

11

GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

Maria Paula Cruz Schneider
Cristiane Gomes Batista
Dulcinéia de Carvalho
Rui Cerqueira
Ana Yamaguishi Ciampi
Edivani Villaron Franceschinelli
Rosana Gentile
Evonildo Costa Gonçalves
Adriana Daudt Grativol
Marcelo Trindade Nascimento
Joema Rodrigues Póvoa
Giuliana Mara Patrício Vasconcelos
Lúcia Helena Wadt
Helga Correa Wiederhecker

Introdução

Em um cenário de fragmentação de habitats, populações anteriormente contínuas são subdivididas em conjuntos de populações locais menores que podem estar isoladas em maior ou menor grau, dependendo da distribuição espacial dos fragmentos e do poder de dispersão inerente às espécies. As alterações no tamanho, forma e distribuição de um habitat natural provocadas pela fragmentação, afetam a taxa de extinção e tamanho das populações locais, assim como o padrão de dispersão de indivíduos entre estas populações. Neste contexto, destacam-se dois grupos de processos: (1) os processos ecológicos, tais como eventos catastróficos, estocasticidade ambiental e demográfica, que afetam parâmetros como a reprodução, mortalidade, proporção sexual e distribuição de classes de idade¹; e (2) os processos genéticos, mediados por deriva genética e endocruzamento, que levam à perda de variabilidade genética e depressão por endocruzamento².

Esses dois processos podem operar sinergicamente provocando forte impacto na probabilidade de extinção de populações, porém, no curto prazo os processos ecológicos são de maior importância^{3,4}. Isto se deve, principalmente, às flutuações no tamanho das populações decorrentes dos processos ecológicos, que influenciam diretamente os processos genéticos, uma vez que o tamanho efetivo populacional é o principal fator relacionado às grandes mudanças na diversidade genética provocadas por deriva genética e endocruzamento.

O tamanho reduzido das populações favorece acasalamentos entre indivíduos aparentados, ou endocruzamento, processo que contribui para o aumento da similaridade genética entre os indivíduos de uma mesma população e, conseqüentemente, da proporção de loci em homozigose. A homozigose elevada favorece a expressão de alelos recessivos deletérios e diminui o valor adaptativo de *loci* codominantes, o que pode causar a diminuição da capacidade de adaptação dos indivíduos às flutuações ambientais provocadas pelos fatores bióticos e abióticos⁵.

Os efeitos de deriva genética são, primeiramente, a perda de alelos raros em uma população, levando à redução da variabilidade genética intrapopulacional e, por fim, à fixação ao acaso de alelos diferentes nas populações, resultando na diferenciação interpopulacional. Em grandes populações ou em populações menores que trocam genes via migração constante de indivíduos, os efeitos de deriva genética são negligenciáveis, porém em populações pequenas e isoladas, são fortemente pronunciados.

Em populações naturais, a perda de variabilidade genética pode ser contrabalançada pela injeção de novos alelos, via mutação e(ou) migração (fluxo gênico), no complemento gênico de diferentes populações. Porém, em um habitat fragmentado a redução do fluxo gênico entre as populações isoladas, aliada às baixas taxas de mutação, acentua a perda de variabilidade genética. Dessa forma, estes processos genéticos em habitats fragmentados reduzem a heterozigose, com conseqüente redução da viabilidade de populações locais por meio da depressão de uma série de componentes de *fitness*⁶. Assim, em longo prazo, o impacto na diversidade genética torna-se crítico, pois a mesma é a matéria prima das mudanças evolutivas que incluem adaptação e especiação^{7,8}.

Técnicas moleculares além de permitirem a identificação de efeitos da fragmentação sobre o complemento genético das populações remanescentes, também têm sido úteis em programas de manejo para conservação genética de populações. No caso de animais, têm sido recomendadas translocações de indivíduos e acasalamentos programados para ajudar as espécies ameaçadas de extinção a recuperarem a variabilidade genética perdida e(ou) fragmentada em consequência da alteração de seus habitats^{9,10,11}. O manejo genético dessas espécies geralmente se baseia em informações de *pedigree*, o que pode permitir a identificação de indivíduos cuja reprodução é essencial para a manutenção da diversidade genética.

