmente resultado da retenção da deriva genética histórica no mtDNA e a homogeneização do DNA nuclear por um recente fluxo gênico. Os resultados foram interpretados no contexto dos eventos climáticos ocorridos durante o Período Pleistoceno (Yang e Kenagy, 2009).

A variabilidade de 8 loci microssatélites foi analisada em 88 indivíduos da espécie *Ctenomys lami* (Rodentia – Ctenomidae), uma espécie de tuco-tuco que apresenta alta variabilidade cromossômica ( $2n = 10$  à  $70$ ) do Parque Itapuã, Rio Grande do Sul. Inicialmente a população foi subdividida em três subpopulações, com distâncias entre elas de 150, 300 e 450 m, porém, a análise Bayesiana dos dados demonstrou uma alta probabilidade de existência de apenas uma população. Os dados genéticos encontrados, associados a padrões demográficos, indicaram baixo fluxo gênico (El Jundi e Freitas, 2003).

### **Marcadores Moleculares Mitocondriais**

É bem conhecido que a mitocôndria é uma organela semiautônoma que possui seu próprio genoma e a maquinária molecular para replicação, transcrição e para síntese de proteína. Entretanto, seu genoma codifica poucos produtos para serem utilizados na respiração celular, sendo os outros codificados pelo material genético nuclear e então enviados ao citoplasma (Saccone *et al.*, 2000).

O DNA mitocondrial tem se tornado a região mais estudada do genoma de mamíferos para reconstrução de relações filogenéticas e análises de padrão de distribuição dentro das populações ou variação genética das espécies. As vantagens do mtDNA em relação a outras porções do genoma é sua alta taxa de substituição, herança materna e ausência de recombinação (Avice 1994). As altas taxas de mutação comumente observadas em vários genes mitocondriais podem ser explicadas pelos mecanismos ineficientes de reparo do mtDNA, pelo ambiente altamente oxidativo ao qual o mtDNA está exposto na organela e por não estar envolvido por histonas (Avice, 1994). A mitocôndria é constituída por um total de 37 genes que codificam para 13 mRNAs, para 2 rRNAs e para 22 tRNAs e uma região conhecida como região controle com 1 Kb de comprimento, o D-loop, que controla a replicação e transcrição da molécula. Análises da região controle do mtDNA fornecem uma alta resolução de estrutura genética intraespecífica em uma variedade de taxa (Avice, 1994).

## 2 - Objetivos

Em razão da importância da espécie *Thrichomys apereoides* e do bioma em que ela ocorre, foram definidos os seguintes objetivos:

### Objetivo Geral:

- O principal objetivo desse estudo é investigar a diversidade genética e sua organização na população de *Thrichomys apereoides* existente no Pólo Brejo Mata Fome da Reserva Xacriabá, norte de Minas Gerais.

### Objetivos específicos:

- Avaliar a utilidade do marcador molecular mitocondrial da região controle, D-loop ou HVSI.
- Identificar haplótipos da região controle ou D-loop presentes na população estudada.
- Quantificar a variabilidade genética presente na população da região estudada, por meio de diferentes parâmetros.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 – Área de Estudo

Os espécimes utilizados para o presente estudo são provenientes da Reserva Indígena Xacriabá, localizada no Município de São das Missões (Figura 2). O Município de São João das Missões situa-se na microrregião do Vale do Peruaçu no norte de Minas Gerais, e faz divisa com os Municípios de Manga, Matias Cardoso, Itacarambi e Miravania, que constituem o Mosaico Sertão Veredas – Peruaçu, próximo à Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco, compreendendo um total de 15 mil Km<sup>2</sup> de Cerrado. Engloba 14 áreas protegidas, Unidades de Conservação e uma Reserva Indígena, e está sob proteção ambiental (MMA/FNMA – 106/2005).

A criação dessa área de proteção no Cerrado deve-se ao fato de tratar-se de um bioma com grande abrangência no território brasileiro (200 milhões de hectares) e que é um dos 25 *hot spots* mundiais, ou seja, uma área que apresenta grande biodiversidade e é uma das mais ameaçadas do planeta. Outra razão é que, na região, ocorrem fisionomias relevantes como a mata seca e o carrasco, transição do Cerrado para a Caatinga. O Mosaico abriga territórios nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (MMA/FNMA – 106/2005).

Dentro do projeto de criação da área de proteção está prevista a elaboração e implantação do Plano de Desenvolvimento Territorial com Bases Conservacionistas (DTBC), visando o turismo ecocultural e o extrativismo de forma sustentável de produtos do Cerrado (MMA/FNMA – 106/2005).

É uma região constituída por veredas que são responsáveis por uma parte significativa do abastecimento dos mananciais que formam os rios na região do Cerrado mineiro e vêm sofrendo impacto secularmente, e também pela formação de numerosos afluentes do Rio São Francisco, do Rio Paranaíba e do Rio Jequitinhonha, rios que em sua maioria correm exclusivamente em ambiente de Cerrado. As bacias dos rios aqui citados constituem as maiores fontes de fornecimento de água e energia hidrelétrica do Estado de Minas Gerais. Na superfície drenada pelos cursos d'água

formadores das bacias hidrográficas do Cerrado, vive grande parte da população mineira (IEF 2009).

O ecossistema abriga inúmeras espécies da fauna e flora, inclusive 14 das 69 espécies de mamíferos brasileiros ameaçados de extinção e é um dos marcos ambientais da importância do Cerrado para o equilíbrio de outros biomas nacionais. (Fonte:< [www.semad.mg.gov.br](http://www.semad.mg.gov.br)> – acessado em 05/01/11).

A Reserva Xacriabá está localizada à margem esquerda do Rio São Francisco, paisagem que transita entre o Cerrado e a Caatinga, com predomínio do Cerrado. O clima é quente durante todo o ano e a estação chuvosa compreende os meses de outubro a março.

