



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL – CMCA

DAIANE CHAVES DO NASCIMENTO

PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES
Didelphis albiventris, Didelphis marsupialis E Didelphis aurita
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) DE OCORRÊNCIA NO NORDESTE
BRASILEIRO

São Luís – MA
2015

DAIANE CHAVES DO NASCIMENTO

PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES
Didelphis albiventris, Didelphis marsupialis E Didelphis aurita
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) DE OCORRÊNCIA NO NORDESTE
BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em
Ciência Animal como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.
Área: Reprodução e Conservação Animal

Orientadora: Maria Claudene Barros

Co-Orientador: Elmary da Costa Fraga

São Luís - MA

2015

N244c Nascimento, Daiane Chaves do

Padrões de distribuição e diversidade genética das espécies *Didelphis albiventris*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) de ocorrência no Nordeste brasileiro / Daiane Chaves do Nascimento. __São Luís-MA: UEMA, 2015.

63f.

Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Claudene Barros.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão.

1. Marsupiais. 2. Filogenia. 3. Distribuição geográfica. 4. Divergência. 5. Simpatria. I. Nascimento, Daiane Chaves do. II. Título.

CDU 599.2

DAIANE CHAVES DO NASCIMENTO

PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES
Didelphis albiventris, Didelphis marsupialis E Didelphis aurita
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) DE OCORRÊNCIA NO NORDESTE
BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em
Ciência Animal como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Maria Claudene Barros (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Profa. Dr^a. Lígia Tchaicka
Doutora em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Profa. Dr^a. Andréa Martins Cantanhede
Doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico à minha Mãe, Maria Luísa, exemplo de
força, coragem e amor incondicional...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me fortalecer todas as vezes que pensei em desistir e pelo amor infinito que nos concede.

À UEMA pela formação acadêmica;

A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado;

A FAPEMA por fomentar as pesquisas e estágio na coleção de mamíferos da UFPB;

De maneira especial aos meus orientadores profa. Dra. Maria Claudene Barros e prof. Dr. Elmary da Costa Fraga pela oportunidade que me deram para continuar com as pesquisas científicas que avivam minha caminhada;

À coordenação do Mestrado em Ciência Animal que sempre nos ajudaram;

Aos professores Dr. Pedro Estrela e Dr. Alfredo Langguth e aos companheiros da coleção de mamíferos da UFPB pela ajuda que me deram durante meu estágio, suas colaborações foram muito importantes para esse trabalho, aceitem meus sinceros agradecimentos.

À todos que contribuíram com essa pesquisa em especial à Bruno Campos da UFPB, por fornecer as amostras de *D. albiventris* dos estados da região Nordeste, além da sua paciência nas parcerias para as publicações. À Raone Beltrão da UFS por fornecer amostras de *D. albiventris* de Sergipe e também pela amizade que fizemos durante estágio na UFPB, à Pamella Brennand da USP pelas amostras de *D. aurita* de Alagoas e a Marcela Lima do MPEG por fornecer amostras de *D. albiventris* do Piauí, obrigada a todos.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL) pelas sinceras risadas durante esses dois anos de trabalho, sem as amizades essa jornada seria bem mais difícil.

Aos amigos da turma 2013-2015 do Mestrado em Ciência Animal do CCA/UEMA, apesar do pouco tempo juntos, são parceiros que vão além da sala de aula e levarei para vida;

Aos familiares e amigos pelos conselhos que me fortaleceram nos momentos difíceis, em especial aos meus primos Silene e Silvan, aos meus amigos ludovissenses: Seu Antônio, Dona Ana, Táles, Natália, Cícero, Maria, Tainara e Tálison, pois além de terem me amparado nessa cidade são pessoas magníficas, sou muito grata a vocês.

Em particular quero agradecer à minha querida Mãe, mulher de garra, coragem e determinação, um exemplo para mim.

À todos vocês muito obrigada.....

O maior inimigo do conhecimento não é ignorância, mas a ilusão do conhecimento.

Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança !!!!!

(Stephen Hawking)

RESUMO

As espécies do gênero *Didelphis* são conhecidas popularmente no Brasil como mucuras, timbus e sariguês. Seis são endêmicas das Américas: cinco ocorrem na América do Sul e uma na América do Norte (*D. virginiana*). As espécies desse gênero são classificadas em dois grupos: albiventris (gambás-de-orelhas-brancas) e marsupialis (gambás-de-orelhas-pretas), das quais quatro ocorrem no Brasil (*D. albiventris*, *D. imperfecta*, *D. marsupialis* e *D. aurita*). *D. aurita* é endêmica da Mata Atlântica, *D. albiventris* é típica do Cerrado, *D. marsupialis* e *D. imperfecta* ocorrem na Amazônia. Devido às semelhanças morfológicas, *D. aurita* e *D. marsupialis* são identificadas somente por dados moleculares e morfométricos. Neste estudo, objetivou-se compreender os padrões de distribuição e diversidade genética das espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* de ocorrência no Nordeste brasileiro, a fim de se inferir quanto à sua problemática taxonômica e biogeográfica. Para tanto, analisaram-se (n=63) amostras das espécies *D. albiventris* (n=52), *D. marsupialis* (n=8) e *D. aurita* (n=4) provenientes de sete estados da região Nordeste do Brasil: Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão, compreendendo os biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Para obtenção dos dados moleculares, fez-se extração do DNA a partir de tecidos musculares, fígado, pele e cauda e fez-se amplificação e sequenciamento dos genes rRNA 16S, Citocromo *b* e Citocromo Oxidase I. Para a análise dos dados, utilizaram-se softwares específicos, bem como plataformas bioinformáticas de livre acesso. Os dados gerados a partir dos três marcadores moleculares foram eficientes e revelaram o monofiletismo de *D. albiventris* para a região Nordeste do Brasil, a identificação de *D. marsupialis* para o Cerrado maranhense; confirmando, assim, sua expansão para o leste maranhense e uma linhagem distinta de *D. aurita* para a Mata Atlântica alagoana. O estudo de populações para *D. albiventris* nos diferentes estados da região Nordeste e diferentes biomas não evidenciaram estruturação populacional indicando ausência de barreiras biológicas na área de distribuição analisada. Este estudo **permitiu** ainda inferir quanto à simpatria dos grupos de *Didelphis* para as espécies *D. albiventris* e *D. marsupialis* no Cerrado maranhense, registro raro para essas espécies.

Palavras-chave: Marsupiais, filogenia, distribuição geográfica, divergência e simpatria

ABSTRACT

The species of the genus *Didelphis* are known popularly in Brazil as mucas, timbus and sariguês (opossum or possum in English for all of them). Six are endemic to the Americas: five occur in South America and one in North America (*D. virginiana*). The species of this genus are classified into two groups: albiventris (opossum-the-ears-white) and marsupialis (opossums-of-ears-black), of which four occur in Brazil (*D. albiventris*, *D. imperfecta*, *D. marsupialis* and *D. aurita*). *D. aurita* is endemic to the Atlantic Forest, *D. albiventris* is typical of the Cerrado, *D. marsupialis* and *D. imperfecta* occur in Amazônia. Due to morphological similarities, *D. aurita* and *D. marsupialis* are identified only by molecular and morphometric data. In this study, it was aimed to understand the distribution patterns and genetic diversity of the species *D. albiventris*, *D. marsupialis* and *D. aurita* that occur in Brazilian Northeast, in order to infer as to its taxonomic and biogeographic problems. For that, it were analyzed samples (n=63) of the species *D. albiventris* (n=52), *D. marsupialis* (n=8) and *D. aurita* (n=4) from seven states in the Northeast of Brazil: Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí and Maranhão, comprising the biomes Cerrado, Caatinga and Atlantic Forest. To get the molecular data, it was made DNA extraction from muscle tissue, liver, skin and tail and there was amplification and sequencing of rRNA 16S genes, Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I. For the analysis of data, it were used specific software programs as well as bioinformatics platforms of free access. The data generated from the three molecular markers were efficient and showed the monophyly of *D. albiventris* in the Northeast region of Brazil, the identification of *D. marsupialis* for the Cerrado of Maranhão; thereby confirming its expansion to the east of Maranhão and distinct lineage of *D. aurita* for the Atlantic Forest in Alagoas. The populations' study for *D. albiventris* in different states in the Northeast and different biomes did not evidence population structure indicating absence of biological barriers in the area of analyzed distribution. This study also allowed inferring as the sympatry of *Didelphis* groups for the species *D. albiventris* and *D. marsupialis* in the Cerrado of Maranhão, rare record for these species.

Keywords: Marsupials, phylogeny, geographic distribution, divergence and sympatry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Localidades e biomas dos espécimes analisados neste estudo	22
Tabela 2- Genes e primers utilizados nesse estudo, com seus respectivos autores	26
Tabela 3- Protocolos de Amplificações através da reação em Cadeia da Polimerase (PCRs) dos genes rRNA 16S, Cit <i>b</i> , COI	26
Tabela 4- Matriz de divergência genética para <i>Didelphis</i> usando o gene rRNA 16S empregando o modelo Tamura-3-parâmetro	31
Tabela 5- Matriz de divergência genética para o gene Citocromo <i>b</i> usando o modelo Tamura-Nei, para as espécies analisadas neste estudo	35
Tabela 6- Ocorrência dos haplótipos de <i>D. albiventris</i> nos diferentes biomas da região Nordeste, com base no gene Citocromo <i>b</i>	36
Tabela 7- Resultado da AMOVA de um único grupo nas populações de <i>D. albiventris</i> da região Nordeste, para o gene Cit <i>b</i>	37
Tabela 8- Diversidade genética e testes de neutralidade nas populações de <i>D. albiventris</i> analisadas na região Nordeste, para o gene Cit <i>b</i>	38
Tabela 9- Matriz de divergência genética usando o modelo Tamura-Nei para o gene mitocondrial COI para as espécies analisadas	43
Tabela 10- Ocorrência dos haplótipos de <i>D. albiventris</i> nos diferentes estados e biomas da região Nordeste, com base no gene COI	44
Tabela 11- Resultado da AMOVA de um único grupo para o gene COI, das populações de <i>D. albiventris</i> da região Nordeste	45
Tabela 12- Diversidade genética e testes de neutralidade para o gene COI, das populações de <i>D. albiventris</i> analisadas na região Nordeste	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Espécies de *Didelphis* que ocorrem na região Nordeste do Brasil. A) *D. marsupialis*; B) *D. aurita*; C) *D. albiventris* 14
- Figura 2- Distribuição geográfica das espécies do gênero *Didelphis* analisadas neste estudo. A) *D. marsupialis* e *D. aurita*; B) *D. albiventris* 14
- Figura 3- DNA mitocondrial de marsupiais 16
- Figura 4- Mapa do Brasil mostrando os biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica e a localização dos espécimes analisados nesse estudo 24
- Figura 5- Composição nucleotídica para o banco de dados do gene rRNA 16S 29
- Figura 6- Transição e transversão versus divergência genética para o gene rRNA 30
- Figura 7- Árvore filogenética de Máxima Likelihood das espécies de *Didelphis* usando o gene rRNA 16S, com valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1 31
- Figura 8- Composição nucleotídica para o banco de dados do gene *Cit b* 32
- Figura 9- Transição e transversão versus divergência genética para o gene *Cit b* 32
- Figura 10- Árvore filogenética de Máxima Likelihood do gênero *Didelphis*, para o gene *Cit b* usando o modelo Tamura-Nei, com os valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1 33
- Figura 11- Rede de haplótipos para *D. albiventris* relacionando os biomas da região Nordeste, para o gene *Cit b*. Os números representam à posição e a quantidade de mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem 37
- Figura 12- Composição nucleotídica para o banco de dados do gene COI 39
- Figura 13- Transição e transversão versus divergência genética para o gene COI 39
- Figura 14- Identificação da espécie *D. albiventris* na plataforma BoldSystems v3, através do gene COI para a região Nordeste do Brasil. SE, PE, PB., CE, PI e MA: Estados brasileiros. Entre parênteses os biomas MA (Mata Atlântica), CA (Caatinga) e CE (Cerrado) 40

- Figura 15- Identificação da espécie *D. marsupialis* na plataforma BoldSystems v3 através do gene COI para a região Nordeste do Brasil. MA: Estado brasileiro. Entre parêntese o bioma Cerrado. 40
- Figura 16- Identificação de uma espécie diferente de *D. aurita* e *D. marsupialis* na Mata Atlântica alagoana através da plataforma BoldSystems v3 a partir do gene COI. AL: Estado brasileiro. Entre parêntese o bioma Mata Atlântica. 41
- Figura 17- Árvore filogenética de Máxima Likelihood através do gene COI, para as espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita*, com valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1 42
- Figura 18- Rede de haplótipos usando o gene COI, para *D. albiventris* relacionando os biomas da região Nordeste. Os números representam à posição e a quantidade de mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Os Marsupiais do gênero <i>Didelphis</i>	13
1.2 Genes mitocondriais como ferramentas moleculares	15
1.3 Distribuição das espécies <i>D. albiventris</i>, <i>D. marsupialis</i> e <i>D. aurita</i> nos diferentes biomas do Nordeste: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica e suas características e estado de conservação	18
1.3.1 O Cerrado	18
1.3.2 A Caatinga	19
1.3.3 A Mata Atlântica	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.1 Objetivos Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Área de Estudo	22
3.2 Métodos laboratoriais	24
3.2.1 Obtenção das amostras	24
3.2.2 Técnica de Extração de DNA	24
3.2.3 Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	25
3.2.4 Sequenciamento Genético	26
3.2.5 Análises dos Dados	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Análises do gene mitocondrial rRNA 16S	29
4.2 Análises do gene mitocondrial Citocromo <i>b</i>	31
4.3 Análises do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I	38
5 DISCUSSÃO	47
5.1 Grupo Marsupialis	47
5.2 Grupo Albiventris	49
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	63
ANEXO A (Artigo) - Development of <i>Caluromys philander</i> (Didelphimorphia, Didelphidae) Foetuses with Estimated Ages of 20 and 25 days	
ANEXO B (Cap. Livro) – Pequenos mamíferos não voadores de ocorrência na Área de proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias/MA	
ANEXO C (Artigo) - Phylogeny of <i>Marmosops</i> and the occurrence of <i>Marmosops pinheiroi</i> (Pine, 1981) (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Cerrado savanna of Maranhão, Brazil	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Marsupiais do gênero *Didelphis*

Os marsupiais e os pequenos roedores formam o grupo de mamíferos mais diversificados da região neotropical, os quais participam ativamente da cadeia trófica e do processo de dispersão de sementes na floresta, sendo considerados bioindicadores da qualidade ambiental (BUENO, 2008). Entre os marsupiais, Didelphidae é a família mais representativa, compreendendo 95 das 102 espécies vivas do continente Americano (GARDNER, 2008).

Espécies do gênero *Didelphis*, conhecidos popularmente como mucuras, timbús e sariguês, são consideradas animais de porte médio e a massa corporal pode chegar a 2,5 quilogramas. São marsupiais de modo de vida escansorial, usando tanto o solo quanto o extrato vertical médio para forragear, sua dieta é onívora e inclui desde frutos, pequenos invertebrados e vertebrados como cobras, sapos e lagartos (LEITE et al., 1996; REIS et al., 2006). Está envolvido na alimentação de grandes carnívoros e por isso um aumento descontrolado da sua população é um indicativo da ausência de predadores naturais no ambiente (CÁCERES et al., 2008).

Didelphis possui seis espécies endêmicas das Américas, com uma única espécie endêmica da América do Norte (*D. virginiana*) (GARDNER, 2008). As espécies desse gênero são divididas em dois grupos com base em um caracter morfológico a coloração da orelha: albiventris (gambás-de-orelhas-brancas) e marsupialis (gambás-de-orelhas-pretas), sendo que *D. albiventris*, *D. imperfecta*, *D. marsupialis* e *D. aurita* ocorrem no Brasil (Figura 1) (GARDNER, 2008; SHIRAI, 2008). *D. aurita* é endêmica da Mata Atlântica, *D. albiventris* é típica do Cerrado e Caatinga, e *D. marsupialis* e *D. imperfecta* ocorrem na Amazônia (PAGLIA et al., 2012) (Figura 2). E mesmo sendo *D. aurita* e *D. marsupialis* duas espécies distintas, a identificação preliminar das duas espécies de acordo com Emmons e Feer (1997) ocorre pela distribuição geográfica, portanto enquanto caracteres diagnose somente é possível distingui-las por dados moleculares e morfométricos (CERQUEIRA e LEMOS 2000).