No caso de plantas, marcadores moleculares têm sido úteis para orientar coleta de material genético com a finalidade de conservação *ex situ*; definir o tamanho mínimo de área para conservação *in situ*; descrever a organização da variação genética em populações naturais^{12,13,14}; e conhecer a magnitude da diversidade genética da espécie e das populações.

No âmbito das técnicas de biologia molecular, vários métodos diretos têm sido utilizados para a investigação da variação genética em populações naturais, tanto de animais como de vegetais. Inicialmente, a maioria das análises moleculares era baseada na detecção de polimorfismos protéicos (isoenzimas) e de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), que envolvem o uso da tecnologia de enzimas de restrição ao nível de DNA¹⁵. Com o advento da tecnologia de amplificação de fragmentos específicos de DNA por intermédio da reação em cadeia da polimerase (PCR), esses métodos evoluíram para o seqüenciamento nucleotídico direto de fragmentos de DNA nuclear e mitocondrial e, posteriormente, para a amplificação de marcadores anônimos, como os RAPDs (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e, finalmente, o uso de marcadores específicos como os microssatélites.

Cada uma dessas técnicas apresenta peculiaridades em relação ao tipo de informação, disponibilidade de marcadores e custo de implementação que determinam sua adequação aos casos estudados. A análise de isoenzimas, por exemplo, uma das primeiras técnicas moleculares disponíveis, é atualmente amplamente difundida para a avaliação da variabilidade genética e identificação de fluxo gênico entre populações, principalmente de espécies vegetais. Entretanto, apesar da vantagem de seu baixo custo relativo, a reduzida taxa de evolução, que resulta na observação de pouca variação genética, restringe seu uso em algumas espécies. Já a tecnologia de RAPD, que se baseia na amplificação de seqüências nucleotídicas aleatórias, a partir do uso de iniciadores universais, pode ser aplicada tanto em espécies vegetais como animais, gerando um grau de polimorfismo geralmente maior do que o observado pela análise isoenzimática. A principal limitação desta técnica reside na expressão dominante, onde indivíduos homocigotos não são distintos dos heterocigotos, e no anonimato destes marcadores, resultando em subestimativa da variabilidade e impossibilidade de identificação de fluxo gênico.

Atualmente, os marcadores microssatélites são os mais indicados para estudos de genética de populações, embora ainda não esteja acessível para todas as espécies, como é o caso de isoenzimas e RAPD, devido à necessidade de desenvolvimento de iniciadores específicos.

Microssatélites consistem em locos nucleares hipervariáveis, de unidades de pequenas seqüências nucleotídicas repetidas em série, que evoluem mediante a perda ou ganho destas unidades, ao invés de simples substituições de nucleotídeos¹⁶. Eles são altamente polimórficos, muito dispersos em genomas de eucariotos e possuem elevada taxa de mutação^{17,18}. Análises de freqüências alélicas dos locos microssatélites podem ser usadas para estimar parâmetros da estrutura e diversidade genética atual de populações de uma espécie, como também níveis históricos de fluxo genético entre estas populações. Assim, apesar do custo relativamente alto, os marcadores microssatélites apresentam uso muito promissor para a conservação, principalmente pelo elevado poder de detecção da variabilidade genética em espécies que são conhecidas por apresentarem baixa diversidade genética^{16,19,20,21,22}.

Considerando a adequação de cada uma dessas técnicas, análises nelas baseadas ajudam no cálculo do tamanho efetivo de populações para conservação *in situ* no longo prazo. Informações desse tipo são extremamente úteis para definição de estratégias que orientem a implementação de áreas prioritárias para conservação, além de auxiliar programas de manejo para conservação de espécies ameaçadas de extinção. Seguindo a estrutura genético-populacional ao longo do tempo, também podem ser estimados os níveis de diversidade genética desejáveis para assegurar a viabilidade no longo prazo e o potencial evolutivo de uma espécie.