A vegetação de savana do Brasil é denominada de cerrado e cobre cerca de 2 milhões de Km<sup>2</sup> do Brasil Central representando aproximadamente 23% da superfície do solo do país. Em termos de área é a segunda maior formação vegetal do país, uma vez que a maior cobertura vegetal é a Floresta Amazônica, cuja extensão é de aproximadamente 3,5 milhões de Km<sup>2</sup>. Estende-se da margem da Floresta Amazônica para áreas distantes no sul do estado de São Paulo e Paraná, ocupando mais do que 20° de latitude e do nível do mar a 1800m de altitude. Cerca de 700.000 Km<sup>2</sup> de área total da vegetação do cerrado está dentro da bacia Amazônica (Ratter *et al.*, 1997).

O clima é sazonal, úmido de outubro a março e seco de abril a setembro, a temperatura varia de 22° a 27° C e a pluviosidade média anual está em torno de 1500 mm (Klink e Machado, 2005). É um bioma antigo constituído por uma rica biodiversidade, estimada em 160.000 espécies de plantas, fungos e animais (Ratter *et al.*, 1997).

Com relação a origem do Cerrado, alguns autores sugerem ter existido uma forma prototípica durante o Período Cretáceo, antes da separação da América do Sul e o Continente Africano (Ratter e Ribeiro, 1996). Apesar do escasso registro fóssil

existente, que auxiliaria na correlação entre as evidências fósseis e o tempo geológico, supõe-se que a cobertura vegetal seria típica da savana conhecida do Período Terciário da América do Sul.

Durante o Período Pleistoceno houve uma relação dinâmica entre a floresta Amazônica e a vegetação tipo savana, com a expansão das savanas, provavelmente incluindo a floresta decídua como um elemento dominante (Ratter *et al.*, 1988) e a contração da floresta Amazônica durante o período glacial e vice-versa durante o período inter glacial. O acontecimento de tais processos levou a um complicado padrão de características tanto na flora quanto na fauna e a fragmentação de populações provavelmente levou a uma exuberante especiação (Ratter *et al.*, 1997).

Referente à biodiversidade, uma quantidade significativa de estudos têm sido realizados na Floresta Amazônica e pouca atenção tem sido dada ao Cerrado (Ratter *et al.*, 1997). Tal bioma é composto de áreas distintas fitogeograficamente as quais vão desde formações abertas tais como campos limpos, campos sujos e campos cerrados a formações fechadas como cerrado (*sensu strictu*), cerradão e florestas de galeria, as quais seguem cursos d'água (Eiten, 1972; Ratter, 1997). Quantitativamente é o mais importante domínio paisagístico do Estado de Minas Gerais.

Com uma vegetação marcadamente heterogênea, a fauna associada a essa variedade de fitofisionomias é igualmente distribuída de uma maneira heterogênea, ou seja, é caracterizada por uma alta riqueza de espécies devido a sobreposição da distribuição de séries de espécies, sendo constituída de habitantes dos biomas adjacentes, e também de um alto nível de endemismo provido pela raridade das regiões (Alho 1993; Ratter *et al.*, 2003; Cáceres *et al.*, 2007).

Pequenos mamíferos não voadores (pequenos roedores e marsupiais) compreendem a maioria das espécies endêmicas do Cerrado (Fonseca *et al.*, 1999, Marinho-Filho *et al.*, 2002) e também, são os únicos que apresentam ampla seletividade de habitat e a menor capacidade de dispersão entre os mamíferos Neotropicais (Lacher e Alho, 2001). Essas características também tornam os pequenos mamíferos mais vulneráveis a mudanças de habitats, especialmente à

rápida e vasta ação antropogênica, realçando a importância desse grupo para a compreensão da diversidade e da biogeografia da fauna do Cerrado (Marinho-Filho *et al.*, 2002).

Um bom exemplo seria o trabalho realizado por Bonvicino *et al.*, 2002, o qual compara algumas espécies de roedores, marsupiais e uma espécie de coelho, da Floresta Atlântica e do Cerrado, coletados em áreas conservadas e alteradas nos dois ecossistemas. Neste trabalho, concluiu-se que dentro destas categorias ecológicas algumas espécies são indicadores apropriados para monitorar a degradação ambiental tornando-se, portanto, ferramentas úteis para o planejamento do manejo da vida silvestre, incluindo seleção de áreas para unidades de conservação e uma delimitação mais adequada dessas áreas.

Segundo Johnson *et al.*, 1999, a riqueza da diversidade de mamíferos presentes no bioma Cerrado está fortemente associada com a influência das Florestas Amazônica e Atlântica, principalmente observada em matas de galeria que contêm duas vezes mais espécies comuns às matas úmidas que as outras fisionomias do cerrado (*sensu latu*) reunidas.

Durante os últimos 35 anos, a agricultura moderna tem-se desenvolvido no cerrado para a produção de soja, milho, arroz, dentre outros cultivos, e a intensificação da criação de gado está contribuindo para o aumento da formação de pastos. A retirada da madeira para produção de carvão também causa grande destruição do cerrado (Ratter *et al.*, 1997). Acredita-se que mais de 50% de sua área total já tenha sofrido alterações através de ações antrópicas. A introdução de espécies exóticas para formação de pastos, provenientes da África, ocupa aproximadamente 500.000 Km<sup>2</sup>; a agricultura moderna, 100.000 Km<sup>2</sup> e a área que está sob proteção ambiental, aproximadamente, 33.000 Km<sup>2</sup> (Klink e Machado, 2005). Isso porque o Código Florestal do Brasil requer que apenas 20% da cobertura do Cerrado seja mantida em seu estado natural como uma “reserva legal”, enquanto que a Floresta Amazônica deve ter uma área de proteção de 80%, o que faz com que a área alterada e degradada do Cerrado seja três vezes maior do que a da Floresta Amazônica (Klink e Moreira, 2002).