Entre os pequenos mamíferos *D. marsupialis* e *D. albiventris* são as duas espécies mais comuns e bem sucedidas (DURANT, 2001). *D. albiventris*, por exemplo, é uma das espécies de mamíferos silvestres mais comuns encontrada em áreas abertas do Brasil central (FONSECA, 2003). Cantor et al. (2010) observou o consumo de uma ampla variedade de espécies de plantas e sementes nas fezes de *D. albiventris*, com um nível variável de germinação das sementes, um bom indicativo de sua participação na dispersão de frutos. Em

alguns estados do Brasil essa espécie se aproxima bastante da área urbana e por serem considerado reservatórios de diversos parasitos, contribuem com a disseminação de doenças nessas áreas (FONSECA, 2003).



Figura 1. Espécies de *Didelphis* que ocorrem na região Nordeste do Brasil. A) *D. marsupialis* (Fonte: Autora); B) *D. aurita* (Fonte: ASSIS, 2011); C) *D. albiventris* (Fonte: Autora).

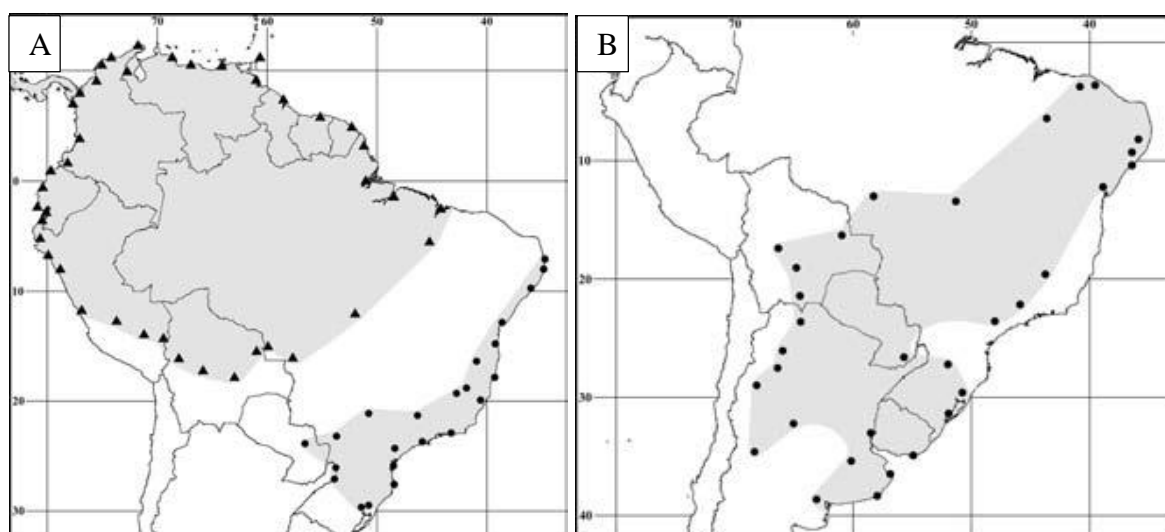


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Didelphis* analisadas neste estudo. A) ▲ = *D. marsupialis*, ● = *D. aurita*; B) ● = *D. albiventris*.

Para o grupo marsupialis, por conter espécies bastante comuns no Brasil, há vários estudos que abordam sobre diversos temas como ecologia, biologia, reprodução, associação com parasitos entre outros (DURANT, 2001; TRUJILLO; ARBOLED, 2004; GRAIPEL; FILHO, 2006; SALVADOR et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; RUEDA et al., 2013). Mas, embora sejam morfologicamente similares poucos estudos visam caracterizar molecularmente as duas espécies desse grupo, *D. marsupialis* e *D. aurita*, com a finalidade de analisar suas relações filogenéticas.

Estudos que abordam a diversidade genética das espécies de *Didelphis* foram realizados por Shirai (2008), Assis (2011) e Sousa et al. (2012a) no bioma Mata Atlântica. Porém, tais dados para o Cerrado e Caatinga ainda são incipientes, e conseqüentemente devido a sua grande importância no ambiente essas informações devem ser consideradas para o manejo e conservação das espécies. Além disso, raros são os relatos de *D. marsupialis* no Cerrado (GARDNER, 2008; COSTA et al., 2012), dessa forma a investigação das relações de parentesco filogenético para o grupo marsupialis é incompleta, bem como a extensão de sua distribuição.

1.2 Genes mitocondriais como ferramentas moleculares

O uso de marcadores moleculares fornece subsídios indispensáveis para estudos biológicos em diversas áreas e firmam-se como ferramentas fundamentais na resolução de problemáticas taxonômicas, sendo utilizados para a reconstrução de filogenias (COSTA et al., 2003; HAAG et al., 2007; CARVALHO et al., 2011; GIARLA; JANSÁ, 2014), confirmação de táxons (VOSS et al., 2013; QUINTELA et al., 2014) e identificação e prevenção de crimes contra a fauna (FERREIRA et al., 2011; BRITO et al., 2015).

Os genes mitocondriais são bastante utilizados em análises filogenéticas e de populações a fim de compreender a relação de parentesco, as incertezas taxonômicas e a variabilidade nas populações (TAKEHANA et al., 2003; NILSSON et al., 2003; TORRES, 2006; VOSS; JANSÁ, 2009; CARVALHO et al., 2009; ROCHA et al., 2012). Para esse genoma a taxa de substituição de nucleotídeos é alta (WOLSTENHOLME; CLARY, 1985; SPRINGER et al., 2001) e conseqüentemente possuem grande acúmulo de mutações, evoluindo mais rápido que genes nucleares, o que permite melhores inferências sobre eventos biológicos recentes (MACHADO, 2006).

Em marsupiais o DNA mitocondrial é caracterizado pela presença de 37 genes distintos, sendo 22 codificadores de tRNA, dois de rRNA e 13 que codificam polipeptídios, bem como uma região não codificadora, a alça-D, bastante variável na maioria das espécies (Figura 3) (JANKE et al., 1994). A molécula possui cerca 17.084 pb, destituída de íntrons, sem regiões duplicadas, com herança materna e alto número de cópias por célula (JANKE et al., 1994; BATISTA, 2001; SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

(MURRAY, 1994). É um dos genes mais amplamente sequenciados para os vertebrados, por isso a dinâmica evolutiva e a bioquímica dos produtos da proteína codificada são bastante conhecidas, os seus níveis de divergência genética são filogeneticamente informativos e improváveis de serem severamente comprometidos pelo efeito da saturação envolvendo substituições de nucleotídeos (MEYER, 1994; JOHNS; AVISE, 1998).

Por apresentar essas características o gene citocromo b é muito usado em estudos moleculares de vertebrados (MURRAY, 1994; JOHNS; AVISE, 1998; FARIAS et al., 2001; TAKEHANA et al., 2003; TORRES, 2006; MACHADO, 2006); mamíferos (HOFFMANN; BAKER, 2001; BRADLEY; BAKER, 2001; BAKER; BRADLEY, 2006; MIRANDA, 2007; BARROS et al., 2009) e marsupiais (COSTA, 2003; STEINER; CATZEFLIS, 2004; CARVALHO et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2010; SOLARI, 2010; DIAS et al., 2010; GIARLA et al., 2010; CARAMASCHI et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; AGRIZZI et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015), sendo principalmente empregado para esclarecer relações filogenéticas entre as espécies (GUTIÉRREZ et al., 2010).

O gene Citocromo Oxidase subunidade I (DNA barcode) caracteriza-se por apresentar sequências com baixa variação intraespecífica e alta variação interespecífica, sendo atualmente utilizado como código de barras de DNA, pois é muito eficaz na distinção de espécies muito próximas, como espécies crípticas (HEBERT et al., 2004a). Esse gene tem suplementado diversos estudos biológicos, sendo usado de forma intermediária, sem operar diretamente nas relações filogenéticas com vários táxons e sem atuar na genética de populações, mas sim na finalidade de delimitação de espécies (HAJIBABAEI et al., 2007).

O DNA barcode foi desenvolvido a fim de auxiliar a taxonomia tradicional, pois o grande número de espécies aliado à alta plasticidade fenotípica e a falta de profissionais experientes dificulta a identificação de novas espécies (BESANSKY et al., 2003; HEBERT et al., 2003; BALL et al. 2005; BARRETT; HEBERT, 2005). Os fragmentos sequenciados do gene COI são enviados para a plataforma universal, Barcode of Life Database – BOLD, de livre acesso, onde ocorre o gerenciamento e análise das amostras para a identificação das espécies (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Atualmente o gene COI é amplamente utilizado para identificar espécies de animais invertebrados (HOGG; HEBERT, 2004; BROWER, 2006; COSTA et al., 2007) e vertebrados (HEBERT et al., 2004b; WARD et al., 2005; CLARE et al., 2006; MÜLLER et al., 2013), inclusive marsupiais (BORISENKO et al., 2008; AGRIZZI et al., 2012).

1.3 Distribuição das espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* nos diferentes biomas do Nordeste: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica e suas características e estado de conservação

Os três principais biomas do Nordeste brasileiro - Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica - vem sofrendo diversas agressões principalmente antrópica, conseqüentemente se faz necessário estudos com a finalidade de caracterizar sua biodiversidade.

As três espécies analisadas neste estudo ocorrem na região Nordeste do Brasil, *D. albiventris*, por exemplo, distribui-se no Nordeste nos biomas Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, sendo, portanto uma espécie com provável distribuição em todos os estados dessa região (Paglia, et al., 2012). *D. marsupialis* ocorre na Amazônia maranhense, mas também pode ser encontrada em zonas de transição entre a Amazônia e o Cerrado, sendo, portanto uma espécie que pela sua distribuição geográfica deveria ocorrer na região Nordeste apenas no estado do Maranhão, único estado do Nordeste que possui vegetação amazônica (Bezerra et al., 2009; Paglia et al., 2012), a espécie *D. aurita* é endêmica da Mata Atlântica ocorrendo assim somente nos estados localizados na parte leste da região Nordeste como: Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, pois estes ainda possuem vestígios de Mata Atlântica em seus territórios (Paglia, et al., 2012) (Figura 2).

1.3.1 Cerrado

O Cerrado segundo maior bioma do Brasil em extensão, atrás apenas da Amazônia, possui 2.036.448 km² correspondendo a 23,9% do território brasileiro, ocupa áreas de 12 estados (Distrito Federal (100%), Goiás (97%), Tocantins (91%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%), Mato Grosso (39%), Piauí (37%), São Paulo (32%), Bahia (27%), Paraná (2%) e Rondônia (1%)) (IBGE, 2014). Em relação às características fitofisionômicas do Cerrado brasileiro, os estados do Nordeste com maior representatividade deste bioma são: Bahia, Maranhão e Piauí, nos demais estados há apenas enclaves como a Chapada Diamantina, Chapada do Araripe e Serra da Ibiapaba (WALTER, 2006).

Quanto a sua florística o Cerrado contém mais 7.000 espécies de plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, para a sua fauna são conhecidas mais 830 espécies de aves, pelo menos 199 espécies de mamíferos, 1.200 espécies de peixes, 180 espécies de répteis e 150 espécies de anfíbios (KLINK; MACHADO, 2005). Segundo Bezerra et al., (2009) os pequenos mamíferos não-voadores (roedores e marsupiais) compreendem a maioria das suas espécies endêmicas.

Ações antrópicas como queimadas, incêndios florestais, expansão das pastagens plantadas de lavouras comerciais (soja, milho, arroz, café, feijão e mandioca), representam cerca de 60% da sua área o que torna uma grande ameaça à biodiversidade desse bioma (ANDRADE et al., 2002; ASSIS, 2015). Estima-se que 40% a 55% do Cerrado já foram desmatados e que este vai encolher mais 8%, com perdas de 160 mil quilômetros quadrados até 2050 se as ações destrutivas permanecerem no mesmo ritmo (FERNANDES; PESSÔA, 2011).

1.3.2 A Caatinga

A região do bioma Caatinga abrange uma área aproximada de 800.000 km², ocupando todo o estado do Ceará e partes dos estados do Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Pernambuco (83%), Piauí (63%), Alagoas (48%), Sergipe (49%), Bahia (54%), Minas Gerais (2%) e Maranhão (1%), este possui ecossistemas exclusivamente brasileiros, composto por um mosaico de florestas secas e vegetação arbustiva (savana-estépica), com enclaves de florestas úmidas (TABARELLI; SILVA, 2002; IBGE, 2014).

A biodiversidade da Caatinga é ampla sendo catalogadas 932 espécies de plantas vasculares, sendo 380 endêmicas e 20 gêneros exclusivos, 185 espécies de peixes, 154 espécies de répteis e anfíbios, 348 espécies de aves e 148 espécies de mamíferos (MMA, 2002; TABARELLI; SILVA, 2002). Entretanto, a Caatinga ainda é muito pouco conhecida, existindo locais sem nenhuma informação e as ações antrópicas como a exploração de madeira para combustível, destruição da vegetação nativa por práticas agrícolas inapropriadas e as queimadas, também vem modificando bastante a sua paisagem. Todas essas ações contribuem para a salinização dos solos, aumentam a evaporação da água e acelera o processo de desertificação um dos principais desafios desse bioma (MMA, 2002; CASTELLETTI et al., 2003).

1.3.3 A Mata Atlântica

A Mata Atlântica estende-se pelo litoral das regiões do Nordeste, Sudeste e Sul do país, com uma extensão de 1.110.182 km² correspondendo a 13% do território do Brasil (IBGE, 2014). Na região Nordeste abrange as áreas suavemente onduladas entre a Serra da Borborema e o Oceano Atlântico, ocupando partes dos estados de Alagoas (52%), Sergipe (51%), Bahia (19%), Pernambuco (17%), Paraíba (8%) e Rio Grande do Norte (5%) (RÊGO; HOEFLICH, 2001; IBGE, 2014).

A cobertura original da Mata Atlântica no Nordeste compreendia cerca de 255.245 km², ocupando 28,84% do seu território, no entanto até o ano de 2006 o bioma nessa região ocupava uma área aproximada de 19.427 km², cobrindo uma área total de 2,21% de seu território (TABARELLI et al., 2006). De maneira geral, a vegetação da Mata Atlântica é diversificada contendo cerca de 20 mil espécies, das quais 8 mil são endêmicas, sua fauna também é ampla com 1,6 milhões de espécies de animais, sendo que para os mamíferos são registradas 261 espécies das quais 73 são endêmicas, 620 espécies de aves, sendo 181 endêmicas, 280 espécies de anfíbios com 253 endêmicas, 200 espécies de répteis dessas 60 são endêmicas, apesar do seu território bastante reduzido sua biodiversidade é comparada a da Floresta Amazônica (CAMPANILI; PROCHNOW, 2006).

Os graves danos causados pela ação antrópica no bioma Mata Atlântica há muito tempo são conhecidos, seja pela ocupação humana desordenada, exploração de madeiras e essências nativas, atividades de mineração, proximidade de polos industriais, especulação imobiliária, construção de rodovias, barragens entre outros (COSTA, 1999). No Nordeste, são verificadas também agressões contínuas, como a retirada de lenha para uso doméstico, o corte de madeira para pequenas construções e a caça, principalmente em áreas de assentamentos ocupados sem orientação correta da conservação dos recursos naturais (MELO; FURTADO, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Compreender os padrões de distribuição e diversidade genética das espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* no Nordeste brasileiro a fim de contribuir com informações que gerem subsídios para resolver incertezas taxonômicas e distribuição geográfica.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e identificar as espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* utilizando genes mitocondriais rRNA 16S, Citocromo b e COI;
- Inferir quanto aos padrões de distribuição da diversidade genética das espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* nos diferentes biomas do Nordeste brasileiro;
- Registrar os limites geográficos alcançados pelas espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

Sete estados da região Nordeste do Brasil: Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão compreendendo os biomas: Cerrado (Maranhão e Piauí), Caatinga (Piauí, Ceará e Pernambuco) e Mata Atlântica (Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Sergipe), foram amostrados para as espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* (Tabela 1; Figura 4). Os espécimes do Maranhão foram coletados na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (APA Municipal do Inhamum), Caxias, MA, dos outros estados foram provenientes de parcerias com coleções de outras IES, como UFPB, UFS, UFPI, MPEG e USP.

Tabela 1. Localidades e biomas dos espécimes analisados neste estudo. O IBGE foi a fonte para a identificação dos biomas de cada cidade (<http://cidades.ibge.gov.br>).