1. Estudo de casos

1.1. Anfíbios - o caso do sapo-cachorro (*Physalaemus cuvieri*)

Anfíbios são considerados bons indicadores ambientais, pois, em geral, as espécies dependem tanto do meio aquático quanto do terrestre no seu ciclo de vida. Apesar desta dependência, muitas espécies, como o sapo-cachorro, são resistentes às modificações ambientais, podendo manter grandes populações em ambientes intensamente alterados pelo homem. Esta espécie é um dos anfíbios mais comuns do Cerrado, possuindo ampla distribuição e alta densidade nas áreas abertas. Apesar de ser uma espécie tolerante às modificações no ambiente, devido à acelerada ocupação das áreas de Cerrado, muitas de suas populações encontram-se isoladas em pequenos fragmentos causando impactos na dinâmica natural.

Durante o Projeto Cerrado, a comparação entre populações de fragmentos antigos de Cerrado, isolados há cerca de 4.000 anos pela floresta tropical em Vilhena – Rondônia, com fragmentos recentes (cerca de 40 anos), isolados antropicamente na região do Distrito Federal, mostraram os efeitos da fragmentação no longo prazo sobre as populações de sapo-cachorro²³. A utilização de fragmentos de tamanhos diferentes dentro de cada região (menor que 500ha, de 1.000 a 3.000ha e de 10.000 a 15.000ha), também permitiu a identificação da interação entre idade e tamanho dos fragmentos. Os padrões revelados por RAPD nestas populações demonstraram uma variação genética de 12% entre as regiões, enquanto cerca de 85% da variação é conferida à diferenciação

individual e cerca de 3% é resultante das diferenças entre as populações dos fragmentos. Isso representa uma variação dentro das populações maior do que a variação conferida pela fragmentação ou pela separação geográfica.

A baixa divergência entre as regiões significa que o efeito do tempo, por si só, não gerou diferenças significativas entre as populações. Nos fragmentos recentes houve diferentes valores de diversidade genética, mas estes não foram correlacionados com o tamanho dos fragmentos, ao contrário do observado nos fragmentos mais antigos onde foi observada uma forte correlação entre estes parâmetros (Figura 1). Em todos os fragmentos recentes, a diversidade total foi elevada, mas entre os antigos observou-se uma grande redução, principalmente nas áreas menores do que 1.000ha. Desta forma, fica evidente o comprometimento da manutenção da variabilidade genética em fragmentos pequenos ao longo do tempo. Ao extrapolar estes resultados para outras espécies do Cerrado, a conclusão é preocupante, pois mesmo uma espécie que mantém alta densidade populacional, como o sapo-cachorro, apresentou redução acentuada provavelmente devido à fragmentação do habitat. Como muitas espécies de anfíbios do Cerrado são mais especializadas por habitat e menos resistentes aos impactos humanos, provavelmente estas estarão muito mais suscetíveis à perda de variabilidade genética e ao risco de extinção.

Embora não tenha sido detectada perda de variabilidade genética nos fragmentos recentes, isto não significa que a fragmentação não posua efeito neste caso. Apesar de manter inicialmente uma diversidade genética elevada, não há garantias de que esta será mantida ao longo do tempo. As restrições espaciais, tanto no tamanho como no isolamento, geradas pela fragmentação no decorrer do tempo, favorecem a ocorrência de efeitos corrosivos na diversidade genética, como a endogamia. Isto, provavelmente, é a causa da redução de diversidade encontrada nos fragmentos antigos, servindo como uma projeção para as possíveis conseqüências nas populações de sapo-cachorro recentemente isoladas.