Contudo, ao longo do tempo, essa degradação tem resultado em alto custo para o meio ambiente, como por exemplo, perda da biodiversidade, fragmentação das florestas, invasão de novas espécies, erosão do solo, poluição da água, mudanças no regime do fogo, desequilíbrio no ciclo do carbono, alteração no regime climático (Klink e Machado, 2005).

Embora a vegetação do Cerrado possua adaptações que a tornam resistente ao fogo, as constantes queimadas praticadas pelo homem para estimular o desenvolvimento do pasto torna – se prejudicial durante a estação seca, quando a umidade é muito baixa, ocasionando erosão em grandes áreas, principalmente nas regiões mais montanhosas tais como leste de Goiás e oeste de Minas Gerais (Klink e Moreira, 2002). Nos últimos anos têm surgido iniciativas para a conservação do Cerrado tanto por parte do governo, quanto por organizações não governamentais (ONGs), como também por pesquisadores e a iniciativa privada (Klink e Machado, 2005).

### 3.2. Amostras

As amostras de *Thrichomys apereoides* utilizadas nesse trabalho foram extraídas de espécimes coletados por pesquisadores do Laboratório de Leishmanioses, pertencente ao Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, MG. São provenientes do Pólo Brejo Mata Fome na Reserva Indígena Xacriabá, localizada em São João das Missões/ MG.

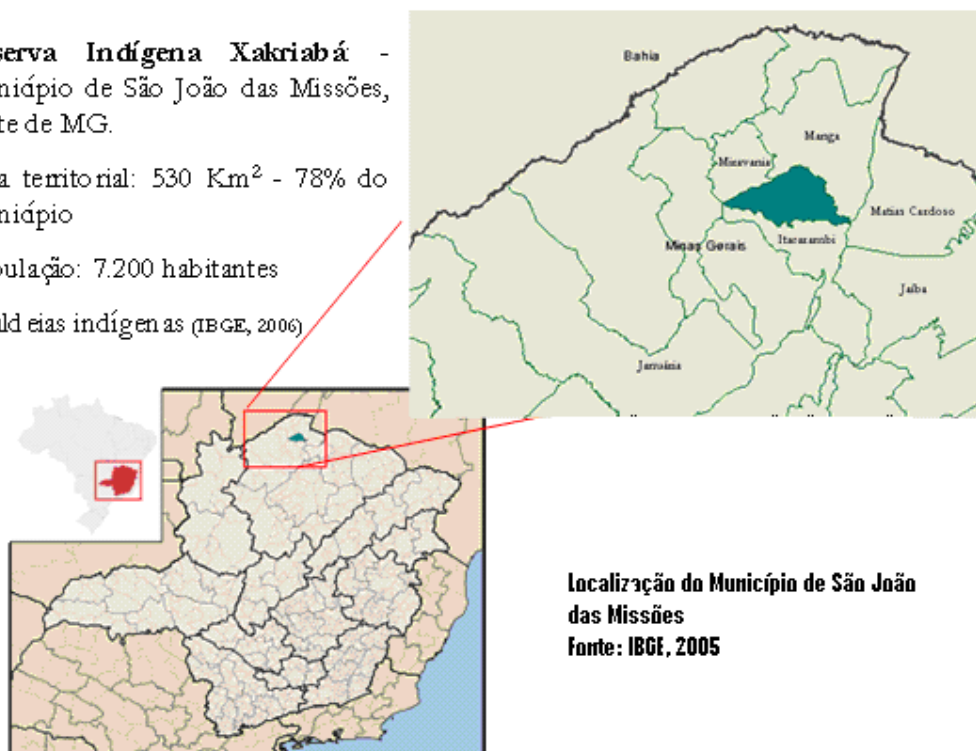
As coletas foram realizadas como parte de um projeto visando estudar aspectos da epidemiologia da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos flebotomíneos e aos possíveis reservatórios do patógeno, na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais. Os pontos de coleta são apresentados na tabela 1 com suas respectivas coordenadas geográficas. As amostras de tecido (fígado, coração ou pulmão) foram retiradas e armazenadas em álcool 70%. O número total de indivíduos é de 63 e compreende tanto machos quanto fêmeas, e tamanho total variando de 250 a 469 mm.

**Reserva Indígena Xacriabá** -  
muniípio de São João das Missões,  
norte de MG.

Área territorial: 530 Km<sup>2</sup> - 78% do  
muniípio

População: 7.200 habitantes

52 aldeias indígenas (IBGE, 2006)