Nº de Campo/Genes, haplótipos	Espécie	Localidade	Bioma
1 BC 663/aH1,bH15,cH9	<i>D. albiventris</i>	Caaporã – PB	Mata Atlântica
2 BC 272/aH3,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Barreira C. Branco	Mata Atlântica
3 BC 03/aH1,bH15,cH1	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
4 BC 04/aH3,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
5 BC 05/aH3,bH3,cH2	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
6 BC 07/aH3,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
7 BC 08/aH3,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
8 BC 12/aH1,bH3,cH4	<i>D. albiventris</i>	Mataraca – PB	Mata Atlântica
9 ALN 161/aH1,bH6,cH4	<i>D. albiventris</i>	Bonito – PE	Caatinga
10 TNM 162/aH1,cH2	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
11 TNM 193/aH1,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
12 TNM 57/aH1,cH2	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
13 TNM 58/aH1,cH3	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
14 TNM 180/aH1,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
15 TNM 44/aH2,cH2	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
16 TNM 59/aH1,cH6	<i>D. albiventris</i>	Trindade – PE	Caatinga
17 TNM 232/aH1,bH3,cH2	<i>D. albiventris</i>	Arcoverde – PE	Caatinga
18 BC 418/aH1,bH1,cH1	<i>D. albiventris</i>	Arcoverde – PE	Caatinga
19 BC 398/aH1,bH4,cH1	<i>D. albiventris</i>	Arcoverde – PE	Caatinga
20 BC 435/aH1,bH2,cH1	<i>D. albiventris</i>	Arcoverde – PE	Caatinga
21 BC 540/aH1,bH5,cH2	<i>D. albiventris</i>	Serra Talhada – PE	Caatinga
22 TNM 73/aH1,cH3	<i>D. albiventris</i>	Serra Talhada – PE	Caatinga
23 BC 443/aH1,bH3,cH2	<i>D. albiventris</i>	Serra Talhada – PE	Caatinga
24 BC 414/aH1,bH5,cH2	<i>D. albiventris</i>	Serra Talhada – PE	Caatinga
25 BC 433/aH1,bH6,cH2	<i>D. albiventris</i>	Serra Talhada – PE	Caatinga
26 TNM 61/aH2,cH2	<i>D. albiventris</i>	Nascente – PE	Caatinga
27 TNM 190/aH1,cH3	<i>D. albiventris</i>	Nascente – PE	Caatinga

28	TNM 189 ^{aH1,bH5,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Nascente – PE	Caatinga
29	TNM 127 ^{aH1,cH5}	<i>D. albiventris</i>	Rio Grande – PE	Caatinga
30	ALN 147 ^{aH4,bH13,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Ipojuca – PE	Mata Atlântica
31	ALN 148 ^{aH4,bH12,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Ipojuca – PE	Mata Atlântica
32	ALN 140 ^{aH4,bH12,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Ipojuca – PE	Mata Atlântica
33	T 4 ^{aH1,bH8,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Quixadá – CE	Caatinga
34	T 5 ^{aH1,bH9,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Quixadá – CE	Caatinga
35	T 12 ^{aH1,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Quixadá – CE	Caatinga
36	T 10 ^{aH1,bH8,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Quixadá – CE	Caatinga
37	BC 554 ^{aH1,bH7,cH7}	<i>D. albiventris</i>	Santa Quitéria –	Caatinga
38	BC 553 ^{aH1,bH7,cH7}	<i>D. albiventris</i>	Santa Quitéria –	Caatinga
39	BC 451 ^{aH1,bH3,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Várzea da Concei.	Caatinga
40	BC 321 ^{aH1,bH10,cH8}	<i>D. albiventris</i>	Rio G. do Piauí –	Caatinga
41	BC 305 ^{aH1,bH11,cH2}	<i>D. albiventris</i>	Rio G. do Piauí –	Caatinga
42	PNSC 082 ^{cH2}	<i>D. albiventris</i>	P. N. Sete Cidades	Caatinga
43	URC 05 ^{bH16,cH10}	<i>D. albiventris</i>	Uruçuí – PI	Cerrado
44	PR 145 ^{cH4}	<i>D. albiventris</i>	Capela – SE	Mata Atlântica
45	FNI 8 ^{aH1,bH14,cH1}	<i>D. albiventris</i>	N. S. do Socorro –	Mata Atlântica
46	LLLS 1 ^{aH1,bH18,cH8}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
47	LLLS 2 ^{aH1,bH17,cH8}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
48	DCN 2 ^{aH1,bH18,cH11}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
49	DCN 4 ^{aH1,bH18,cH11}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
50	DCN 39 ^{aH1,bH18,cH11}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
51	DCN 44 ^{aH5,bH19,cH12}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
52	DCN 46 ^{aH5,bH19,cH12}	<i>D. albiventris</i>	Caxias – MA	Cerrado
53	DCN 16 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
54	DCN 21 ^{aH1,bH3,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
55	DCN 25 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
56	DCN 47 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
57	DCN 55 ^{bH2,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
58	DCN 56 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
59	DCN 57 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
60	JFC 16 ^{aH1,bH2,cH1}	<i>D. marsupialis</i>	Caxias – MA	Cerrado
61	BC 202 ^{aH1,bH1,cH1}	<i>D. aurita</i>	Murici – AL	Mata Atlântica
62	BC 30 ^{aH2,cH2}	<i>D. aurita</i>	Murici – AL	Mata Atlântica
63	*GU112884 ^{bH2}	<i>D. aurita</i>	Nova Viçosa –BA	Mata Atlântica
64	*GU112798 ^{cH3}	<i>D. aurita</i>	-	Mata Atlântica

a: espécimes sequenciados para o gene rRNA16S e seus haplótipos correspondes; b: espécimes sequenciados para o gene Cit *b* e seus haplótipos correspondes; c: espécimes sequenciados para o gene COI e seus haplótipos correspondes; *: espécimes retirados do GENBANK

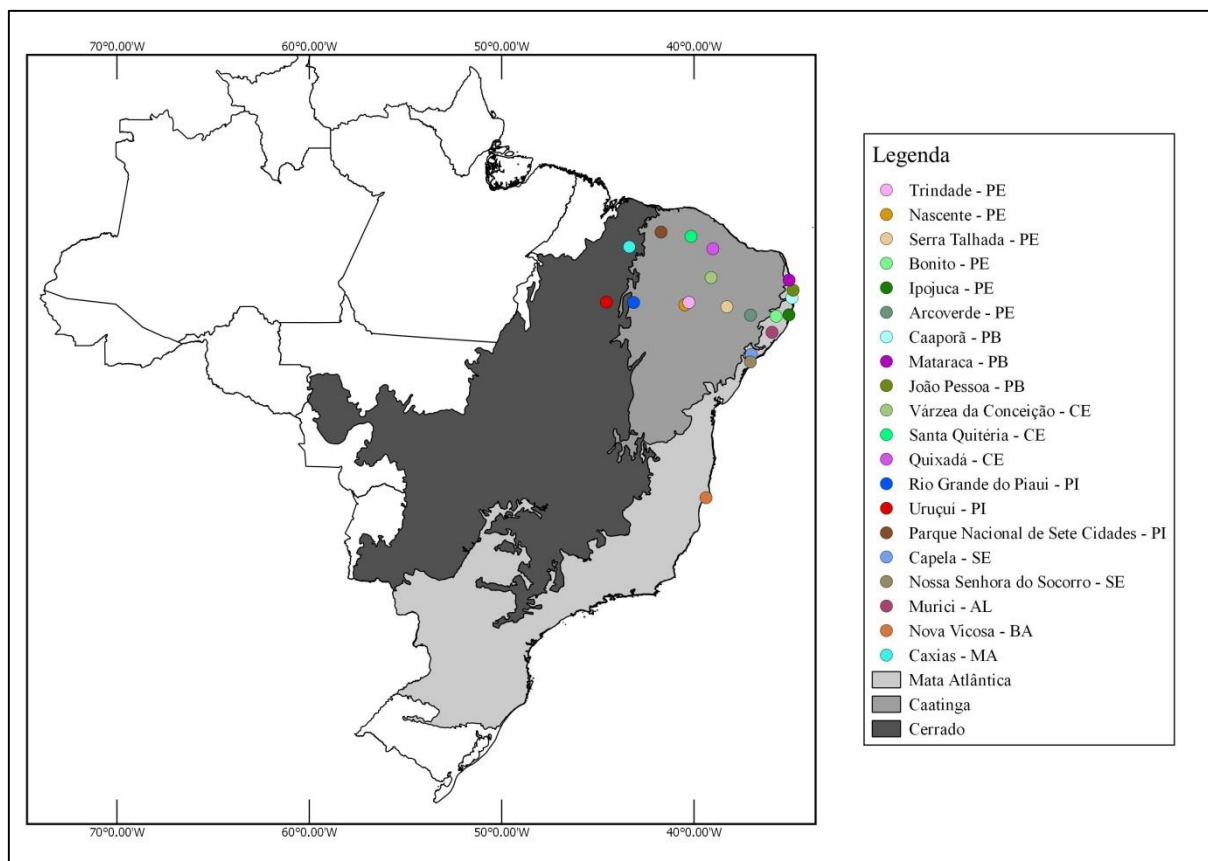


Figura 4. Mapa do Brasil mostrando os biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica e a localização dos espécimes analisados nesse estudo.

3.2 Métodos laboratoriais

3.2.1 Obtenção das amostras

As espécies coletadas na APA do Inhamum foram identificadas com base em caracteres morfológicos utilizando chaves de identificação taxonômica específica como: Emmons e Feer (1997), Gardner (2008) e Voss e Jansa (2009), confirmada por especialista e depositada na coleção de mastozoologia da UFPB onde receberam vouchers.

3.2.2 Técnica de Extração de DNA

O DNA total foi extraído de tecidos muscular, fígado e pele da cauda usando protocolo de fenol clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e visualizado em gel de agarose a 1%. Este protocolo foi adaptado para microtubos de 1,5 ml e conteve as seguintes etapas:

- Adicionou-se 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 ml;
- Adicionou-se 600 µl de tampão de lise e 15 µl de RNase. Incubou-se por 40 minutos a 37° C na estufa;

- Adicionou-se 15 µl de proteinase K e agitaram-se delicadamente os tubos em um agitador, a uma temperatura de 55° C por 30 minutos; deixou-se esfriar até a temperatura ambiente;
- Adicionou-se 700 µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamil a uma concentração de 25:24:1, para precipitação de proteínas. Os tubos foram agitados delicadamente por cerca de 10 minutos;
- Centrifugou-se a 10.000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos;
- Transferiu-se cuidadosamente a camada superior formada após a centrifugação para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionou-se 700 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico a uma concentração de 24:1 e agitou-se delicadamente por 10 minutos;
- Centrifugou-se a 10.000 rpm por mais 10 minutos;
- Transferiu-se a camada sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionou-se 100 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4.8 e 700 µl de isopropanol (100%) para precipitação do DNA. A mistura foi agitada gentilmente até a visualização da nuvem de DNA;
- A mistura foi congelada a uma temperatura de -20° por 1 (uma) hora no mínimo;
- Após o congelamento, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, e descartou-se o material sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA;
- Adicionou-se 200 µl de etanol a 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA;
- Colocou-se o tubo aberto na estufa a 37° C por cerca de 30 minutos, para a completa evaporação do álcool;
- Adicionou-se 25 µl de água de injeção para hidratar;
- Visualizou-se o DNA em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 µl de DNA.

3.2.3 Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o isolamento e amplificação dos genes rRNA 16S, Citocromo *b* (Cit *b*) e Citocromo Oxidase subunidade I (COI) empregou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os primers específicos (Tabela 2).

Tabela 2. Genes e primers utilizados nesse estudo, com seus respectivos autores.

Genes	Primers	Autores
rRNA 16S	16SL1: 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' 16SH2: 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	Palumbi et al. (1991)
Cit <i>b</i>	MVZ5: 5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3' MVZ16: 5' AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT 3'	Smith e Patton (1993)
COI	LCO1490: 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' HCO2198: 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer et al. (1994)

Para os três genes as reações de PCRs foram realizadas em um volume final de 25 µl utilizando os seguintes reagentes:

- 4 µl de DNTPs (1,25 M) (nucleotídeos);
- 2,5 µl de solução tampão (10X);
- 0,5 µl de solução de MgCl₂ (50 mM);
- 1 µl de DNA (250 ng/µl);
- 0,25 µl de cada primer (200 ng/µl);
- 0,20 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl);
- Água de injeção para completar o volume final da reação.

Cada gene possui protocolo de amplificação específico que são realizados em um termociclador, esses protocolos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de Amplificações através da reação em Cadeia da Polimerase (PCRs) dos genes rRNA 16S, Cit *b*, COI.

Genes	Desnaturação Inicial	Ciclos	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Extensão Final
rRNA 16S	94°C/3min	25	94°C/1min	50°C/1min	72°C/2min	72°C/10min
Cit <i>b</i>	94°C/3min	30	94°C/1min	45°C/1min	72°C/2min	72°C/10min
COI	94°C/3min	40	94°C/45seg	48°C/45seg	72°C/1min30seg	72°C/3min

3.2.4 Sequenciamento Genético

Os produtos da PCR foram purificados usando a enzima ExoProStar 1-Step (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fabricante, em seguida foram submetidas a reação de sequenciamento usando o método de didesoxitermial (SANGER et al., 1977) com o kit BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) durante 30 ciclos de 96°C por 15s, 50°C por

15s, 60° C por 4 min. Após fez-se a precipitação em EDTA/Sódio acetato/etanol através do seguinte protocolo:

- Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionou-se 2,5µl de EDTA (125 mM);
- Vedou-se a placa e submeteu-a a um spin;
- Adicionou-se 30µl de Etanol 100%;
- Vedou-se a placa e misturou-se invertendo de 4-5x;
- Envolheu-se a placa em papel alumínio e deixou-a em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos;
- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- Adicionou-se 30µl de Etanol a 70%;
- Vedou-se a placa;
- Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 minutos;
- Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secou-se sobre papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- Ressuspendeu-se a placa com Formamida (10µl) e submeteu-a à eletroforese através de um sequenciador automático de DNA ABI 3500/Life Technologies (Applied Biosystems).

3.2.5 Análises dos Dados

As sequências foram alinhadas usando o ClustalW (THOMPSON et al., 1994) usando parâmetros padrão e convertidos em formato Fasta. Quando necessário foram realizados ajustes usando o editor de sequência BioEdit versão 7.0.5.2 (HALL, 1999). As análises de saturação dos dados foram avaliadas através da plotação do gráfico de transição e transversão com o parâmetro de distância Tamura-Nei no DAMBE versão 5 (XIA, 2013). O modelo evolutivo que melhor se ajustou aos dados, as reconstruções filogenéticas com abordagens de Máxima Likelihood (ML), Máxima Parsimonia (MP), Neighbor-Joining (NJ) e a matriz de divergência genética foram obtidos no MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). A diversidade haplotípica e nucleotídica foi estimada no DnaSP (ROSAS et al., 2003). A rede

de haplótipos foi gerada no software NetWork versão 4.6.1.2 (BANDELDT et al., 2008). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) e as análises das mutações encontradas nos genes estudados através dos testes D (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997) foram realizadas no programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Utilizou-se a plataforma BoldSystems v3 para plotar as sequências do gene COI e realizar a identificação via código de barra de DNA. Duas sequências de *D. aurita* foram obtidas da plataforma Genbank. As espécies *Philander opossum* e *Philander frenatus*, também obtidas do Genbank, foram usadas como grupos externos.

4 RESULTADOS

4.1 Análises do gene mitocondrial rRNA 16S

Para o gene rRNA 16S obteve-se 59 sequências sendo, sete de *D. marsupialis* do Maranhão bioma Cerrado, duas de *D. aurita* do bioma Mata Atlântica de Alagoas e 50 de *D. albiventris* dos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, para os estados da Paraíba, Piauí, Ceará, Sergipe, Pernambuco e Maranhão, contemplando. O fragmento de 546 pb analisado mostrou 531 sítios conservados, 14 variáveis e cinco Informativos para a Parcimônia, verificando-se nas análises oito haplótipos, um para *D. marsupialis*, dois para *D. aurita* e cinco para *D. albiventris*. A composição nucleotídica revelou 26,0% de Timina, 21,3% de Citosina, 32,5% de Adenina e 20,3% de Guanina (Figura 5). O gráfico de transição e transversão versus divergência genética não mostrou saturação dos dados (Figura 6).