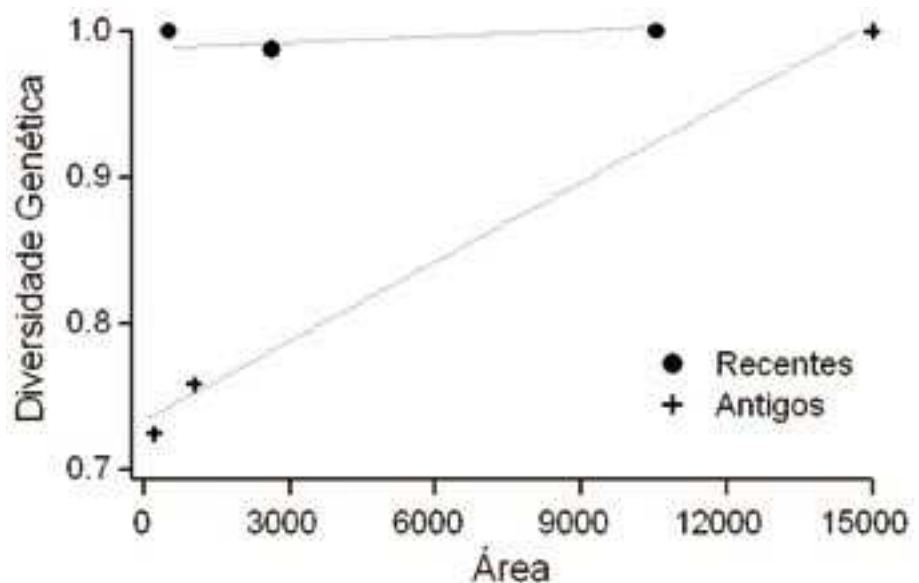


Fig.1 Distribuição da diversidade genética total (H_t) de populações de *Physalaemus cuvieri* encontradas em fragmentos antigos de Cerrado (4000 anos) localizados em Vilhena, RO e em fragmentos recentes (cerca de 40 anos) no Distrito Federal.

O extenso prazo de isolamento juntamente com a redução da área do fragmento, acarreta a perda significativa de variabilidade genética, mesmo no caso de uma espécie generalista, de ampla distribuição e com alta densidade populacional como o sapo-cachorro. Desta forma, é importante enfatizar que, mesmo que não imediatamente, as populações isoladas correm o risco de perder variabilidade genética. Portanto, o tamanho das áreas preservadas deve ser suficiente para conservar a variabilidade genética das espécies que, no presente caso, se mostrou reduzida em fragmentos de 1.000ha ou menos. Sendo assim, é necessário se prever dentro dos planos de ocupação, medidas para se evitar o total isolamento entre os fragmentos pequenos, reduzindo a separação das populações, pois a maioria das espécies é mais vulnerável que a estudada e, provavelmente, mais sensível à fragmentação.

1.2. Aves Migratórias - o caso do maçarico-rasteirinho (*Calidris pusilla*)

Superada apenas pelo Suriname, a costa norte do Brasil entre o Maranhão e o Amapá, é a segunda área mais importante na América do Sul para aves limícolas migratórias intercontinentais que se deslocam, anualmente, em períodos específicos, das suas áreas de reprodução no Canadá e Alasca para as áreas de invernada nas Américas Central e do Sul.

Informações de morfometria associadas a sexagem molecular²⁴ sugerem que os maçaricos-rasteirinhos no norte do Brasil constituem uma população homogênea com origem reprodutiva no leste do Ártico canadense. Estes dados foram de fundamental importância para o delineamento das rotas seguidas por estas populações durante o ciclo migratório anual, porém não esclareceram muito acerca de sua estrutura genética.

O conhecimento da estrutura genética e dinâmica populacional no ciclo migratório anual dessas aves é de fundamental importância para a indicação de áreas prioritárias para a conservação e o estabelecimento de estratégias de manejo, com o objetivo de minimizar os efeitos negativos da fragmentação antrópica em áreas costeiras, importantes não só para as aves migratórias, mas para as comunidades biológicas em geral. Com esta finalidade, foram desenvolvidas análises genéticas utilizando-se como ferramenta o seqüenciamento nucleotídico de um fragmento do íntron 7 do gene nuclear b-fibrinogênio, um marcador nuclear que apresenta variação nucleotídica comparável àquela de genes mitocondriais como, por exemplo, o *citocromo b*.

As 61 seqüências obtidas resultaram em 44 haplótipos compartilhados entre as populações dos sítios de invernada da costa norte brasileira (Amapá, Pará e Maranhão) e os indivíduos amostrados na Baía de Delaware, New Jersey, U.S.A., durante a migração de retorno ao hemisfério norte. A análise da variação nucleotídica revelou elevados índices de variabilidade genética dentro das populações (Tabela 1) e ausência de diferenciação genética interpopulacional (Tabela 2).