**Localização do Município de São João  
das Missões**  
Fonte: IBGE, 2005

**Figura 2 – Localização do Município de São João das Missões**

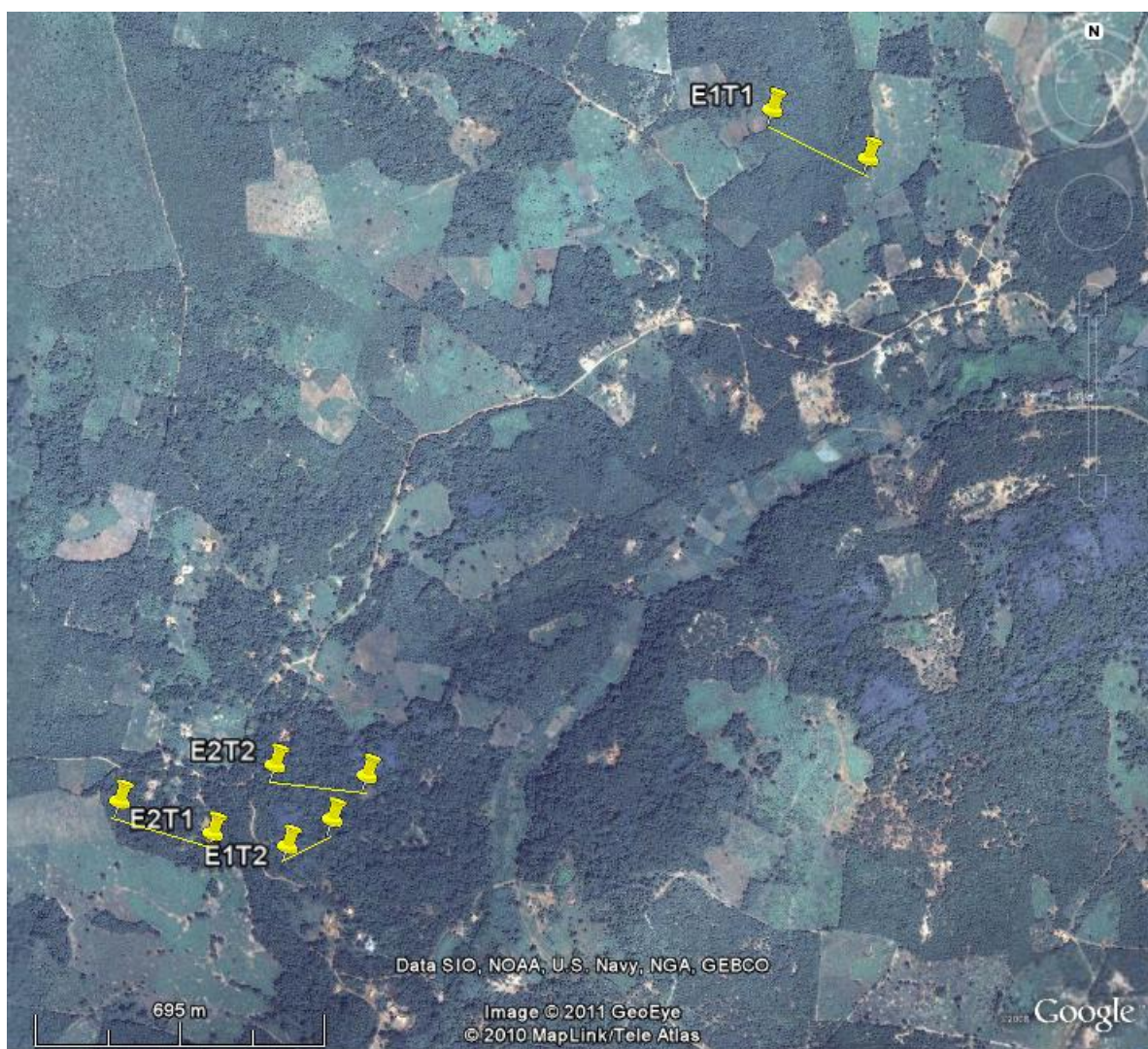
A tabela 1 apresenta os pontos de coleta dentro da Reserva no Pólo Brejo Mata Fome.

**Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta**

---

| <b>Ponto</b> | <b>N</b> | <b>Coordenadas geográficas</b> |
|--------------|----------|--------------------------------|
| A            | 6        | 14° 50'28.5"S 44°13'12"W       |
| B            | 37       | 14° 51' 24.8"S 44° 13' 57" W   |
| C            | 20       | 14° 51' 19.5"S 44° 13' 52 W    |

---



**Figura 3 – Mapa com os Pontos de coleta**

As distâncias entre os pontos de coleta são: A x B = 2200 m; A x C = 1900 m, B x C = 342 m.

### **3.2. Extração de DNA**

As extrações foram feitas a partir de partes de tecido como, fígado, coração ou pulmão, de 63 indivíduos utilizando-se o método clorofórmio - fenol (Sambrook *et al.*, 2001).

Após a extração o DNA foi quantificado por espectrofotometria no Laboratório de Genética e Bioquímica - ICB/UFMG e diluído em água milliQ.

### 3.3. Reação em cadeia da Polimerase

No presente trabalho foi utilizado um marcador molecular mitocondrial da região controle D-loop ou HVSI (região Hipervariável) cujos iniciadores são E3 (5'-ATG ACC CTG AAG AAA SAA CCA G – 3') e LO (5'- CCC AAA GCT GAA ATT CTA CTT AAA CTA – 3') (Huchon, 1999; Douzery & Randi, 1997), constituído de ~ 440pb.

O programa utilizado no termociclador foi: Desnaturação: 94° durante 3 minutos, Anelamento: 30 ciclos a 94° durante 1 minuto, 60° durante 45 segundos e Polimerização a 72° durante 30 segundos; Extensão final 72° durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata (Sambrook *et al.* 2001) usando como padrão de banda Ladder DNA 1 Kb Fermentas e observando se houve amplificação correspondente à 500pb.

### 3.4. Purificação e Sequenciamento

A purificação dos produtos da PCR foi feita com a utilização de uma solução de Polietileno-glicol (PEG 8000) a 20% e NaCl 2,5M (Sambrook *et al.*, 2001) para remoção de resíduos de nucleotídeos e outras impurezas presentes.

Para cada indivíduo foram feitas 2 sequências, LO e E3.

O sequenciador utilizado foi ABI 3130 da Applied Biosystems.

### 3.5. Análises Populacionais

A qualidade das sequências LO e E3 foi inicialmente feita através do programa *Sequence Scanner software* v 1.0 da Applied Biosystems. A confirmação do

fragmento da região D – loop estudada foi feita através do recurso *Blastn*, do NCBI – National Center for Biotechnology.

A verificação da qualidade dos cromatogramas e formação do consenso foram feitas no programa *Sequencher*, 4.10.1 Demo com auxílio do *software* Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). O alinhamento das sequências obtidas de cada indivíduo foi feito através do programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) através do algoritmo Clustal W.

A distribuição dos haplótipos em cada ponto de coleta foi gerada através do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2010). As estimativas de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $H_d$ ), número de haplótipos, número de *singletons* foram realizadas no programa DnaSP v 5 (Librado & Rozas, 2009). O padrão de substituição nucleotídica foi obtido através do programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Os testes de neutralidade, D de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997), foram gerados através de 1000 simulações a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados, uma vez que estes testes podem revelar sinais de expansão populacional e foram obtidos através do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“*Mismatch Distribution*”) (Harpending, 1994; Rogers e Harpending, 1992) que pode ser observada através do padrão da curva assumindo tamanho populacional constante, foi realizada no programa DnaSP v 5 (Librado & Rozas, 2009) admitindo – se 1000 réplicas como forma de garantir a confiabilidade dos dados obtidos.