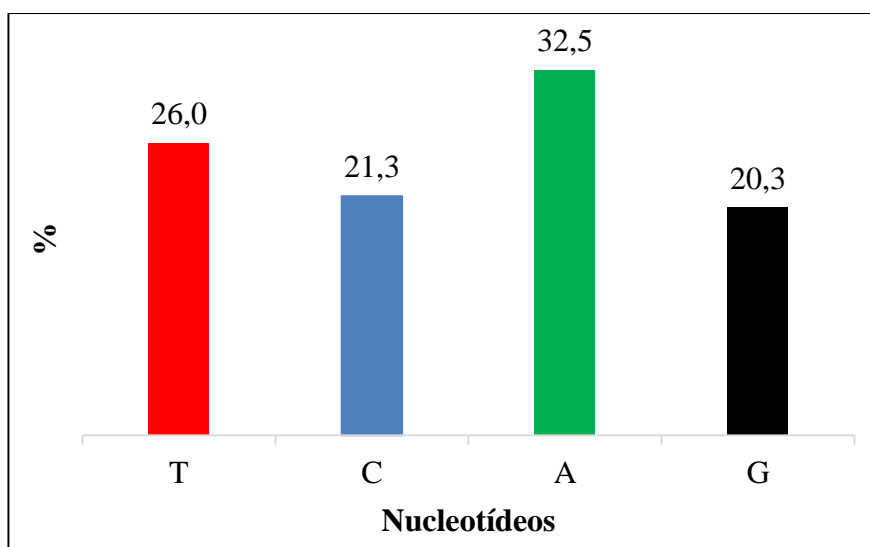


Figura 5. Composição nucleotídica para o banco de dados do gene rRNA 16S.

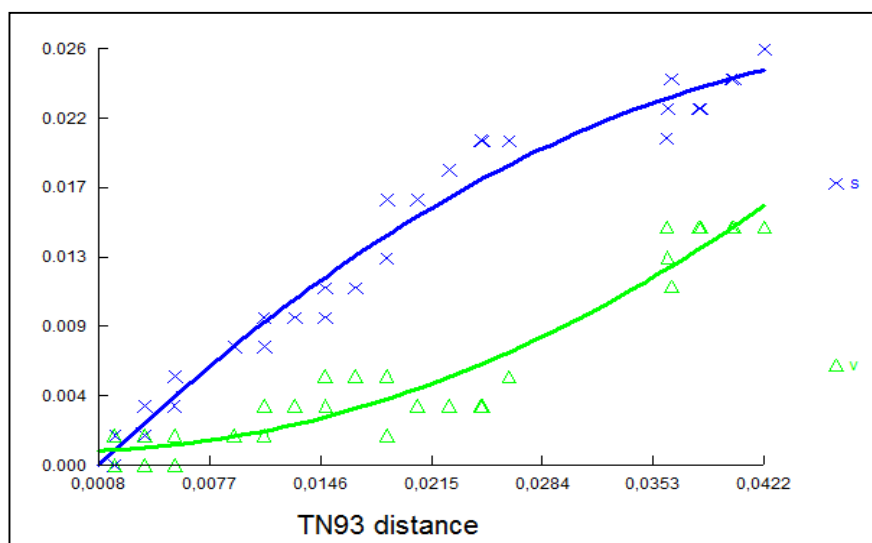


Figura 6. Transição e transverso versus divergência genética para o gene rRNA 16S.

Realizou-se a análise filogenética para esse gene empregando o modelo Tamura-3-parâmetro com distribuição gama discreta (T92+G). A árvore filogenética para os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Likelihood (ML) e Neighbor-Joining (NJ) foram geradas apenas com os haplótipos e tiveram topologias similares, revelando dois clados, um formado pela espécie *D. aurita* de Alagoas com 89/99/99% de *bootstrap* e outro pela espécie *D. albiventris* com 68/85/88% de *bootstrap*, a espécie *D. marsupialis* mostrou-se como grupo irmão de *D. albiventris* (Figura 7). A divergência intraespecífica para *D. aurita* foi de 0,2% e para *D. albiventris* variou de 0,2 a 0,6%. A divergência interespecífica entre *D. marsupialis* e *D. aurita* variou de 1,1 a 1,3%, entre *D. marsupialis* e *D. albiventris* variou de 0,9 a 1,5% e entre *D. aurita* e *D. albiventris* variou de 1,3 a 2,1% (Tabela 4). Os dados através deste gene revelaram os *status* específicos de *D. marsupialis* e *D. albiventris* para o Cerrado leste do Maranhão, com isso amplia-se a distribuição geográfica da espécie *D. marsupialis* em 221 km e de *D. albiventris* em 186 km.

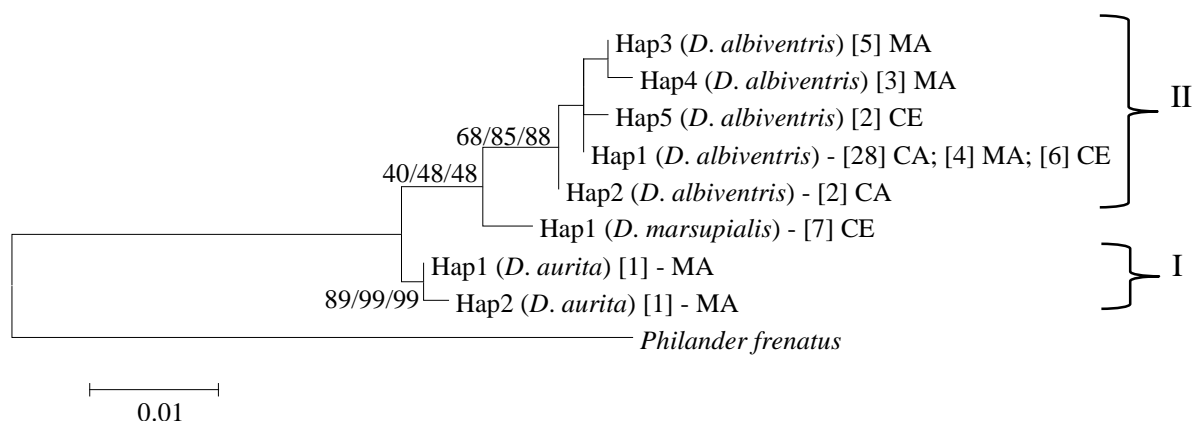


Figura 7. Árvore filogenética de Máxima Likelihood das espécies de *Didelphis* usando o gene rRNA 16S, com valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1.

Tabela 4. Matriz de divergência genética para *Didelphis* usando o gene rRNA 16S empregando o modelo Tamura-3-parâmetro.

Hap/Espécie - [Qnt. Espécimes] Biomas	Divergência (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1 Hap1 (<i>D. marsupialis</i>) - [7] CE	-									
2 Hap1 (<i>D. aurita</i>) [1] – MA	1,1									
3 Hap2 (<i>D. aurita</i>) [1] – MA	1,3	0,2								
4 Hap1 (<i>D. albiventris</i>) - [28] CA; [4] MA; [6] CE	1,1	1,5	1,7							
5 Hap2 (<i>D. albiventris</i>) - [2] CA	0,9	1,3	1,5	0,2						
6 Hap3 (<i>D. albiventris</i>) [5] MA	1,3	1,7	1,9	0,2	0,4					
7 Hap4 (<i>D. albiventris</i>) [3] MA	1,5	1,9	2,1	0,4	0,6	0,2				
8 Hap5 (<i>D. albiventris</i>) [2] CE	1,3	1,7	1,9	0,2	0,4	0,4	0,6			
9 <i>Philander frenatus</i> (KJ868146)	6,4	6,2	6,4	6,4	6,2	6,6	6,8	6,2	-	

Identificação dos espécimes: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1

4.2 Análises do gene mitocondrial Citocromo *b*

Nesse estudo foram analisadas 50 sequências do gene *Cit b* sendo oito de *D. marsupialis* do bioma Cerrado, do estado Maranhão, duas de *D. aurita* da Mata Atlântica dos estados de Alagoas e Bahia (GU112884) e 40 de *D. albiventris* dos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado dos estados da Paraíba, Piauí, Ceará, Sergipe, Pernambuco e Maranhão. Um fragmento de 789 pb foi analisado, desses 708 foram conservados, 81 variáveis e 56 Informativos para Parcimônia, sendo verificados três haplótipos para *D. marsupialis*, dois para *D. aurita* e 19 para *D. albiventris*. A composição nucleotídica foi de

30,6% de Timina, 25,4% de Citosina, 31,1% de Adenina e 12,9% de Guanina (Figura 8). O gráfico de transição e transversão versus divergência genética não mostrou saturação dos dados (Figura 9).

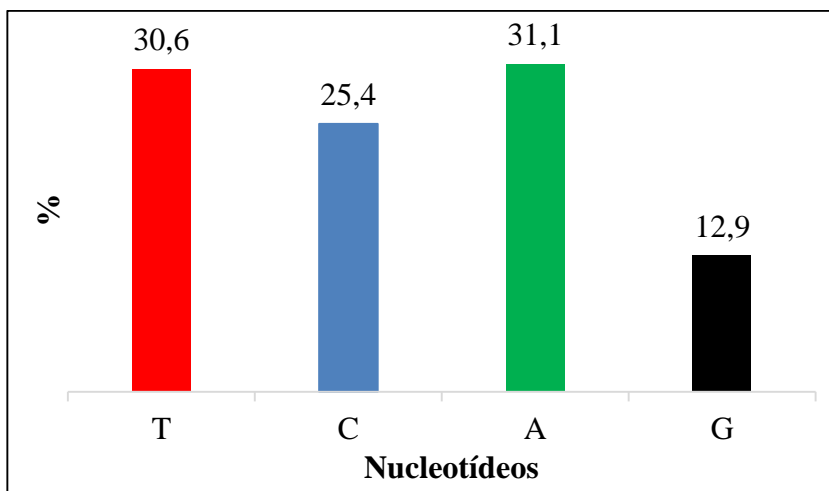


Figura 8. Composição nucleotídica para o banco de dados do gene *Cit b*.

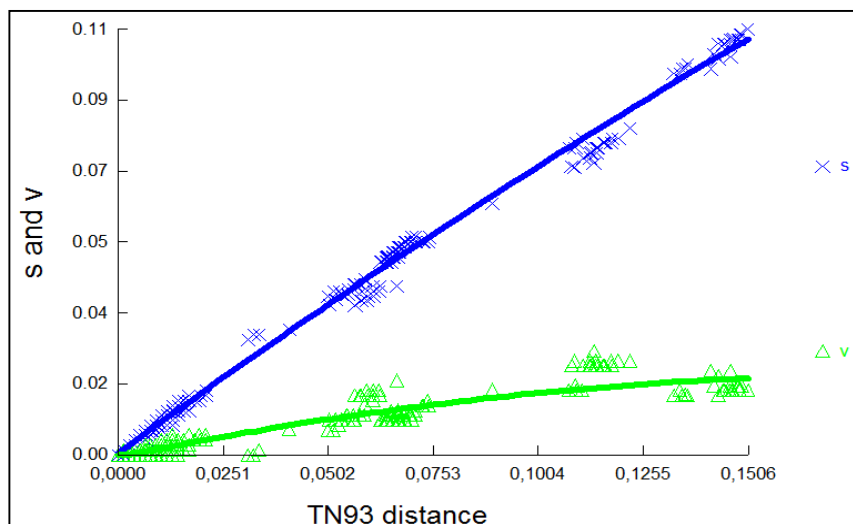


Figura 9. Transição e transversão versus divergência genética para o gene *Cit b*.

O melhor modelo evolutivo para as análises foi o Tamura-Nei com uma distribuição gama discreta (TN93+G) o qual foi usado para gerar as árvores filogenéticas e a matriz de divergência genética apenas com os haplótipos. As árvores filogenéticas para os métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Likelihood e Neighbor-Joining mostraram topologias similares, formando dois clados, um por *D. marsupialis*, como grupo irmão de *D. aurita* embora não suportado, o outro formado por *D. albiventris* fortemente suportado independentemente do bioma (Figura 10).

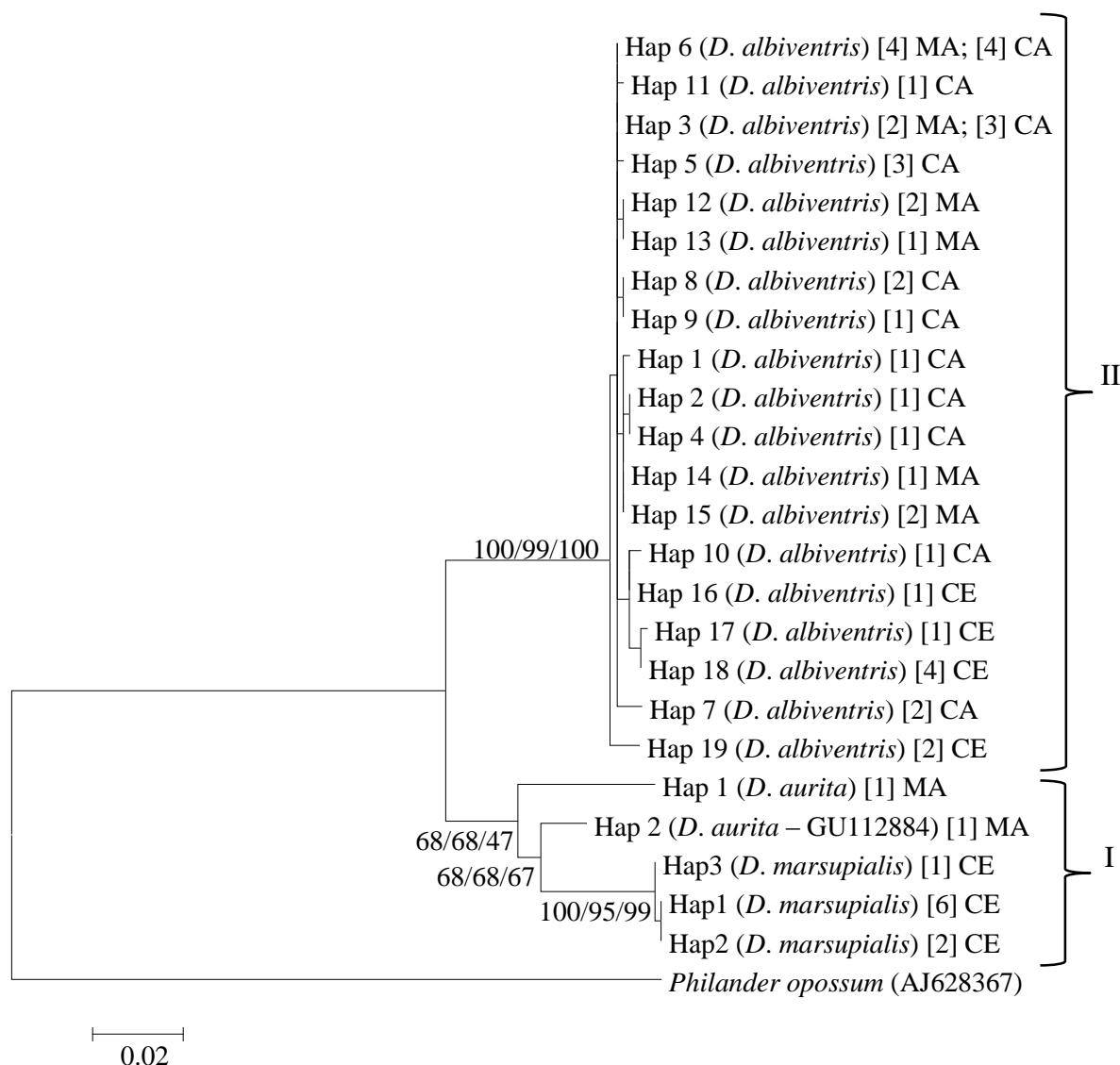


Figura 10. Árvore filogenética de Máxima Likelihood do gênero *Didelphis*, para o gene *Cit b* usando o modelo Tamura-Nei, com os valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1.

A divergência genética intraespecífica para *D. marsupialis* variou de 0,0 a 0,1%, para *D. albiventris* variou de 0,0 a 1,5% e *D. aurita* alcançou 4,0%. A divergência interespecífica entre *D. marsupialis* e *D. aurita* variou de 3,1 a 5,1%, entre *D. marsupialis* e *D. albiventris* variou de 6,5 a 7,1% e entre *D. aurita* e *D. albiventris* a divergência variou de 5,1 a 6,3% (Tabela 5). As filogenias geradas e as distâncias genéticas observadas para esse marcador revelam a espécie *D. albiventris* formando um grupo monofilético para o Nordeste brasileiro independente do bioma e indicam uma espécie diferente para o grupo de *Didelphis* de

orelhas pretas no bioma Mata Atlântica para o estado de Alagoas, e a expansão geográfica de *D. marsupialis* para o bioma Cerrado no leste maranhense.