Tabela 1. Variação genética do íntron 7 do gene nuclear b-fibrinogênio para populações do maçarico-rasteirinho.

	Diversidade nucleotídica			Diversidade haplotípica (gênica)	
	n	p	q*	NHap	h (DP)
Todos	61	0,0046	0,0046	44	0,97 (0,012)
Amapá	11	0,0041	0,0041	11	1,00 (0,039)
Pará	17	0,0045	0,0045	14	0,97 (0,032)
Ilha de Maiaú, MA	24	0,0045	0,0045	16	0,95 (0,029)
Panaquatira, MA	05	0,0074	0,0074	05	1,00 (0,126)
Baía Delaware	04	0,0046	0,0046	04	1,00 (0,177)

Tamanho da amostra (n), número de haplótipos (NHap), Desvio Padrão (DP)

* Modelo de sítios finitos

Tabela 2. Estimativas de Nst (diferenciação genética) entre populações do maçarico-rasteirinho.

	Amapá	Pará	Ilha de Maiaú	Panaquatira
Amapá				
Pará	0,013			
Ilha de Maiaú, MA	0,012	0,041		
Panaquatira, MA	-0,037	-0,025	-0,069	
Baía Delaware	-0,045	0,005	-0,044	-0,05

A presença de haplótipos iguais nas diferentes regiões analisadas evidencia uma homogeneidade das populações do maçarico-rasteirinho no norte do Brasil e, corroborando os dados de morfometria e sexagem molecular²⁴, explica a ausência de diferenciação genética entre elas. A similaridade genética entre as aves da Baía de Delaware e da costa norte brasileira é consistente em indicar aquela região como um ponto de parada e reposição energética durante a migração de retorno das aves da costa norte brasileira para a área de reprodução no Ártico.

Em se tratando de espécies migratórias, os efeitos da fragmentação de habitat são muito mais intensos quando esta ocorre em mais de um dos habitats que compõem uma rota de migração e são mais facilmente identificados nas áreas reprodutivas de populações homogêneas geneticamente. O mascaramento de efeitos em alguns habitats deve-se, provavelmente, à mistura de populações de regiões reprodutivas distintas e com diversos graus de diferenciação genética. Este não é o caso dos maçaricos-rasteirinhos na costa norte brasileira, assim, os elevados índices de variabilidade genética associados à reduzida diferenciação genética entre as populações, não sugerem fortes efeitos de fragmentação na costa norte brasileira.

Embora a variação genética das populações do maçarico-rasteirinho no norte do Brasil possa ainda não estar apresentando os efeitos genéticos decorrentes de distúrbios e da fragmentação de habitat, dados de censos aéreos na Baía de Delaware²⁵, mostram que o número de aves limícolas, incluindo o maçarico-rasteirinho, que pousam naquele sítio de parada para reposição de energia, vem declinando de forma con-

siderável nos últimos cinco anos. Isto se deve, provavelmente, à ação humana nas áreas de internada no Hemisfério Sul, onde as aves estão mais susceptíveis aos distúrbios e fragmentação, pois nelas passam a maior parte do tempo – cerca de 10 meses por ano.

Estas observações sugerem que as áreas costeiras visitadas pelas aves migratórias no norte do Brasil devem ser preservadas antes que os efeitos no tamanho efetivo populacional possam influenciar os processos genéticos, bem como os efeitos de deriva genética e de endocruzamento possam, no longo prazo, restringir a viabilidade das populações do maçarico-rasteirinho que invernam naquelas áreas. Além disso, as áreas costeiras estudadas, são habitats importantes para outras espécies migratórias intercontinentais, e também para algumas espécies brasileiras, que fazem pequenas migrações entre o litoral e o interior. Desta forma, a proteção dessas áreas favorecerá não somente as populações do maçarico-rasteirinho, como também outras populações de aves que, talvez, já estejam com sua viabilidade comprometida devido aos distúrbios resultantes das atividades humanas.