#### 4. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados foram obtidos a partir do sequenciamento da região hipervariável D-loop, do DNA mitocondrial, de 63 indivíduos da espécie *Thrichomys apereoides*, provenientes da Reserva Indígena Xacriabá localizada no Município de São João das Missões na região norte de Minas Gerais. O número total de pares de bases utilizado nas análises foi de 483 para cada espécime. Não foi observado nenhum códon de parada ou quaisquer ambigüidades de alta qualidade que pudessem sugerir a existência de contaminação por genes de origem nuclear, NUMTs.

Embora as coletas tenham sido realizadas em três pontos diferentes, como se viu na Tabela 1, decidiu-se realizar uma análise populacional considerando um único conjunto de indivíduos, uma vez que não há razão para se pensar que os indivíduos capturados nos três pontos pertençam a populações, ou mesmo subpopulações, distintas devido às distâncias entre os pontos.

A freqüência encontrada para cada uma das bases foi: A = 29,9%; T = 32,7%; C = 13,8% e G = 23,6%, esse resultado que está de acordo com o padrão de freqüências geral da região controle do mtDNA para mamíferos, que é  $(A + T) > (C + G)$  (Sbisá *et al.*,1997).

A tabela 2 apresenta as taxas de substituição observadas. O número de transições foi superior ao número de transversões, sendo mais freqüente a substituição envolvendo as bases púricas A e G. A substituição do tipo inserção-deleção (indel) não foi observada no presente estudo. Cada entrada apresenta a probabilidade de substituição de uma base (linha) para uma outra base (coluna). Taxas de substituições do tipo transição estão em negrito e as do tipo transversão, estão em itálico.

**Tabela 2 – Taxas de substituições nucleotídicas**

|          | <b>A</b>    | <b>T</b>     | <b>C</b>     | <b>G</b>     |
|----------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>A</b> | -           | 2,07         | 0,87         | <b>23,05</b> |
| <b>T</b> | 1,89        | -            | <b>10,41</b> | 1,5          |
| <b>C</b> | 1,89        | <b>24,67</b> | -            | 1,5          |
| <b>G</b> | <b>29,2</b> | 2,07         | 0,87         | -            |

O número total de haplótipos encontrado foi 19, sendo que apenas três haplótipos foram compartilhados pelos três pontos de coleta (haplótipos 1, 6 e 7). O número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos foi igual a 3,755. A tabela 3 apresenta as frequências dos haplótipos observados. Alguns haplótipos são exclusivos de alguns pontos de coleta, o que pode ser observado na Tabela 3. Um dos haplótipos, o de número 1, é muito mais frequente que os demais. Deve-se encarar as diferenças de distribuições dos haplótipos pelos pontos de coleta com precaução, uma vez que, para um dos pontos (ponto A), o número de indivíduos disponível é muito pequeno.

**Tabela 3 – Distribuição dos haplótipos nos pontos de coleta**

| Haplótipo: | Ponto A | Ponto B | Ponto C |
|------------|---------|---------|---------|
| Hap_1      | 2       | 22      | 4       |
| Hap_2      | 0       | 2       | 0       |
| Hap_3      | 0       | 0       | 1       |
| Hap_4      | 0       | 1       | 4       |
| Hap_5      | 0       | 0       | 2       |
| Hap_6      | 1       | 4       | 2       |
| Hap_7      | 1       | 2       | 2       |
| Hap_8      | 0       | 1       | 0       |
| Hap_9      | 0       | 0       | 1       |
| Hap_10     | 0       | 0       | 1       |
| Hap_11     | 0       | 1       | 0       |
| Hap_12     | 0       | 0       | 1       |
| Hap_13     | 0       | 1       | 1       |
| Hap_14     | 0       | 1       | 0       |
| Hap_15     | 1       | 0       | 0       |
| Hap_16     | 0       | 0       | 1       |
| Hap_17     | 0       | 1       | 0       |
| Hap_18     | 1       | 0       | 0       |
| Hap_19     | 0       | 1       | 0       |

Os índices de diversidade e neutralidade para o conjunto de dados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Índices de Diversidade e Neutralidade Totais**

| <b>N</b>  | <b>S</b>  | <b>Hd</b>    | <b><math>\pi</math></b> | <b>Tajima D</b>   | <b>Fs</b>        |
|-----------|-----------|--------------|-------------------------|-------------------|------------------|
| <b>63</b> | <b>22</b> | <b>0,784</b> | <b>0,00777</b>          | <b>- 0,610114</b> | <b>- 5,15057</b> |

**N=nº de indivíduos; S = nº de sítios polimórficos; Hd = diversidade haplotípica;  $\pi$  = diversidade nucleotídica; Tajima D = teste estatístico de Tajima; Fs = teste estatístico de Fu.**

A espécie *T. apereoides* apresentou, na região estudada, um total de 22 sítios polimórficos com número total de mutações = 23. O número de *singletons* encontrado foi de 11 e o número de sítios informativos sob parcimônia, 11.

Como se pode observar na Tabela 4, o número de sítios polimórficos identificados em *Thrichomys apereoides* neste estudo pode ser considerado alto o que poderia ser interpretado em função da rápida taxa de evolução da região controle do mtDNA. A diversidade haplotípica encontrada foi alta e a diversidade nucleotídica, baixa. A combinação de valores altos para diversidade haplotípica e baixos para diversidade nucleotídica poderia sugerir que a população é composta por um amplo número de haplótipos fortemente relacionados, um cenário que poderia ser esperado após um recente evento demográfico, que tanto poderia ser uma expansão como contração populacional recente (Nyakaana *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009).