Gerou-se uma rede de haplótipos para a espécie *D. albiventris* nos diferentes biomas, observou-se que dos 19 haplótipos analisados, 10 foram únicos. O bioma Mata Atlântica apresentou seis haplótipos sendo quatro exclusivos (H12, H13, H14 e H15) e dois compartilhados com a Caatinga (H3 e H6). Os haplótipos H12 e H15 ocorreram duas vezes; H13 e H14 ocorreram uma vez; H3 ocorreu cinco vezes; H6 oito vezes. No bioma Caatinga observou-se 11 haplótipos, sendo os haplótipos H1, H2, H4, H9, H10 e H11 únicos e exclusivos para esse bioma, os haplótipos H5 ocorreram três, os H7 e H8 ocorreram duas vezes respectivamente, mas foram exclusivos para a Caatinga, os haplótipos H3 e H6 ocorreram cinco e oito vezes respectivamente e foram compartilhados com o bioma Mata Atlântica. O bioma Cerrado apresentou quatro haplótipos exclusivos, os haplótipos H16 e H17 ocorreram uma vez cada, o H18 ocorreu três vezes e o H19 ocorreu duas vezes (Tabela 6 e Figura 11).

Tabela 5. Matriz de divergência genética para o gene Citocromo *b* usando o modelo Tamura-Nei, para as espécies analisadas neste estudo.

Hap/Espécie - [Qnt. Espécimes] Biomas	Divergência (%)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 Hap1 (<i>D. marsupialis</i>) [6] CE	-																								
2 Hap2 (<i>D. marsupialis</i>) [2] CE	0,0																								
3 Hap3 (<i>D. marsupialis</i>) [1] CE	0,1	0,1																							
4 Hap 1 (<i>D. aurita</i>) [1] MA	5,1	5,1	5,0																						
5 Hap 2 (<i>D. aurita</i> – GU112884) [1] MA	3,3	3,3	3,1	4,0																					
6 Hap 1 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,9	6,9	6,8	5,8	5,1																				
7 Hap 2 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,6	6,6	6,5	5,8	5,4	0,3																			
8 Hap 3 (<i>D. albiventris</i>) [2] MA; [3] CA	6,6	6,6	6,5	5,8	5,4	0,3	0,3																		
9 Hap 4 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,6	6,6	6,5	5,8	5,4	0,3	0,0	0,3																	
10 Hap 5 (<i>D. albiventris</i>) [3] CA	6,8	6,8	6,6	5,6	5,6	0,4	0,4	0,1	0,4																
11 Hap 6 (<i>D. albiventris</i>) [4] MA; [4] CA	6,6	6,6	6,5	5,8	5,4	0,3	0,3	0,0	0,3	0,1															
12 Hap 7 (<i>D. albiventris</i>) [2] CA	6,7	6,7	6,6	6,3	5,5	0,8	0,8	0,5	0,8	0,6	0,5														
13 Hap 8 (<i>D. albiventris</i>) [2] CA	6,8	6,8	6,6	6,0	5,3	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,6													
14 Hap 9 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,8	6,8	6,6	6,0	5,3	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,6	0,0												
15 Hap 10 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,9	6,9	6,8	6,1	5,7	0,8	0,8	0,5	0,8	0,6	0,5	1,0	0,6	0,6											
16 Hap 11 (<i>D. albiventris</i>) [1] CA	6,8	6,8	6,6	6,0	5,6	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,6	0,3	0,3	0,6										
17 Hap 12 (<i>D. albiventris</i>) [2] MA	6,8	6,8	6,6	5,6	5,6	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3									
18 Hap 13 (<i>D. albiventris</i>) [1] MA	6,8	6,8	6,6	5,6	5,6	0,4	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,0								
19 Hap 14 (<i>D. albiventris</i>) [1] MA	6,8	6,8	6,6	5,6	5,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3							
20 Hap 15 (<i>D. albiventris</i>) [2] MA	6,8	6,8	6,6	5,6	5,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,0						
21 Hap 16 (<i>D. albiventris</i>) [1] CE	6,6	6,6	6,5	5,8	5,4	0,5	0,5	0,3	0,5	0,4	0,3	0,8	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4					
22 Hap 17 (<i>D. albiventris</i>) [1] CE	7,1	7,1	6,9	6,3	5,6	0,7	0,9	0,7	0,9	0,8	0,7	1,2	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4			
23 Hap 18 (<i>D. albiventris</i>) [4] CE	6,9	6,9	6,8	6,1	5,7	0,8	0,8	0,5	0,8	0,7	0,5	1,0	0,7	0,7	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,3	0,1		
24 Hap 19 (<i>D. albiventris</i>) [2] CE	6,9	6,9	6,8	6,1	5,7	1,0	1,0	0,8	1,0	0,9	0,8	1,3	0,9	0,9	1,3	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,5	1,3		
25 <i>Philander opossum</i> (AJ628367)	14,0	14,0	14,1	15,2	14,0	15,5	15,0	15,5	15,0	15,7	15,5	15,0	15,3	15,3	15,1	15,7	15,7	15,7	15,3	15,3	15,0	15,3	15,0	15,5	-

Identificação dos espécimes: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1

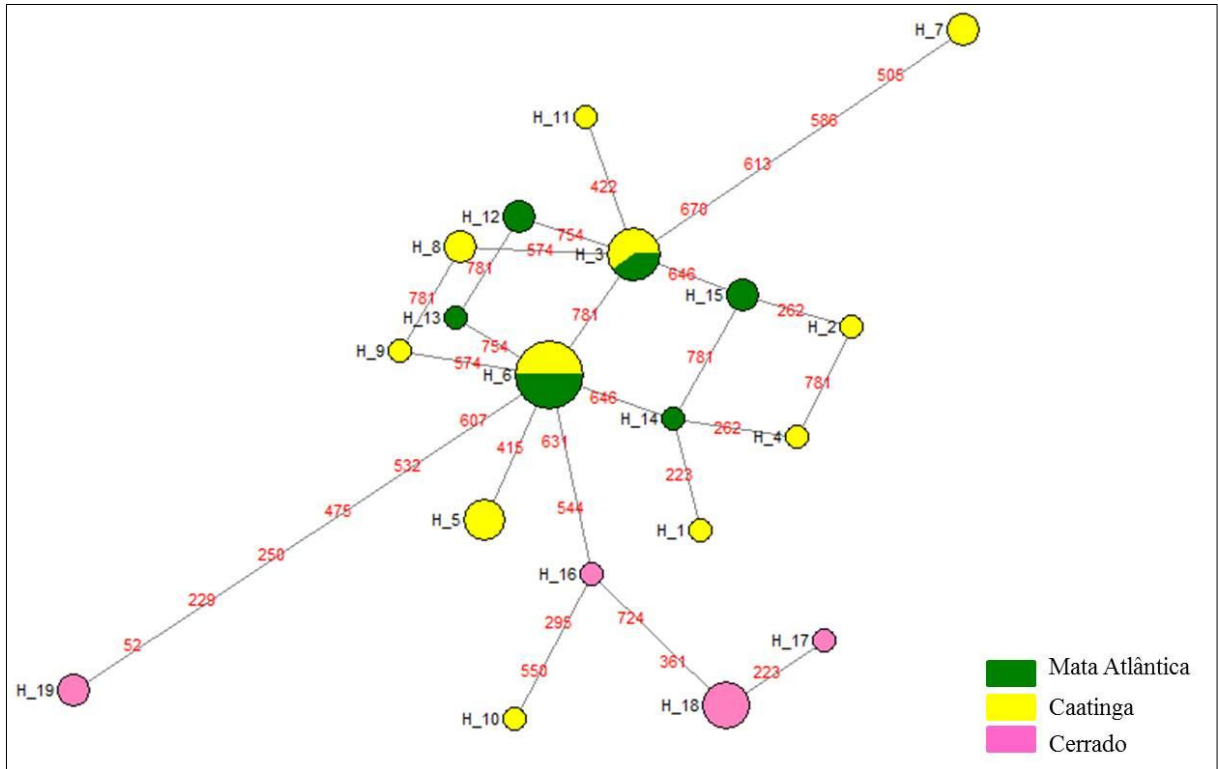


Figura 11. Rede de haplótipos para *D. albiventris* relacionando os biomas da região Nordeste, para o gene *Cit b*. Os números representam a posição e a quantidade de mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem.

Para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o gene *Cit b* para a espécie *D. albiventris*, tratou-se os dados como uma única população para os diferentes biomas da região Nordeste. Os resultados indicaram 29.78% de variação entre as populações e 70.22% dentro das populações, com um valor de F_{ST} igual a 0.29783 e P igual a 0.00000, altamente significativo (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado da AMOVA de um único grupo nas populações de *D. albiventris* da região Nordeste, para o gene *Cit b*.

Tipo de Variação	Variação dos componentes	% de Variação	F_{ST} Estatístico	P^*
Entre as populações	0.58953	29.78	0.29783	0.00000
Dentro das populações	1.38986	70.22		

*Valores de P , calculados aleatoriamente com 1.023 permutações.

A diversidade genética foi estimada para a população de cada bioma e foram observadas diversidades haplotípicas variando de 0,750 para o Cerrado, a 0,926 para a Caatinga. A diversidade nucleotídica variou de 0,00173 para a Mata Atlântica, a 0,00602 para o Cerrado. Com relação aos testes de neutralidade, o teste D (TAJIMA, 1989) não exibiu valores de P significativos, já o teste de F_S de Fu (FU, 1997) mostrou valor de P significativo para as populações da Mata Atlântica e Caatinga (Tabela 8). Tanto os resultados das redes de haplótipos quanto da AMOVA não mostram estruturação das populações de *D. albiventris* nos diferentes biomas da região Nordeste. Os testes de neutralidades revelam que as populações da Mata Atlântica e da Caatinga estão sendo influenciadas por algum parâmetro demográfico, seja decréscimo ou expansão populacional.

Tabela 8. Diversidade genética e testes de neutralidade nas populações de *D. albiventris* analisadas na região Nordeste, para o gene *Cit b*.

Populações	N	NH	Diversidade Molecular		Testes de Neutralidade	
			h	π	Teste D	Teste F_S
Mata Atlântica	12	6	0,864	0,00173	1.22248*	-2.39059
Caatinga	20	11	0,926	0,00364	-1.18209*	-4.10430
Cerrado	8	4	0,750	0,00602	0.59751*	2.06933*
Populações agrupadas	40	19	0,933	0,00447	0.21263*	-1.47518*

N: Número amostral; NH: Número de haplótipos; h : Diversidade haplotípica; π : Diversidade nucleotídica; (*) = $P > 0,05$

4.3 Análises do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I

Para o gene COI obteve-se 63 sequências, sendo oito de *D. marsupialis* do bioma Cerrado, estado do Maranhão, três de *D. aurita* do bioma Mata Atlântica, dos estados de Alagoas e Espírito Santos (GU112798) e 52 de *D. albiventris* dos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado para os estados da Paraíba, Piauí, Ceará, Sergipe, Pernambuco e Maranhão. Um fragmento de 655 pb foi analisado, desses 596 foram conservados, 59 foram variáveis e 44 informativos para parcimônia, verificando-se 16 haplótipos, um para *D. marsupialis*, três para *D. aurita* e 12 para *D. albiventris*. A composição nucleotídica foi de 34,0% de Timina, 23,0% de Citosina, 28,0% de Adenina e 15,0% de Guanina (Figura 12). O gráfico de transição e transversão versus divergência genética gerado, não revelou saturação dos dados (Figura 13).

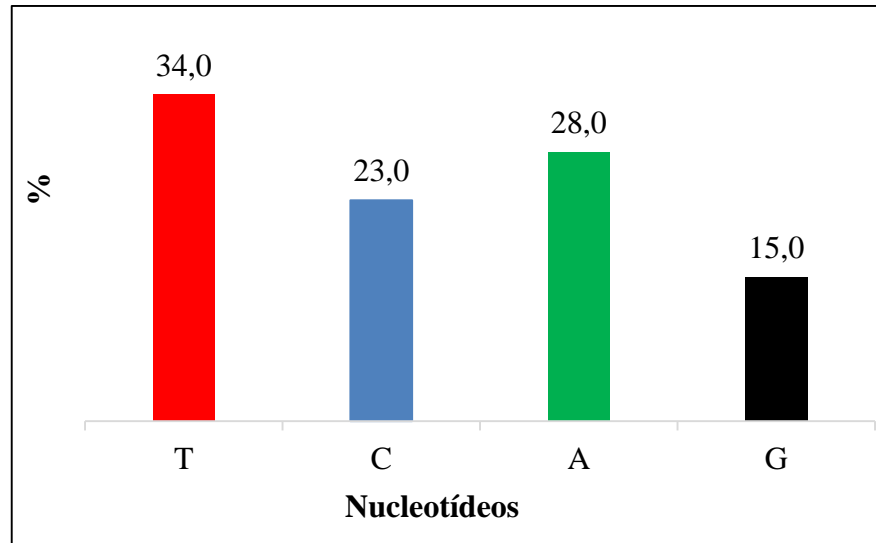


Figura 12. Composição nucleotídica para o banco de dados do gene COI.

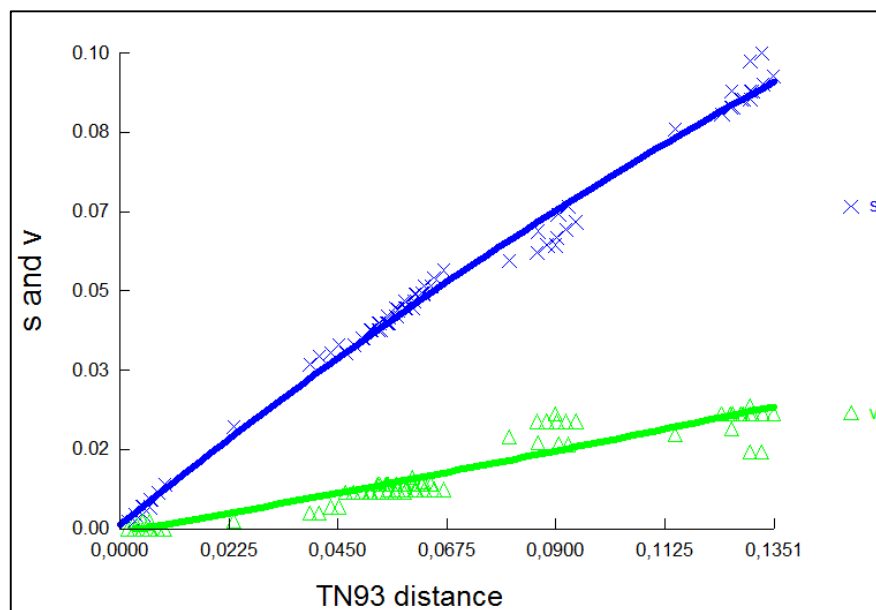


Figura 13. Transição e transversão versus divergência genética para o gene COI.

As sequências do gene COI dos diferentes estados foram plotadas na plataforma BoldSystems e obteve-se a identificação da espécie *D. albiventris* com similaridade variando de 99,34% para o estado da Paraíba a 100% para o estado do Maranhão, nos três diferentes biomas analisados (Figura 14). *D. marsupialis* de ocorrência no Maranhão obteve uma similaridade de 99,07% com *D. marsupialis*, 98,56% com *D. aurita* e 97,64% com *D. virginiana* o que confirma o *status* de *D. marsupialis* para o Maranhão (Figura 15). *D. aurita*

de Alagoas teve uma similaridade de 96,94% com *D. marsupialis* e 96,46% com *D. aurita*, essas similaridades são baixas para garantir uma identificação via código de barra de DNA para os espécimes analisados (Figura 16). Dessa forma, os resultados obtidos na plataforma Boldsystems foram eficientes para identificar as espécies *D. albiventris* e *D. marsupialis* de ocorrência na região Nordeste e apontar para uma espécie, morfologicamente pertencente ao grupo marsupialis, diferente de *D. aurita* e *D. marsupialis* na Mata Atlântica alagoana.