1.3. Mamíferos - o caso do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*)

O mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), espécie em perigo de extinção, é um primata endêmico da Mata Atlântica. Historicamente, a espécie ocorria em todo litoral do Estado do Rio de Janeiro, em altitudes inferiores a 300m²⁶. Atualmente, sua distribuição está restrita a sete municípios da região dos lagos e baixadas costeiras: Silva Jardim, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras, Cabo Frio, Armação dos Búzios, Saquarema e Rio Bonito, este último contido na região metropolitana do Rio de Janeiro. As áreas protegidas onde a espécie ocorre são as Reservas Biológicas de Poço das Antas (PdA), Silva Jardim, RJ, Reserva Biológica União, Casimiro de Abreu e Rio das Ostras, RJ, ambas sob a administração do IBAMA; Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá; Parque Municipal do Mico-Leão-Dourado* e, em mais de uma dezena de RPPNs – Reservas Particulares do Patrimônio Natural.

Todas as populações estão isoladas em pequenos fragmentos de Mata Atlântica de Baixada Costeira, sendo a população de Poço das Antas original daquela área; a da REBIO União oriunda do repovoamento com uma população de micos translocados e, aquelas localizadas nas RPPNs e em outros fragmentos privados, provenientes da reintrodução de micos nascidos em cativeiro. Estudos realizados em 1994 demonstraram que, à exceção da população de Poço das Antas e áreas contíguas, nenhuma das outras possuía tamanho efetivo para prevenir eventual extinção¹⁰, mas as três populações – Poço das Antas, União e áreas particulares, mostraram 100% de probabilidade de extinção em poucos anos, usando simulações pelo programa Vortex¹⁰.

A avaliação da variabilidade genética das populações de Poço das Antas e outros três fragmentos pequenos resultou em: (1) uma correlação positiva entre a variabilidade genética intrapopulacional e o tamanho dos fragmentos de Mata Atlântica; (2) uma acentuada

* A Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, RJ, criada pela FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente em 1994, não foi implantada e as áreas privadas não foram desapropriadas. Localiza-se dentro da APA Estadual de Massambaba. Na mesma situação encontra-se o Parque Municipal do Mico-Leão-Dourado, Cabo Frio, RJ, criado em 1997 e até hoje não implantado. Além dessas áreas protegidas, em julho de 2002, foi decretada pelo Governo Federal a APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, abrangendo terras de seis municípios da Região dos Lagos (N. da E.).

estrutura genética das populações analisadas (PdA e cinco grupos isolados que foram translocados para REBIO União), com uma diferenciação média de 31% e, (3) uma correlação positiva entre a variabilidade genética interpopulacional e a distância entre os fragmentos, seguindo o modelo de fluxo gênico de isolamento por distância. Esses resultados indicam que a diversidade genética do mico-leão-dourado tem sido perdida especialmente nas populações menores, isto é, quanto menor a população, menor também a diversidade genética encontrada. Com o segundo resultado pode-se acrescentar que a diversidade genética encontrada não está homogeneamente distribuída entre as populações, indicando a restrição do fluxo gênico entre estas. A troca de informação genética entre indivíduos de diferentes populações é muito menos freqüente do que entre indivíduos de uma mesma população. Além disso, a estrutura genética encontrada tem correlação com a distância entre as populações, onde quanto mais distante as populações, maior a divergência genética entre elas.

Os dois primeiros resultados podem ser interpretados como uma conseqüência direta dos distúrbios na variabilidade genética das populações locais atuais, causados pela fragmentação da Mata Atlântica. Entretanto, o terceiro resultado pode ser explicado por, pelo menos, dois cenários diferentes: (1) uma população original panmítica (população com a diversidade genética homogeneamente distribuída) que sofreu distúrbios em algum ponto pela fragmentação da Mata Atlântica, ou (2) uma população estruturada geneticamente antes da fragmentação da Mata Atlântica. Estes dois cenários não podem ser discriminados com os dados analisados até o momento. Para prosseguir com as análises, é necessário que se use técnicas de DNA antigo (*ancient DNA*) que permitam comparar a variabilidade genética dos micos-leões-dourados antes (amostras de museus) e depois (amostras atuais) da fragmentação da Mata Atlântica.