A diversidade haplotípica observada na população estudada de *T. apereoides* foi de 0,784 e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) encontrada foi 0,00777. Esse padrão de combinação foi compatível com o encontrado em estudos com roedores de outras famílias, como por exemplo, no estudo onde foi abordada a estrutura genética de *Oligoryzomys nigripes* ( Hd = 0,85 e  $\pi$  = 0,0107) e *Euryoryzomys russatus* ( Hd = 0,88 e  $\pi$  = 0,0049) pertencentes à família Cricetidae, ao longo de um gradiente de altitude na Floresta Atlântica no sudeste do Brasil (Gonçalves *et al.*, 2009).

O teste proposto por Tajima (1989) compara o número de sítios segregantes com o número médio de diferenças de nucleotídeos os quais são estimados a partir de comparações par a par das sequências de DNA dentro de uma população. É usado para testar a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras. O

teste proposto por Fu (Fu, 1997) avalia a probabilidade de certo número de haplótipos ser observado, valores negativos podem ser interpretados como sinal de seleção purificadora ou alternativamente, como expansão demográfica recente.

E, neste estudo, o teste D de Tajima apresentou um valor não significativo, - 0,61011,  $P < 0,33700$ ; já o  $F_s$  de Fu apresentou um valor significativo, - 5,15057,  $P \leq 0,05100$ . Os valores negativos encontrados para o teste de Tajima e  $F_s$  no presente trabalho levam a supor uma expansão populacional recente e são indicativos de baixa frequência de mutações, de acordo com o esperado sob o modelo de neutralidade, tamanho populacional constante, perda de subdivisão e fluxo gênico.

Para testar a hipótese de expansão populacional recente foi realizada a análise da distribuição da divergência entre pares de sequências (Harpending, 1994; Rogers e Harpending, 1992) que constrói uma curva indicativa do padrão de expansão da população, vista na Figura 3. O teste foi realizado admitindo-se o tamanho populacional constante e o padrão de distribuição esperado sob a hipótese de expansão populacional recente seria o de uma curva unimodal.

O gráfico das diferenças pareadas (Figura 3) apresenta duas modas, a primeira demonstra que a maior parte das diferenças observadas ocorre em 3 pares de bases e a segunda, em que o valor observado das diferenças ocorre entre cinco e sete pares de bases. Poderíamos supor que cada moda representa uma linhagem diferente da espécie na população. A presença de duas modas apresentada pela população desvia significativamente do modelo que era esperado admitindo-se que a população está em expansão recente como indicado por valores negativos encontrados no teste  $F_s$  de Fu e D de Tajima. De acordo com Ramos - Onsins e Rozas (2002) o teste mais poderoso para demonstrar a recente expansão populacional é o  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). Neste caso, o valor aqui observado está de acordo com o modelo esperado. Esta divergência nos resultados pode ser devida a problemas amostrais, e seria solucionada com uma coleta em área mais ampla, com localização de pontos mais abrangente e com número amostral melhor distribuído pelos pontos.

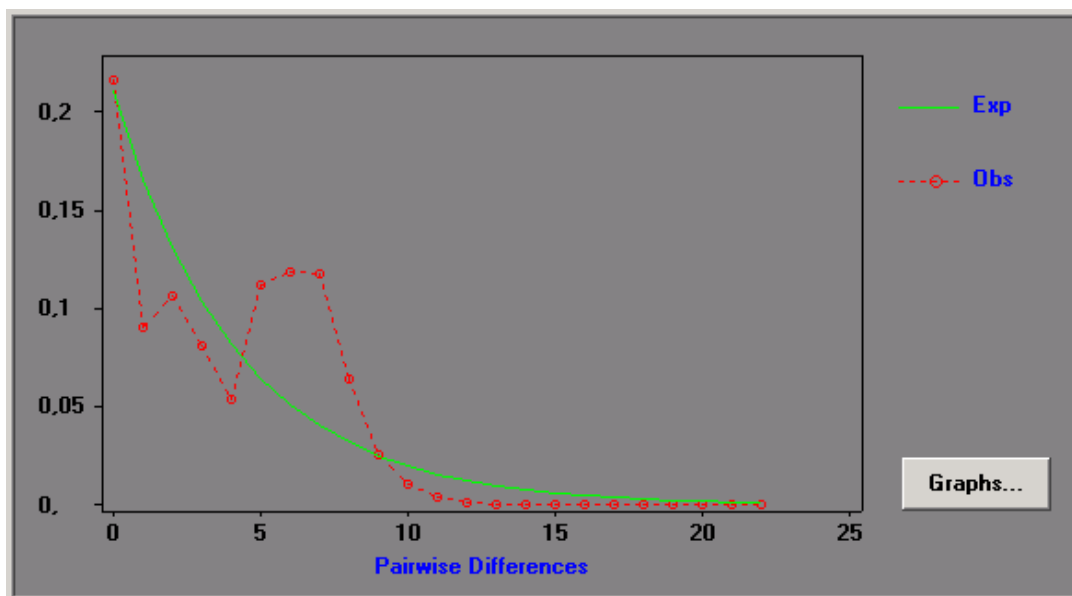


Figura 4 – Distribuição das diferenças pareadas

## Conclusões

- A população apresenta alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, compatível com valores encontrados para outras espécies de roedores.
- A hipótese de expansão recente mostrou - se plausível e teve suporte com o resultado significativo do Teste  $F_s$  de  $F_u$ , índice de diversidade haplotípica alto e nucleotídica baixo apesar da curva bimodal encontrada não ser indicativa dessa hipótese.
- Sugere-se aperfeiçoar a investigação da variabilidade genética do roedor *Thrichomys apereoides*, bem como de sua estruturação, ampliando o número de pontos de coleta e aumentando o número de indivíduos por ponto. Este esforço de amostragem se justifica pelo fato de se tratar de uma espécie reconhecida como reservatório de alguns patógenos importantes.