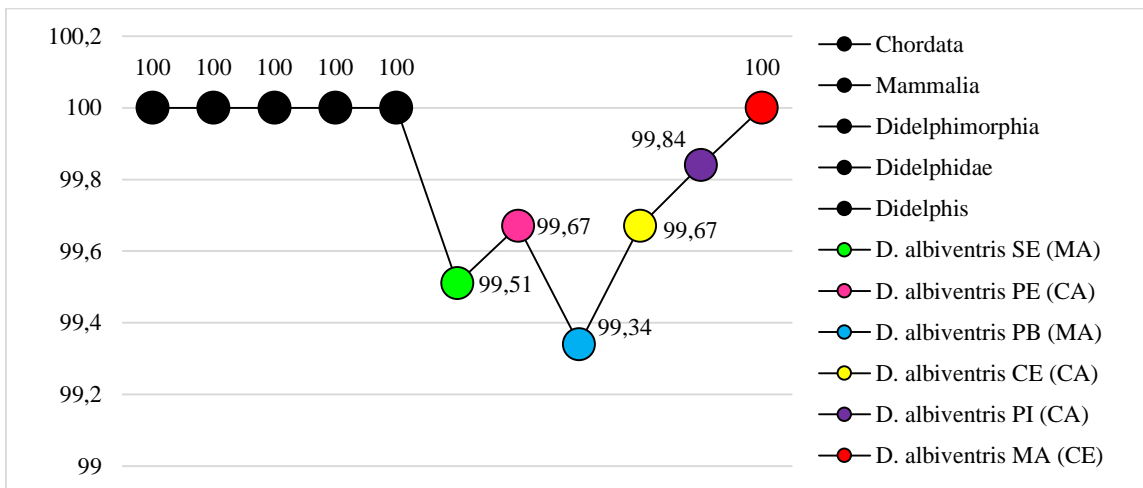


Figura 14. Identificação da espécie *D. albiventris* na plataforma BoldSystems v3, através do gene COI para a região Nordeste do Brasil. SE, PE, PB., CE, PI e MA: Estados brasileiros. Entre parênteses os biomas MA (Mata Atlantica), CA (Caatinga) e CE (Cerrado).

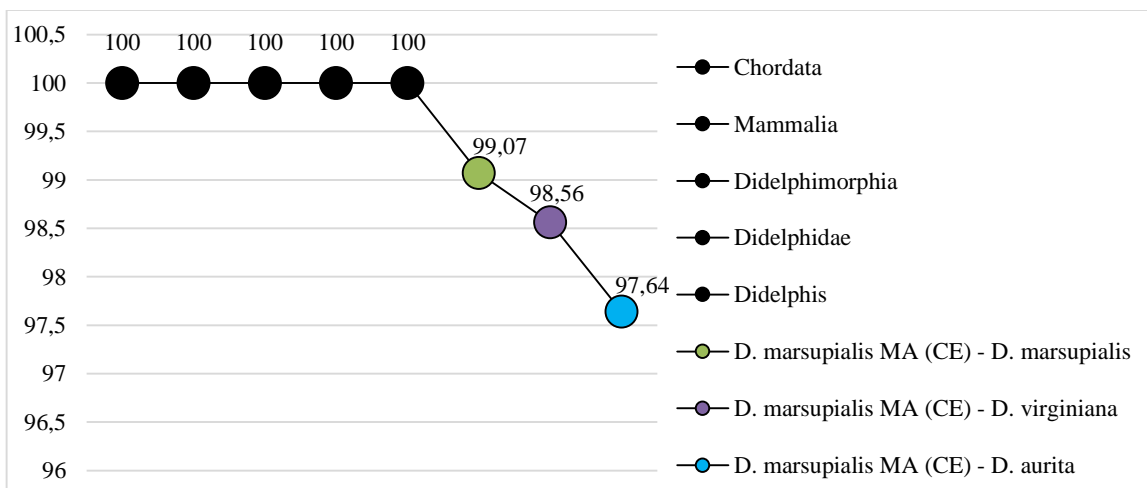


Figura 15. Identificação da espécie *D. marsupialis* na plataforma BoldSystems v3 através do gene COI para a região Nordeste do Brasil. MA: Estado brasileiro. Entre parêntese o bioma Cerrado.

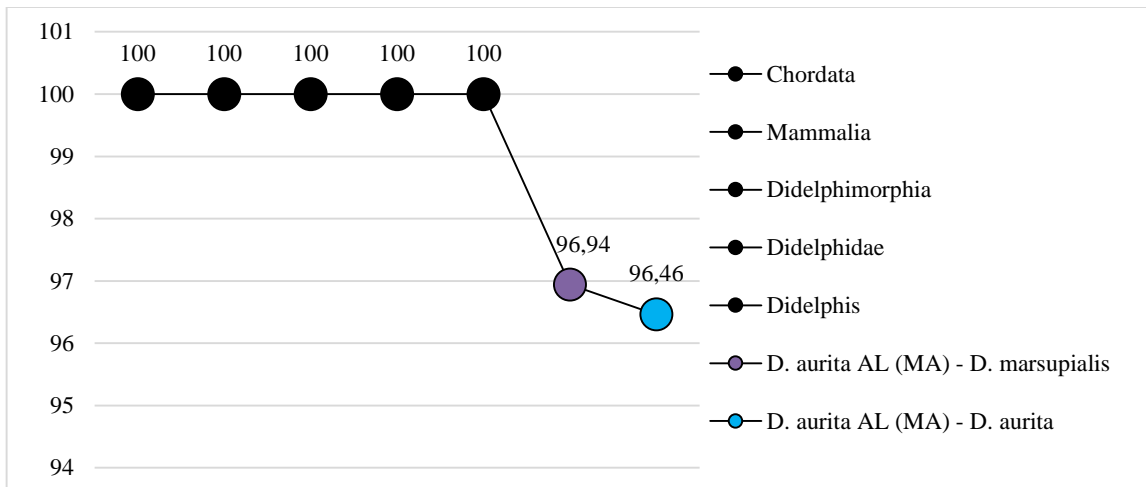


Figura 16. Identificação de uma espécie diferente de *D. aurita* e *D. marsupialis* na Mata Atlântica alagoana através da plataforma BoldSystems v3 a partir do gene COI. AL: Estado brasileiro. Entre parêntese o bioma Mata Atlântica.

Para as análises filogenéticas utilizou-se o modelo evolutivo Tamura-Nei com distribuição gama discreta (TN93+G). Os diferentes métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Likelihood e Neighbor-Joining utilizados para gerar as árvores filogenéticas, apenas com os haplótipos, revelaram topologias similares com três clados. Um formado por *D. aurita* da Mata Atlântica (Alagoas) com 99/99/100% de *bootstrap*, outro por *D. aurita* e *D. marsupialis* 96/88/96% e outro por *D. albiventris* com 99/100/100% (Figura 17).

A divergência genética intraespecífica para *D. aurita* variou de 0,2 a 4,2%, para *D. albiventris* a divergência variou de 0,2 a 1,0%. A divergência interespecífica entre as espécies *D. marsupialis* e *D. aurita* variou de 2,4 a 4,5%, entre *D. marsupialis* e *D. albiventris* variou de 5,2 a 6,4% e entre *D. aurita* e *D. albiventris* a variação foi de 4,9 a 6,8% (Tabela 9). A magnitude das divergências genéticas e as árvores filogenéticas reforçam o encontrado na plataforma Boldsystems, indicando uma espécie na Mata Atlântica de Alagoas diferente das espécies *D. aurita* e *D. marsupialis*.

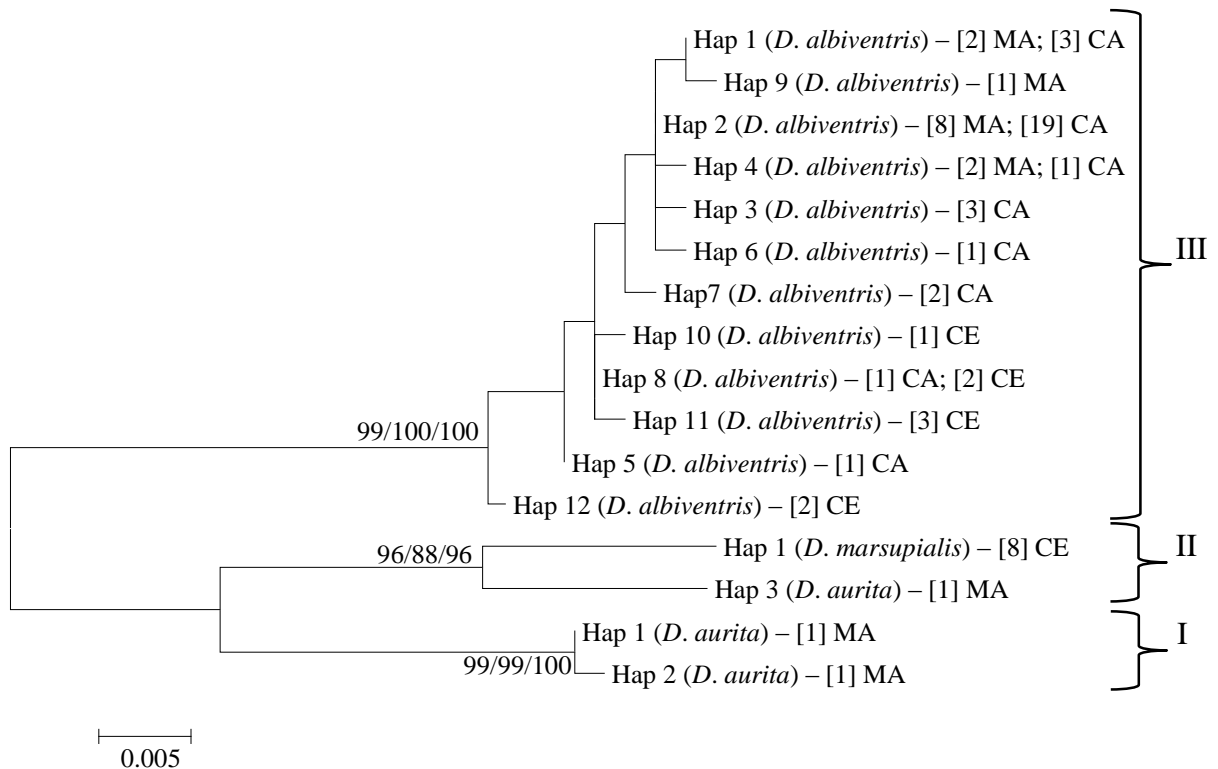


Figura 17. Árvore filogenética de Máxima Likelihood através do gene COI, para as espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita*, com valores de *bootstrap* para os métodos de MP, ML e NJ da esquerda para a direita. Cada ramo está identificado de acordo com a seguinte ordem de informações: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1.

Tabela 9. Matriz de divergência genética usando o modelo Tamura-Nei para o gene mitocondrial COI para as espécies analisadas.

Hap/Espécie – [Qnt. Espécimes] Biomas	Divergência %																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1 Hap 1 (<i>D. marsupialis</i>) – [8] CE	-																	
2 Hap 1 (<i>D. aurita</i>) – [1] MA	4,3																	
3 Hap 2 (<i>D. aurita</i>) – [1] MA	4,5	0,2																
4 Hap 3 (<i>D. aurita</i>) – [1] MA	2,4	4,0	4,2															
5 Hap 1 (<i>D. albiventris</i>) – [2] MA; [3] CA	6,2	5,8	6,0	6,6														
6 Hap 2 (<i>D. albiventris</i>) – [8] MA; [19] CA	6,0	5,6	5,8	6,4	0,2													
7 Hap 3 (<i>D. albiventris</i>) – [3] CA	5,8	5,4	5,6	6,2	0,3	0,2												
8 Hap 4 (<i>D. albiventris</i>) – [2] MA; [1] CA	5,8	5,8	6,0	6,6	0,3	0,2	0,3											
9 Hap 5 (<i>D. albiventris</i>) – [1] CA	5,4	5,1	5,2	5,8	0,7	0,5	0,3	0,7										
10 Hap 6 (<i>D. albiventris</i>) – [1] CA	6,2	5,8	6,0	6,6	0,3	0,2	0,3	0,3	0,7									
11 Hap7 (<i>D. albiventris</i>) – [2] CA	6,0	5,6	5,8	6,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5								
12 Hap 8 (<i>D. albiventris</i>) – [1] CA; [2] CE	5,6	5,2	5,4	6,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,2	0,5	0,3							
13 Hap 9 (<i>D. albiventris</i>) – [1] MA	6,4	6,0	6,2	6,8	0,2	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,7	0,7						
14 Hap 10 (<i>D. albiventris</i>) – [1] CE	5,8	5,4	5,6	6,2	0,7	0,5	0,7	0,7	0,3	0,3	0,5	0,2	0,8					
15 Hap 11 (<i>D. albiventris</i>) – [3] CE	5,4	5,4	5,6	6,2	0,7	0,5	0,7	0,7	0,3	0,7	0,5	0,2	0,8	0,3				
16 Hap 12 (<i>D. albiventris</i>) – [2] CE	5,2	4,9	5,1	5,6	0,8	0,7	0,5	0,8	0,5	0,8	0,7	0,7	1,0	0,8	0,8			
17 <i>Philander opossum</i>	12,6	13,8	13,6	11,8	13,6	13,4	13,2	13,6	12,7	13,6	13,3	12,9	13,9	13,1	12,9	13,0	-	

Identificação dos espécimes: Hap=haplótipos; (Espécie) – [Quantidade de Espécimes]; Biomas: MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado. Veja tabela 1

Gerou-se uma rede de haplótipos para a espécie *D. albiventris* com as populações dos diferentes biomas da região Nordeste através do gene COI, onde se observou 12 haplótipos. No bioma Mata Atlântica foram encontrados quatro haplótipos, sendo três compartilhados com o bioma Caatinga: H1, H2 e H4 que ocorreram três, 27 e cinco vezes respectivamente, e um exclusivo para esse bioma, o haplótipo H9. O bioma Caatinga foi representado por oito haplótipos, sendo os haplótipos H1, H2 e H4 compartilhados com a Mata Atlântica, o H8 ocorreu três vezes e foi compartilhado com bioma Cerrado, os demais foram exclusivos para esse bioma, o haplótipo H3 ocorreu três vezes, o H7 ocorreu duas vezes e os H5 e H6 que ocorreram uma vez cada. No Cerrado os haplótipos H10, H11 e H12 foram exclusivos para esse bioma, apenas o haplótipo H8 foi compartilhado com a Caatinga (Figura 18 e Tabela 10).

Tabela 10. Ocorrência dos haplótipos de *D. albiventris* nos diferentes estados e biomas da região Nordeste, com base no gene COI.

NH	Sítios Informativos	Freq.	Biomas
	2223345555 60225810226 78096886368		
H1	CGTTCTCTCTA	3	CA e MA
H2C....	27	CA e MA
H3	.A.....C....	3	CA
H4C.C....	3	CA e MA
H5	TA.....TC....	1	CA
H6	..C.....C....	1	CA
H7TC..T	2	CA
H8	T.....TC....	3	CA e CE
H9T.....	1	MA
H10	T.C...TC....	1	CE
H11	T.....TC.C.	3	CE
H12	.A.C..TCT..	2	CE

Biomas: MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado; CA: Caatinga

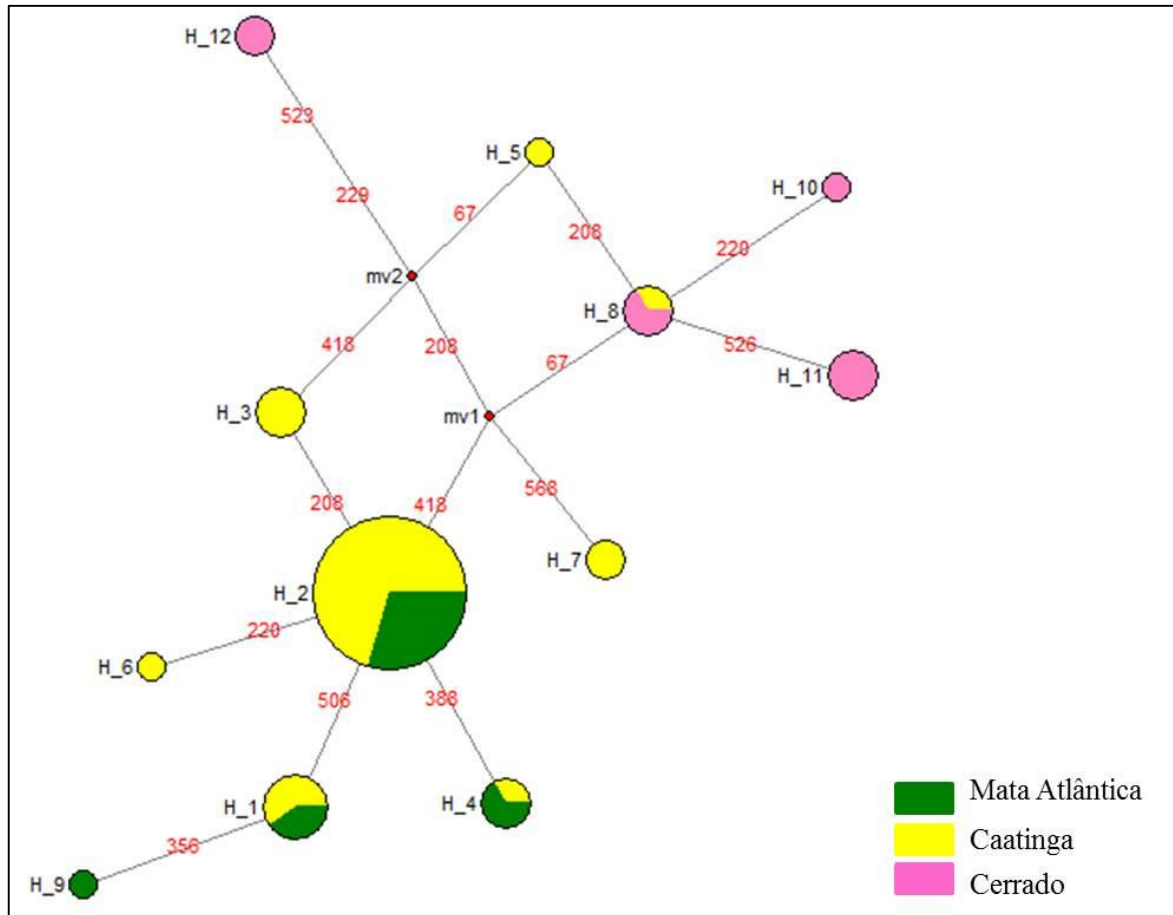


Figura 18. Rede de haplótipos usando o gene COI, para *D. albiventris* relacionando os biomas da região Nordeste. Os números representam à posição e a quantidade de mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem.