Informações esclarecendo se as populações de micos-leões-dourados se comportavam de forma panmítica, ou não, quando as florestas eram contínuas, e quanto da variabilidade genética foi perdida ao longo do processo de fragmentação da Mata Atlântica, serão de grande importância para a conservação dessa espécie. Estratégias de conservação eficientes para espécies bandeira como o mico-leão-dourado, podem contribuir para a conservação dos biomas que habitam, nesse caso, a Mata Atlântica. Os dados genéticos analisados para o mico-leão-dourado até o momento¹¹, sugerem que o modelo de metapopulação é o indicado para o manejo genético da espécie. Entretanto, considerando-se que as populações analisadas sofreram distúrbios decorrentes da fragmentação, podendo não representar a condição original para a espécie, seria precipitado adotar esse modelo como uma estratégia de conservação. Portanto, é preciso esclarecer se a estrutura genética das populações atuais é uma característica que já existia antes da fragmentação, ou se é resultado da fragmentação recente da Mata Atlântica.

Além disto, mesmo as populações muito pequenas, antes consideradas inviáveis, são importantíssimas para o manejo genético dessa espécie e merecem a mesma atenção que as populações maiores. A presença de alelos privados nessas pequenas populações faz com que o benefício de preservá-las seja maior que o seu custo, considerando-se que essas populações incrementam a diversidade genética já tão depauperada dessa espécie.

Essa pesquisa vem mostrar dois aspectos importantes da proteção de fragmentos da Mata Atlântica: (1) o tamanho do fragmento nem sempre é um bom indicativo de sua importância para a conservação; fragmentos muito pequenos, antes considerados inviáveis, podem ser de extrema importância para a conservação de uma espécie, como no caso do mico-leão-dourado; (2) assegurar a proteção de áreas por meio de unidades de conservação, sejam Reservas Biológicas, RPPNs, Refúgios de Fauna e outras, é de extrema importância para a conservação de uma espécie. No caso do mico-leão-dourado, o manejo genético das pequenas populações, que requer o isolamento destas em relação à população da Reserva Biológica de Poço das Antas, tem sido possível devido à criação de uma outra reserva - a Reserva Biológica União, em 1998, e também, pela colaboração de inúmeros proprietários rurais que participam dos esforços de reintrodução, permitindo a soltura de micos-leões provenientes de zoológicos em suas florestas, muitas delas transformadas em RPPNs.

1.4. Mamíferos - o caso do gambá (*Didelphis aurita*)

O gambá (*Didelphis aurita*), uma das espécies de mamíferos mais frequentes na Mata Atlântica, é generalista em relação ao habitat e à alimentação²⁷ podendo ser encontrada mesmo em quintais de metrópoles como o Rio de Janeiro. Sua grande capacidade de deslocamento²⁸ aliada às características acima, faz com que seja esperado uma baixa suscetibilidade desta espécie aos efeitos da fragmentação, quando comparada a outras. Vários aspectos ecológicos e genéticos desta espécie já foram estudados, entretanto, a integração do comportamento e da estrutura genética populacional ainda é pouco entendida. A dinâmica populacional do gambá foi avaliada em relação ao grau de variabilidade genética dentro e entre populações numa escala regional, identificando o tipo de estrutura populacional da espécie e a relação entre distância genética e distância geográfica.

A comparação entre oito populações da Serra dos Órgãos e arredores, no Estado do Rio de Janeiro, foi realizada utilizando-se cinco marcadores microssatélites. As populações estudadas foram consideradas geneticamente distintas no conjunto, entretanto, apresentando um nível baixo de diferenciação, pois nenhuma população estava totalmente isolada da outra na escala geográfica amostrada. A migração foi um fator de extrema importância no grau de variação genética encontrado, havendo correlação entre distância genética e geográfica. A espécie seguiu um modelo de estrutura populacional de paisagem contínua, formada por manchas de ambiente heterogêneo, onde os centros populacionais não são permanentes, mas persiste regionalmente formando uma metapopulação com populações constituídas por *demes* ou subpopulações.