## REFERÊNCIAS

- Adler, G. H. and Kestell, D. W., 1998. Fates of Neotropical tree seeds influenced by spiny rats (*Proechmys semispinosus*). *Biotropica* 30:677-681.
- Alho, C.J., 1993, Distribuição da fauna num gradiente de recursos em mosaico. In: M. N. Pinto, Cerrado. Editora Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2ª ed., pp. 213 – 262.
- Almeida, F. C, Moreira, M. A. M, Bonvicino, C. R., Cerqueira, R., 2000. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 793-797.
- Anderson, S. 1997. Mammals of Bolivia, taxonomy and distribution. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 231:1–652.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Bonvicino, C. R., I. B. Otaz , P. S. D'ANDREA. 2002. Karyologic evidences of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). *Cytogenetics and Genome Research* 97:200–204.
- Bonvicino, C. R., Lindbergh, S. M, Maroja, L. S., 2002. Small non – flying mammals from conserved and altered áreas of Atlantic forest and Cerrado: Comments on their potencial use for monitoring environment. *Braz. J. Biol.*, 62(4B): 765-774, 2002.

Bonvicino, C. R., Oliveira, J. A., D'Andrea, P. S., 2008. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. 120 p. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS.

Braggio, E., Bonvicino, C.R. 2004. Molecular divergence in the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *J. Mammal.* 85: 316–320.

Cabrera, A. 1961. Catalogo de los mamíferos de America del Sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” 4:310–732.

Cáceres, NC., MR Bornschein, WH Lopes, AR Percequillo. 2007. Mammals of the Bodoquena Mountains, southwestern Brazil: an ecological and conservation analysis. *Rev. Bras. Zool.* **24**: 426-435.

Douzery, E., Randi, E. (1997) The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol Biol Evol* 14:1154–1166

Duarte, L. C., L. R. Monteiro, F. J. Von Zuben, AND S. F. dos Reis. 2000. Variation in mandible shape in *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae): geometric analysis of a complex morphological structure. *Systematic Biology* 49:563– 578.

Eiten, G., 1972, The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38: 205-341.

El Jundi, T.A.R.J e Freitas, T.R.O., 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas* 140: 18-23. Lund, Sweden.

- Excoffier, L.P, Lischer, H. 2010. Arlequin ver. 3.5 user manual: an integrated software package for population genetics data analysis. Swiss of Institute of Bioinformatics. [http:// cmpg.unibe.ch/software/arlequin3](http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3).
- Fagundes, V., Y. Yonenaga-Yassuda. 1996. The analysis of synaptonemal complex formation in *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae) with detailed XY pairing. *Caryologia* 49:183–192.
- Fonseca, G. A. B. da, R. A. Mittermeier, R. B. Cavalcanti, and C. G. Mittermeier. 1999. Brazilian Cerrado. Pages 148–159 in R. A. MITTERMEIER, N. MYERS, P. ROBLES GIL, and C. G. MITTERMEIER, editors. *Hotspots: the earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico.
- Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. - Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002.
- FU, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- FU, Y.-X. W.-H. LI. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**: 693-709.
- Gonçalves, G.L., J.R.Marinho, Freitas, T. R. O. 2009. Genetic structure of sigmodontine rodents (Cricetidae) along an altitudinal gradient of the Atlantic Forest in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 4, 882 – 885.

Hamrick, J. L., M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 351(1345):1291–1298.

Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* **66**: 591-600.

Hartl, D. L., Clark, A. G., 2010. *Princípios de Genética de Populações*. 4.ed. Porto Alegre: Artemed.

Huchon, D., Delsuc, F., Catzeflis, F.M., Douzery, E.J.P. 1999. Armadillos exhibit less genetic polymorphism in North America than in South America: nuclear and mitochondrial data confirm a founder effect in *Dasybus novemcinctus* (Xenarthra). *Mol Ecol* 8:1743–1748

IEF. 2009. Nota técnica para a ampliação do Parque Estadual Veredas do Peruaçu.

Johnson, M. A., Saraiva, P.M., Coelho, D. 1999. The role of gallery forest in the distribution of Cerrado mammals. *Revista Brasileira de Biologia*, v.59, n.3, p. 421-427.

Klink, C. A and Machado, R. B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*. 19: 707- 713.

Klink, C. A., and A.G. Moreira. 2002. Past and current human occupation and land use. Pages 69–88 in P. S. Oliveira and R. J. Marquis, editors. *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna*. Columbia University Press, New York.

- Lacher, T.E. Jr, C.J.R. Alho. 2001. Terrestrial small mammal richness and habitat associations in an Amazon Forest-Cerrado contact zone. *Biotropica* **33**: 171-181.
- Lara, M. C., J. L. Patton, M. N. F. da Silva. 1996. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5:403–413.
- Leal-Mesquita, E. R., V. Fagundes, Y. Yonenaga-Yassuda, AND P. L. B. Rocha. 1993. Comparative cytogenetic studies of two karyomorphs of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Genetics and Molecular Biology* 16:639–651.
- Leite, Y.L.R., Patton, J.L., 2002. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 455–464.
- Lessa, L. G.; Costa, F.N., 2009. Food habits and seed dispersal by *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in a Brazilian Cerrado reserve. *Mastozoologia Neotropical*, 16(2):459-463.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Maia-Elkhoury, A.N., Alves, W.A., Sousa-Gomes, M.L., Sena, J.M., Luna, E.A. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24: 2941–2947.
- Mares, M. A.,J. Ojeda. 1982. Patterns of diversity and adaptation in South American hystricognath rodents. Pp. 185– 192 in *Mammalian biology in South America* (M. A. Mares and H. H. Genoways, eds.). *The Pyramating Symposia in Ecology*

*Special Publications Series*, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh 6:1–539.

Marinho - Filho, J., Rodrigues, F.H. G. and Juarez, K. M. 2002. The Cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. Pages 266–284 in P. S. Oliveira and R. J. Marquis, editors. *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna*. Columbia University Press, New York.

Matocq, M. D, Patton, J. L., Silva, M. N. F., 2000. Population genetic structure of two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution*, 54(4):1423-1432.