Para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) através do gene COI para a espécie *D. albiventris*, tratou-se os dados como uma única população para a região Nordeste. Os resultados indicaram 38.41% de variação entre as populações e 61.59% dentro das populações, com um valor de F_{ST} igual a 0.38413 e P igual a 0.00000, altamente significativo (Tabela 11).

Tabela 11. Resultado da AMOVA de um único grupo para o gene COI, das populações de *D. albiventris* da região Nordeste.

Tipo de Variação	Variação dos componentes	% de Variação	F_{ST} Estatístico	P^*
Entre as populações	0.36950	38.41	0.38413	0.00000
Dentro das populações	0.59241	61.59		

*Valores de P , calculados aleatoriamente com 1.023 permutações.

A diversidade molecular foi estimada através do gene COI para a população de cada bioma e foram observadas diversidades haplotípicas variando de 0,615 para o bioma Mata Atlântica a 0,821 para o bioma Cerrado. A diversidade nucleotídica variou de 0,00125 para o bioma Mata Atlântica a 0,00382 para o bioma Cerrado. Com relação aos testes de neutralidade para as populações separadas o teste D (Tajima, 1989), não exibiu valores de P significativos e o teste de F_s (Fu, 1997) apenas mostrou valor de P significativo para a população da Caatinga, indicando que somente essa população está sendo influenciadas por parâmetros demográficos (Tabela 12).

Tabela 12. Diversidade genética e testes de neutralidade para o gene COI, das populações de *D. albiventris* analisadas na região Nordeste.

Populações	N	NH	Diversidade Molecular		Testes de neutralidade	
			h	π	Teste D	Teste F_s
Mata Atlântica	13	4	0,615	0,00125	-0.47825*	-0.94022*
Caatinga	31	8	0,617	0,00156	-1.21895*	-3.79512
Cerrado	8	4	0,821	0,00382	0.37458*	0.61346*
Populações agrupadas	52	12	0,717	0,00245	-0.44087*	-1.37396*

N: Número amostral; NH: Número de haplótipos; h : Diversidade haplotípica; π : Diversidade nucleotídica; (*) = $P > 0,05$

5. DISCUSSÃO

De acordo com Gardner (2008) e Assis (2011) na região Nordeste do Brasil é registrado dois grupos de espécies do gênero *Didelphis*: o grupo marsupialis com as espécies *D. marsupialis* e *D. aurita* e o grupo albiventris com a espécie *D. albiventris*. As três espécies foram analisadas geneticamente neste estudo para diferentes biomas da região Nordeste.

A composição nucleotídica para os marcadores rRNA 16S, *Cit b* e COI revelou uma menor concentração para Guanina corroborando com o estudo de Carvalho et al. (2011) com o marsupial do gênero *Monodelphis*. A não saturação dos dados nesse estudo para os três genes está de acordo com esse autor e evidencia um bom sinal filogenético para análise.

Através do gene rRNA 16S foi confirmado a ocorrência das três espécies, *D. marsupialis*, *D. aurita* e *D. albiventris* para o Nordeste brasileiro, com *D. marsupialis* e *D. albiventris* ocorrendo no Cerrado maranhense, na APA municipal do Inhamum. Esse resultado evidencia uma expansão geográfica da ocorrência da espécie *D. marsupialis* em 221 km, pois embora Paglia et al. (2012) considerem essa espécie como típica da Amazônia, há registro da mesma na cidade de Barra do Corda, Maranhão (GARDNER, 2008), onde predomina o bioma Cerrado (IBGE, 2014), sendo os dados deste estudo os primeiros registros desta espécie para o leste do estado. Este estudo ainda revela um evento raro, a ocorrência de simpatria entre as espécies *D. marsupialis* e *D. albiventris* (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 1999), ampliando a distribuição de *D. albiventris* em 186 km, visto o registro mais a oeste de sua distribuição pela região Nordeste, ter sido a cidade de São João dos Patos, Maranhão localizada numa área de transição entre os biomas Cerrado e Caatinga (GARDNER, 2008; IBGE, 2014).

5.1 Grupo Marsupialis

Para o grupo marsupialis foi evidenciado, independentemente do gene, a espécie *D. marsupialis* como grupo irmão da espécie *D. aurita* corroborando com o estudo filogeográfico de marsupiais da América do Sul realizado por Patton e Costa (2003).

A média de divergência genética para *D. aurita* neste estudo através do gene *Cit b* foi de 4,0%, corroborando com Nascimento et al. (2014) em um estudo com o grupo marsupialis de países das Américas do Sul e do Norte, que obtiveram uma divergência de 4,4% para *D. marsupialis* do México e Peru. Para outros didelfídeos o resultado foi similar, a saber: *Thylamys pusillus* com 5,1% (GIARLA et al., 2010), *Caluromys philander* 5,69% (COSTA et al., 2003), *Marmosops pinheiroi* 6,3% (NASCIMENTO et al., 2015) e *Monodelphis peruviana* 4,7% (CARVALHO et al., 2011).

A divergência genética interespecífica entre *D. marsupialis* e *D. aurita* para o gene *Cit b* neste estudo alcançou 5,1% (média de 4,15%) esta divergência é portanto um indicativo de diferenciação dos táxons em dois grupos quando se considera Baker e Bradley (2006). Além disso, o resultado está de acordo com Patton e Costa (2003) que encontraram uma média de divergência de 3,03% confirmando o *status* de *D. aurita* como proposto por Cerqueira (1985) e Cerqueira e Lemos (2000) utilizando dados morfométricos.

De acordo com Baker e Bradley (2006) e Agrizzi et al. (2012) os níveis de divergências genéticas intraespecíficas, considerando o gene *Cit b*, variam bastante entre os diferentes grupos de mamíferos, a saber: o marsupial *Marmosops incanus* pode atingir até 9,1% de divergência, no roedor *Baiomys* chega a 6,5% e no morcego *Glossophaga* atinge até 5,9%. Entretanto, adotando os níveis de divergência genética deste marcador, como um indicativo para propor uma nova espécie biológica entre os mamíferos, Baker e Bradley (2006) consideram uma distância genética menor que 2% (<2%) como típica de uma variação intraespecífica e que a probabilidade de diferenciação em dois grupos aumenta quando é encontrada uma divergência maior que 5% (>5%) e como um sinal de separação de dois filogrupos quando é maior que 10% (>10%).

Neste estudo, através dos genes *Cit b* e COI verificou-se uma divergência intraespecífica alta (alcançando 4,0% e 4,2% respectivamente) para a espécie *D. aurita* quando é considerada a ocorrência desta na Mata Atlântica alagoana, portanto isto é um indicativo de uma espécie diferente de *D. marsupialis* e *D. aurita* neste bioma. Este resultado corrobora com Shirai (2008) e Assis (2011) utilizando marcadores mitocondrial e nuclear, que revelam uma nova linhagem para o estado de Alagoas. Sendo assim, sugere-se um estudo com um maior número amostral para *D. aurita* da Mata Atlântica alagoana a fim de confirmar ou refutar a sua diferenciação.

Diante da inferência de Baker e Bradley (2006) verifica-se que as distâncias encontradas para as espécies do grupo *marsupialis* neste estudo são altas para variações intraespecíficas (>2%), no entanto quando excluímos *D. aurita* de ocorrência no estado de Alagoas, são baixos para diferenciá-los em dois filogrupos (<5%) morfometricamente diferentes (CERQUEIRA; LEMOS, 2000). Entretanto, como não há evidências do contato dessas duas espécies, uma vez que são alopátricas, o isolamento reprodutivo é esperado, mas não há nenhuma informação que confirme seu total isolamento, embora se saiba que o corredor de vegetação seca (áreas mais abertas do Brasil Central) é um limitante no fluxo gênico entre as florestas tropicais da América do Sul (COSTA, 2003).

O barcode gerado para a espécie *D. marsupialis* de ocorrência no Cerrado maranhense foi eficaz, pois mostrou uma similaridade acima de 99% o que garante a identificação do táxon como *D. marsupialis*, corroborando com Ratnasingha e Herbet (2007). Para o gene COI, a divergência interespecífica para o grupo marsupialis (sem incluir amostragem de Alagoas) foi de 2,4% neste estudo, esta magnitude de divergência foi similar ao encontrado por Cervantes et al. (2010) que foi de 2,7%, no entanto para uma divergência intraespecífica (*D. marsupialis* do México). A baixa divergência revelada neste estudo para esses dois táxons distintos é mais um indicativo da separação recente dessas duas espécies alopátricas, isto foi evidenciado com outro marcador molecular (*Cit b*) neste estudo e também por Assis (2011) que afirma que a divergência entre *D. marsupialis* e *D. aurita* ocorreu por volta 600.000-800.000 anos atrás.

Quando se analisa *D. aurita* de ocorrência na Mata atlântica alagoana com *D. aurita* do Espírito Santo evidencia-se uma média de divergência de 4,1%, no entanto esta magnitude de divergência é bastante similar a divergência interespecífica entre *D. aurita* de ocorrência na Mata atlântica alagoana e *D. marsupialis* (média de 4,4%) e bastante diferente da divergência intraespecífica de *D. aurita* de ocorrência na Mata atlântica alagoana (0,2%). Isso foi refletido nos valores de similaridades obtidos na plataforma Boldsystems, os quais foram conclusivos (<97%) em diferenciar *D. aurita* de ocorrência na Mata Atlântica alagoana das demais *D. aurita* (96,46%) e *D. marsupialis* (96,94%) analisadas.

5.2 Grupo albiventris

As análises para *D. albiventris* revelaram o monofiletismo dessa espécie de ocorrência na região Nordeste do Brasil, corroborando com os dados morfológicos para esse táxon. Os níveis de divergências genéticas foram baixos com uma média de 0,5% para os marcadores *Cit b* e COI, resultados esperados quando se trata de um mesmo táxon para o grupo de mamíferos (JONS; AVISE, 1998).

O código de barra gerado para a espécie *D. albiventris* foi eficiente na identificação da mesma para todos os biomas da região Nordeste, uma vez que obedeceu ao princípio do "Consortium for the Barcode of Life" (CBOL - www.barcoding.si.edu) com similaridades obtidas na plataforma Boldsystems superiores a 99%.

Segundo Gardner (2008), *D. albiventris* está distribuído em habitats de Cerrado e Caatinga, enclaves e zonas de transição. A ocorrência em simpatria de *D. albiventris* e *D. marsupialis* no Cerrado maranhense também foi destacada por Costa et al. (2012) na APA do Inhamum (espécimes utilizados nesse estudo), registro raro entre essas duas espécies. No

entanto, isto pode ser explicado pela grande diversidade de ambientes da área, que apesar da predominância do Cerrado, está localizada em uma zona de transição entre a Amazônia maranhense e a Caatinga do Nordeste, favorecendo assim a uma fauna bastante diversificada como apontado por Bezerra et al. (2012), Nascimento et al. (2015) e Olímpio et al. (2015). Os registros de simpatria para o gênero *Didelphis* são incomuns, há relatos apenas de Bezerra et al. (2009) através de fezes de *Chrysocyon brachiurus* com vestígios de *D. albiventris* e visualização direta de *D. marsupialis* no Parque Nacional do Araguaia, uma zona de transição entre a Amazônia e o Cerrado. Cáceres e Monteiro-Filho (1999), Cervantes et al. (2010) e Sousa et al. (2012b) relataram para duas espécies dos grupos marsupialis e albiventris nos estados do Paraná e Minas Gerais, Brasil e no México.

As redes de haplótipos geradas juntamente a AMOVA não revelaram estruturação populacional para *D. albiventris* quando analisado nos diferentes biomas, isto é um indicativo da ausência de barreiras biológicas na área de distribuição analisada. Essa distribuição geográfica homogênea na região Nordeste é verificada mais nitidamente quando se observa o compartilhamento dos haplótipos entre os biomas, pois houve haplótipos compartilhados entre a Mata Atlântica e a Caatinga, bem como, haplótipos compartilhados entre Cerrado e Caatinga, no entanto, não houve compartilhamento de haplótipos entre Mata Atlântica e Cerrado, isto pode ser explicado por a Mata Atlântica ter sido representada por espécimes do leste da Paraíba, Sergipe e Pernambuco e o Cerrado pelo leste do Maranhão e oeste do Piauí, dois extremos da região Nordeste.

A AMOVA neste estudo mostrou valores de F_{ST} baixos (29,78% e 38,41%) reafirmando a ausência de estruturação das populações de *D. albiventris* nos diferentes biomas da região Nordeste, diferindo do encontrado por Sousa et al. (2012a) ao analisar populações dessa espécie no Brasil e inferir estruturação genética com dois grupos geográficos, um para o estado de Minas Gerais e outro para o estado do Rio Grande do Sul com valores de F_{ST} de 93,6% e $p = 0.000$, altamente significativo. Para a espécie de marsupial *Monodelphis domestica*, Carvalho et al. (2011) evidenciou uma estruturação populacional entre os biomas Cerrado e Caatinga com F_{ST} igual a 80,6% e 19 passos mutacionais separando essas duas populações, diferente do que foi observado no presente estudo, pois as espécies do Cerrado não mostraram estruturação em relação aos outros biomas analisados.

Os resultados dos testes de neutralidades através dos genes *Cit b* e COI para as populações de *D. albiventris* não foram significativos para o teste D de Tajima. O teste F_s de Fu para a população do Cerrado também não foi significativo, no entanto a população da Caatinga apresentou valores significantes para os dois genes e a população da Mata Atlântica

mostrou valor significativo para o gene *Cit b*. Esses testes são utilizados para testar a ausência de seleção em um conjunto de dados, se os valores forem significativos podem indicar que alguns parâmetros demográficos estão influenciando as populações, seja um decréscimo ou expansão populacional (TURCHETTO-ZOLET et al. 2013) dessa forma outros testes mais precisos necessitarão ser realizados para revelar essa instabilidade nas populações da Caatinga e da Mata Atlântica.

6. CONCLUSÕES

Através deste estudo com os marcadores moleculares mitocondriais, rRNA 16S, Citocromo *b* e COI, foi possível concluir que:

- O gênero *Didelphis* está representado no Nordeste pelos dois grupos propostos: *marsupialis* e *albiventris*;
- As espécies do grupo *marsupialis* estão presentes tanto no Cerrado do Maranhão quanto na Mata Atlântica dos estados de Alagoas e Bahia;
- Na Mata Atlântica alagoana há um indicativo de uma espécie diferente de *D. aurita* e *D. marsupialis*;
- A espécie do grupo *albiventris* (*D. albiventris*) tem uma ampla distribuição geográfica sendo encontrada nos três biomas da região Nordeste do Brasil: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica;
- As populações da espécie *D. albiventris* não apresentam sinal genético de uma estruturação populacional na região Nordeste;
- Dois grupos de *Didelphis* ocorrem simpatricamente em uma área do Cerrado maranhense, registro incomum para essas espécies;
- O registro de *D. marsupialis* e *D. albiventris* foi ampliado para novas áreas de ocorrência no Meio-Norte do Brasil (Piauí e Maranhão), ampliando suas distribuições em 221 km e 186 km, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABE, K. T. **Filogenia molecular de Gasteropelecidae (Ostariophysi: Characiformes) e estudo de suas relações com outros Characiformes**. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- AGRIZZI, J. et al. Molecular Diagnosis of Atlantic Forest Mammals Using Mitochondrial DNA Sequences: Didelphid Marsupials. **The Open Zoology Journal**, v.5, p.2-9. 2012.
- ANDRADE, L.; FELFILI, J.; VIOLATTI, L. Fitossociologia de uma área de Cerrado denso na RECOR-IBGE, Brasília-DF. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.2, p.225-240. 2002.
- ARAÚJO, J. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **BMC Research Notes** v.5, p.690. 2012.
- ASSIS, A. P. A. **Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita* (Didelphidae: Didelphimorphia): investigando a biogeografia da Floresta Atlântica**. 2011. 185f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- ASSIS, L. Cerrado em estado de alerta. Disponível em: <
<http://www.mma.gov.br/informma/item/8639-Cerrado-em-estado-de-alerta?tmpl=component&print=1>>. Acesso em: 02 mar. 2015.
- BAKER, R. J.; BRADLEY, R. D. Speciation in mammals and the genetic species concept. **Journal of Mammalogy**, v.87, n.4, p. 643–662. 2006.
- BALL, S. L. et al. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v.24, n.3, p.508–524. 2005
- BANDELT H. et al. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.37-48. 2008.
- BARRETT R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v.83, p.481–491. 2005.
- BARROS, M. C. et al. Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). **Iheringia Série Zoologia**, v.99, n.4, p.373-380. 2009.
- BATISTA, J. S. **Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada – *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855 (Pimelodidae – Siluriformes) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões**. 2001. 97f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2001.

- BESANSKY, N. J.; SEVERSON, D. W.; FERDIG, M. T. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. **Trends in Parasitology**, v.19, n.12, p.545-546. 2003.
- BEZERRA, A. M. R.; CARMIGNOTTO, A. P.; RODRIGUES, F. H. G. Small Non-Volant Mammals of an Ecotone Region between the Cerrado Hotspot and the Amazonian Rainforest, with Comments on Their Taxonomy and Distribution. **Zoological Studies** v.48, n.6, p.861-874. 2009.
- BEZERRA, K. C. et al. Anfíbios da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, MA. In: Barros, M. C. **Biodiversidade na área de proteção ambiental municipal do Inhamum**. São Luis: UEMA, 2012. cap. 5, p.85-106.
- BORISENKO, A. V. et al. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.471-479. 2008.
- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, v.82, n.4, p.960–973. 2001.
- BRITO, M. A. et al. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (*Sciaenidae*) marketed in Brazil: The case of pescada branca (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International**, v.70, p.40-46. 2015.
- BROWER, A. V. Z. Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae). **Systematics and Biodiversity**, v.4, n.2, p.127-132. 2006.
- BUENO, A. A. **Pequenos mamíferos da Mata Atlântica do Planalto Atlântico Paulista: uma avaliação da ameaça de extinção e da resposta a alterações no contexto e tamanho dos remanescentes**. 2008. 124f. Tese (Doutorado em Zoologia) Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BURK, A. et al. An Analysis of Marsupial Interordinal Relationships Based on 12S rRNA, tRNA Valine, 16S rRNA, and Cytochrome *b*. **Sequences Journal of Mammalian Evolution**, v.06, p.317-334. 1999.
- CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Tamanho corporal em populações naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.3, p.461-469. 1999.
- CÁCERES, N. C. et al. Distribuição geográfica de pequenos mamíferos não voadores nas bacias dos rios Araguaia e Paraná, região centro-sul do Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, v.98, n.2, p.173-180. 2008.

- CAMPANILI, M.; PROCHNOW, M. **Mata Atlântica – uma rede pela floresta**. Brasília: Rede de ONGs da Mata Atlântica, 2006. 334p.
- CANTOR, M. et al. Potential seed dispersal by *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) in highly disturbed environment. **Biota Neotropica**, v.10, n.2, p.45-52. 2010.
- CARAMASCHI, F. P. et al. Genetic diversity of wild populations of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia: Didelphidae), in Brazilian landscapes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.104, p.251-263. 2011.
- CARVALHO, B. A.; OLIVEIRA, L. F. B.; Mattevi M. S. Phylogeny of *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) species, with special reference to *Thylamys karimii*. **Iheringia Série Zoologia**, v.99, n.4, p.419-425. 2009.
- CARVALHO, B. A. et al. Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Journal of Mammalogy**, v.92, n.1, p.21–133. 2011.
- CASTELLETTI, C. H. M. et al. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. cap. 18, p.719-734.
- CERQUEIRA R. The distribution of *Didelphis* in South America (Poliprotodontia, Didelphidae). **Journal of Biogeography**, v.12, n.2, p.135-145. 1985.
- CERQUEIRA R.; LEMOS B. Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossum, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v.64, n.3, p.319-327. 2000.
- CERVANTES, F. A. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in México. **Mitochondrial DNA**, v.21, n.S1, p.44-50.
- CLARE, E. L. et al. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.184–190. 2006.
- 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.
- COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. Phylogeography and Systematic Notes On two species of gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* (Marsupialia: Didelphidae) From Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.116, p.275-292. 2003.
- COSTA, F. O. et al. Biological identifications through DNA Barcodes: the case of the crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, p. 272-295. 2007.

- COSTA, J. F. et al. Pequenos mamíferos não voadores de ocorrência na Área de proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias/MA. In: Barros, M. C. **Biodiversidade na área de proteção ambiental municipal do Inhamum**. São Luis: UEMA, 2012. cap. 8, p.117-130.
- COSTA, J. P. O. **Mata Atlântica: ciência, conservação e políticas workshop científico sobre a mata atlântica**. São Paulo: Conselho nacional da reserva da biosfera da Mata Atlântica, 1999. 36p.
- DIAS, I. M. G. et al. Delineating geographic boundaries of the woolly mouse opossums, *Micoureus demerarae* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Conservation Genetics** v.11, p.1579–1585. 2010.
- DURANT, P. Black-Eared Opossum *Didelphis Marsupialis* Linnaeus, 1758 From Mérida, Venezuela. **Zoocriaderos**, v.3, n.3, p.07-18. 2001.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. 2. ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997. 396p.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567. 2010.
- FARIAS, I. P. et al. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. **Journal of Molecular Evolution**, v.53, p.89–103. 2001.
- FERNANDES, P. A.; PESSÔA, V. L. S. O Cerrado e suas atividades impactantes: uma leitura sobre o garimpo, a mineração e a agricultura mecanizada. **Revista Eletrônica de Geografia**, v.3, p.7, p.19-37. 2011.
- FERREIRA, P. B.; TORRES, R. A.; GARCIA, J. E. Single nucleotide polymorphisms from cytochrome *b* gene as a useful protocol in forensic genetic against the illegal hunting of manatees: *Trichechus manatus*, *Trichechus inunguis*, *Trichechus senegalensis*, and *Dugong dugon* (Eutheria: Sirenia). **Zoologia**, v.28, n.1, p.133-138. 2011.
- FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.3, n.5, p.294-299. 1994.
- FONSECA, L. E. A. **Adaptações de *Didelphis albiventris* Lund. para o ambiente urbano**. 2003. 16f. Monografia (Graduação em Biologia), Centro Universitário de Brasília/Faculdade de Ciência da Saúde. 2003.
- FU Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.1447, p.915-925. 1997.

- GARDNER, A. L. Ed. **Mammals of South America. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats**. Chicago: Chicago University Press, 2008. v.1.
- GIARLA, T. C.; VOSS, R.S.; JANSA, S. A. Species limits and phylogenetic relationships in the didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial dna sequences and morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n.346, p.67. 2010.
- GIARLA, T. C.; JANSA, A. S. The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recente radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). **Journal of Biogeography**, doi:10.1111/jbi.12320. 2014.
- GRAIPEL, M. E.; FILHO, M. S. Reprodução e dinâmica populacional de *Didelphis aurita* Wied-Neuwied (Mammalia: Didelphimorphia) em ambiente periurbano na Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Biotemas**, v.19, n.1, p.65-73. 2006.
- GUTIÉRREZ, E. E.; JANSA, S. A.; VOSS, R. S.; Molecular Systematic of Mouse Opossums (Didelphidae: Marmosa): Assessing Species Limits using Mitochondrial DNA Sequences, with Comments on Phylogenetic Relationships and Biogeography. **American Museum of Natural History**, v.10024, n.3692, 22.p. 2010.
- HAAG, T. et al. Phylogenetic Relationships among Species of the Genus *Calomys* with Emphasis on South American Lowland Taxa. **Journal of Mammalogy**, v.88, n.3, p.769-776. 2007.
- HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genet**, v.23, n.4, p.167-72. 2007.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98. 1999.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **The Royal Society**, v.270, p.96–99. 2003.
- HEBERT, P. D. N. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.41, p.14812-14817. 2004a
- HEBERT, P. D. N. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, v.2, p.1657-1663. 2004b.
- HOFFMANN, F. G.; BAKER, R. J. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-b gene. **Journal of Mammalogy**, v.82, n.4, p.1092-1101. 2001.

- HOGG, I. D.; HEBERT, P. D. N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Canadian Journal Zoology**, v.82, p.749-754. 2004.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 03 out. 2014.
- JACQUES, G. S. **Identificação de espécies animais usando sequências de genes mitocondriais no combate aos crimes contra a fauna**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília. 2005.
- JANKE, A. et al. The Marsupial Mitochondrial Genome and the Evolution of Placental Mammals. **Genetics**, v.137, p.243-256. 1994.
- JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.11, p.1481-1490. 1998.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.147-155. 2005.
- LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; STALLINGS J. R. Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. **Journal of Tropical Ecology**, v.12, p.435-440. 1996.
- MACHADO, C. **Diferenciação molecular de duas espécies de peixes antárticos do gênero *Notothenia* (Notothenioidei: Nototheniidae) através da análise do DNA mitocondrial**. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná. 2006.
- MELO, M. D. V. C.; FURTADO, M. F. G. **Florestas Urbanas: Estudo sobre as Representações Sociais da Mata Atlântica de Dois Irmãos, na Cidade do Recife – PE**. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2006. 45p.
- MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. **Tree**, v.9, n.8, p.278-280. 1994.
- MIRANDA, G. B. **Relações filogenéticas entre espécies de roedores sul-americanos da tribo Oryzomyini analisada pelo gene citocromo *b* e IRBP**. 2007. 167f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
- MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2002. 340p.

- MÜLLER L. et al. DNA Barcoding of Sigmodontine Rodents: Identifying Wildlife Reservoirs of Zoonoses. **Plos one**, v.8, p.12. 2013.
- MURRAY, B. W. et al. The use of cytochrome b sequence variation in estimation of phylogeny in the Vireonidae. **The Condor**, v.96, p.1037-1054. 1994.
- NASCIMENTO, D. C.; COSTA, E. F.; BARROS, M. C. Caracterização molecular de *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) através do gene citocromo b para a América do Sul. In.: II SIMPÓSIO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2014, Caxias. **Resumos**. Caxias: CESC/UEMA, 2014.
- NASCIMENTO, D. C. et al. Phylogeny of *Marmosops* and the occurrence of *M. pinheiroi* (Pine, 1981) (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Cerrado Savanna of Maranhão, Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v.14, n.1, p.304-313. 2015.
- NILSSON, M. A. et al. Radiation of Extant Marsupials After the K/T Boundary: Evidence from Complete Mitochondrial Genomes. **Journal of Molecular Evolution**, v.57, p.3-12. 2003.
- OLÍMPIO, A. P. M. et al. *Wiedomys cerradensis* (Gonçalves, Almeida, Bonvicino, 2003) (Rodentia, Cricetidae): first record from the state of Maranhão, Brazil. **Mammalia**, 2015.
- PAGLIA, A. P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional Papers in Conservation Biology** 2º ed. n.6. 2012.
- PALUMBI, S. et al. **The simple fool's guide to PCR ver. 2.0**. University of Hawaii, Honolulu. 1991.
- PATTON, J. L.; COSTA, L. P. Molecular Phylogeography and Species Limits in Rainforest Didelphid Marsupials of South America. In: Jones, M.; Dickiman, C.; Archer M. eds. **Predators With Pouches: the Biology of Carnivorous Marsupials**. CSIRO Publishing, Melbourne, 21-29. 2003.
- PAVAN, S. E. D. O. **Diversidade de espécies no complexo *Monodelphis brevicaudata* (Didelphimorphia: Didelphidae), inferida por dados moleculares e morfológicos**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi. 2009.
- QUINTELA, F. M. et al. *Calomys tener* (Winge, 1887) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae): Filling gaps. **Check List**, v.10, n.3, p.650–654. 2014.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, 2007.

- RÊGO, G. M.; HOEFLICH, Y. A. **Contribuição da pesquisa florestal para um ecossistema em extinção: Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 80p.
- REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. Londrina-PR, 2006. 437p.
- ROCHA, R. G. et al. Highly conserved d-loop sequences in woolly mouse opossums *Marmosa (Micoureus)*. **Mitochondrial DNA**, v.23, n2, p.77-83. 2012.
- ROZAS. J. et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p.2496-2427. 2003.
- RUEDA, M. C.; RAMÍREZ, G. F.; OSORIO, J. H. Aproximación a la biología de la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*). **Museo de Historia Natural**, v.17, n.2, p.141-153. 2013.
- SALVADOR, C. H.; GRAIPEL, M. E.; SIMÕES-LOPES, P. C. Body size of commom opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied 1826 (Didelphimorphia: Didelphidae) on southern brazilian islands. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.2, p.311-317. 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001. Pp
- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p.5463-5468. 1977.
- SHIRAI, L. T. **Filogeografia e biogeografia da floresta atlântica: um estudo de caso com *Didelphis aurita***. 2008. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo. 2008.
- SMITH, M. F.; PATTON, J. L. The Diversification of South American murid Rodents: Evidence from mitochondrial DNA sequence data for the AkodontineTribe. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.50, p.149-177. 1993.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koog, 2008. 903p.
- SOLARI, S. A molecular perspective on the diversification of short-tailed opossums (Monodelphis: Didelphidae). **Mastozoologia Neotropical**, v.17, n.2, p.317-333. 2010.
- SOUSA, L. C. C. et al. Mitochondrial genetic variability of *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia, Didelphidae) in Brazilian localities. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.2, p.522-529. 2012a.
- SOUSA, L. C. C. et al. Molecular characterization of an opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) population in an urban fragment of the Brazilian Atlantic

- Rainforest and support to species barcode identification. **Genetics and Molecular Research**, v.11 n.3, p.2497-2496. 2012b.
- SPRINGER, M. S. et al. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep level mammalian phylogeny reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.2, p.132-143. 2001.
- 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.
- TABARELLI, M.; MELO, M. D. V. C.; LIRA, O. C. A Mata Atlântica do Nordeste. In: CAMPANILI, M.; PROCHNOW, M. **Mata Atlântica – uma rede pela floresta**. Brasília, p.149-164. 2006.
- TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. In: Araújo et al. (ed.) **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. p.47-52.
- TAJIMA, F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585-595. 1989.
- TAKEHANA, Y. et al. Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. **Zoological Science, Zoological Society of Japan**, v.20, p.1279–1291. 2003.
- TAMURA, K. et al. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729. 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustaW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680. 1994.
- TORRES, R. A. Molecular taxonomy of *Plagioscion* Heckel (Perciformes, Sciaenidae) and evidence from mtDNA RFLP markers for an invasive species in the Paraná river, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23, n.4, p.1235-1242. 2006.
- TRUJILLO, C.; ARBOLEDA, J. *Didelphis marsupialis* como um reservorio potencial u hospedeiro amplificador del virus de la estomatitis vesicular, serotipo New Jersey en Antioquia. **Iatreia** v.17, n.2, p.174-175. 2004.
- TURCHETTO-ZOLET, et al. A. C. **Guia prático para estudos filogeográficos**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. 105p.

- VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world Metatherian mammals. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.322: 177p. 2009.
- VOSS, R. S. et al. New Species of *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae) from the Pakaraima Highlands of Guyana, with Remarks on the Origin of the Endemic Pantepui Mammal Fauna. **American Museum of Natural History**, 3778: 27p. 2013.
- WALTER, B. M. T. **Fitofisionomia do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. 2006. 373f. Tese (Doutorado em Ecologia) Universidade de Brasília. 2006.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.360, n.1462, p.1847-57. 2005.
- WHITFIELD, J. B.; CAMERON S. A. Hierarchical Analysis of Variation in the Mitochondrial 16S rRNA Gene Among Hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.12, p.1728-1743. 1998.
- WOLSTENHOLME, D. R.; CLARY, D. O. Sequence evolution of drosophila mitochondrial DNA. **Genetics Society of America**, v.109, p.725-744. 1985.
- XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.7, p.1720-1728. 2013.

ANEXOS