Moojen, J. 1952. *Roedores do Brasil*. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, Brazil.

Moritz, C., A. Heideman. 1993. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): Reciprocal origins and diverse mitochondrial DNA in western populations. *Syst. Biol.* 42(3):293–306.

Nowak, R.M.; Paradiso, J.L. Walker`s mammals of the world. 4 ed. *Baltimore*: The Johns Hopkins Univ. Press, 1983. p. 569-857.

Nunney, L., D. R. Elam. 1994. Estimating the effective population size of conserved populations. *Conserv. Biol.* 8(1): 175–184.

Nyakaana, S., Tumusiime, C., Oguge, N., Siegismund, H.R., Arctander, P., Muwanika, V. 2008. Mitochondrial diversity and population structure of a forest dependent rodent, *Praomys taitae* (Rodentia: Muridae) Heller 1911, in the fragmented forest patches of Taita Hills, Kenya. 2008. *South African Journal of Science* 104.

Oliveira, J. A. and Bonvicino, C. R., 2006. Ordem Rodentia. Pp. 347-400, in: Mamíferos do Brasil (RR Reis, AL Peracchi, WA Pedro, IP Lima, eds.). Londrina, PR.427 pp.

Palumbi, S. R., G. Grabowsky, T. Duda, L. Geyer, N. Tachino. 1997. Speciation and population genetic structure in tropical Pacific sea urchins. *Evolution* 51(5):1506–1517.

Paschoal, M. and Galetti, M., 1995. Seasonal food use by Neotropical squirrel *Sciurus ingrami* in South-eastern Brazil. *Biotropica* 27: 268-273.

Patton, J. L., M. N. F. da Silva, and J. R. Malcolm. 2000. Mammals of the Rio Jurua´ and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 244:1–306.

Patton, J. L., M. N. F. da Silva and Malcolm, J. R., 1996. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric of Amazonian rodents. *Molecular Ecology*. 5, 229-238.

Patterson, B.& Wood, A. E. 1982. Rodents from the Deseadan Oligocene of Bolivia and the relationship of the Caviomorpha. *Bull. Museum of Comparative Zoology*, v. 49, p. 371-543.

Petter, F.1973. Les noms de genre *Cercomys*, *Nelomys*, *Trichomys* et *Proechimys* (Rongeurs, Echimyides). *Mammalia* 37:422–426.

- Ramos-Onsins, S. E., J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2092-2100.
- Ratter, J., S. Bridgewater, J. F. Ribeiro. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany* **60**:57–109
- Ratter, J., Ribeiro, J.F., Bridgewater, S.1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Edinburg Journal of Botany* **80**: 223-230.
- Reis, S. F., L. C. Duarte, L. R. Monteiro, F. J. Von Zuben. 2002a. Geographic variation in cranial morphology in *Thrichomys apereoides*: I. Geometric descriptors and patterns of variation in shape. *Journal of Mammalogy* **83**:333–344.
- Reis, S. F., L. C. Duarte, L. R. Monteiro, F. J. Von Zuben. 2002b. Geographic variation in cranial morphology in *Thrichomys apereoides*: II. Geographic units, morphological discontinuities, and sampling gaps. *Journal of Mammalogy* **83**: 345–353.
- Roberts, M. S., K. V. Thompson, J. A. Cranford. 1988. Reproduction and growth in captive punare (*Thrichomys apereoides* Rodentia: Echimyidae) of the Brazilian Caatinga with reference to the reproductive strategies of the Echimyidae. *Journal of Mammalogy* **69**:542–551.
- Roque, A.L.R., Cupolilo, E., Marchevsky, R.S., Jansen, A.M. 2010. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **4**(2): e589. doi:10.1371/journal.pntd.0000589

- Roque, A.L.R., D'Andrea, P.S., Andrade, G.B., Jansen, A.M., 2005. *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 111: 37–46.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552D569.
- Saccone, C.; Gissi, C.; Lanave, C.; Larizza, A.; Pesole, G.; Reyes, A. 2000. Evolution of the mitochondrial system: an overview. *Elsevier Science. Gene* 261: 153 – 159.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sbisà, E. Tanzarielo, F., Reyes, A., Pesole, G., Saccone, C. 1997. Mammalian mitochondrial D – loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125 – 140.
- Sequencher Scanner v.1.0 Copyright Applied Biosystems
- Souza, M. J., Y. Yonenaga-Yassuda. 1982. Chromosomal variability of sex chromosomes and NOR's in *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 33:197–203.

- Streilein, K. E. 1982a. The ecology of small mammals in the semiarid Brazilian caatinga. I. Climate and faunal composition. *Annals of the Carnegie Museum* 51:79–107.
- Streilein, K. E. 1982c. The ecology of small mammals in the semiarid Brazilian caatinga. III. Reproductive biology and population ecology. *Annals of the Carnegie Museum* 51:251– 269.
- SVS-MS (2007) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília/DF.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K., Dudley J, Nei M., Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomas, O. 1912. The generic names *Cercomys* and *Proechimys*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 25:115– 116
- Torres, E.J.L, Nascimento, A.P.F, Menezes, A.O., Garcia, J, Santos, M.A.J., Maldonado JR., Miranda, K., Lanfredi, R.M., Souza, W., A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: Morphological and histological studies. *Vet. Parasitol.* (2010), doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.053
- Yang, Dou-Shuan, Kenagy, G. J., 2009. Nuclear and mitochondrial DNA reveal contrasting evolutionary process in populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Molecular Ecology* 18, 5115-5125.

Yazbeck, G.M., Brandão, R.L., Cunha, H.M. e Paglia, A.P. Detection of two morphologically cryptic species from the cursor complex (*Akodon* spp.; Rodentia, Cricetidae) through the use of RAPD markers. Genetics and Molecular Research - no prelo

Woods, C. A. 1993. Suborder Hystricognathi. Pp. 771–806 in Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Second edition. (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds) *Smithsonian Institution Press*, Washington, D.C.