Os microssatélites foram bastante sensíveis para detectar diferenciação entre as populações estudadas, mas estudos abrangendo toda a área de distribuição da espécie devem ser realizados visando melhor compreensão de como estes marcadores se comportam. O direcionamento futuro de problemas referentes à manutenção da variabilidade genética para a conservação de populações naturais depende de análises envolvendo abordagens genética e demográfica em conjunção, uma vez que os fatores demográficos, ambientais e genéticos contribuem para a viabilidade de populações ou espécies, e a manutenção de níveis

adequados de diversidade genética dentro e entre populações, é um dos aspectos mais importantes a ser considerado em programas de conservação. Este tipo de análise pode servir de base para se testar processos relacionados à extinção, além de ser uma sugestão metodológica para se avaliar os efeitos dos distúrbios antrópicos sobre as populações. Com isso, é possível testar resultados e modelos ecológicos utilizando-se marcadores moleculares como ferramenta em estudos de ecologia de populações e, a partir disto, discutir os modelos ecológicos.

1.5. Espécies arbóreas

A definição de indicadores eficientes para o estabelecimento de áreas protegidas com o objetivo de conservação genética, ainda constitui um problema. Neste sentido, têm sido indicadas espécies arbóreas consideradas raras, isto é, espécies nas quais seus indivíduos ocorrem naturalmente em baixa densidade. Ao se definir estratégias de conservação para espécies arbóreas raras, acredita-se estar propiciando também a conservação de espécies arbóreas abundantes e comuns. Quatro projetos foram implementados com objetivo de estabelecer estratégias para conservação e(ou) restauração mediante estudos interdisciplinares: Estratégias para conservação e manejo da biodiversidade em fragmentos de florestas semidecíduas (Projeto Mata Seca); Estudos de conservação e recuperação dos fragmentos florestais da APA Camanducaia (Projeto Camanducaia); Efeito do processo de fragmentação florestal na sustentabilidade de alguns ecossistemas periféricos aos eixos rodoviários no sudeste acreano (Projeto Sudeste Acreano) e, Conservação, manejo e restauração de fragmentos de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro: mamíferos como táxon focal para a formulação de estratégias (projeto Poço da Antas). Com uso de marcadores foram estudadas as estruturas genéticas, isoenzimáticos e de DNA, das populações naturais em fragmentos florestais das seguintes espécies: cedro da Amazônia (*Cedrela aff. odorata*), cedro (*Cedrela fissilis*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), cambuí (*Myrciaria floribunda*), guanandi (*Shymphonia globulifera*) e o ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*). Os principais objetivos foram quantificar os níveis de diversidade genética dentro e entre populações naturais destas espécies, obter informações sobre o sistema reprodutivo, estimar as taxas de cruzamento nas diferentes populações e calcular o número efetivo para cada população.

1.5.1. O caso da copaíba (*Copaifera langsdorffii*)

Populações naturais de copaíba, espécie arbórea comumente encontrada no Brasil, foram estudadas por meio marcadores isoenzimáticos. Foram avaliadas três populações naturais localizadas no município de Lavras, duas (Cerrado - C e Mata Semidecidual - SD) no campus da Universidade Federal de Lavras e, a terceira (Mata Ciliar - MC) em uma área de preservação permanente entre os municípios de Lavras e Itumirim, no sul de Minas Gerais. Um elevado grau de polimorfismo foi observado em todas as populações estudadas, resultando provavelmente na tendência ao excesso de heterozigotos nas progênes da MC, porém, para os adultos observou-se evidência de endogamia (Tabela 3). Embora estes resultados não sejam comuns para espécies arbóreas, é provável que nas

Tabela 3. Estimativas de diversidade e estrutura genética em populações de espécies arbóreas de habitats fragmentados.

Espécies / fragmento	Marcaador	Tamanho (ha)	H _o	H _e	H _e	P (%)	A	f	F	F _{ST}	Nm
Copaíba - MG									0,13/-0,033	0,142/0,162	0,032
Cerrado	isoenzimas	3,2	0,321	0,420		81,8	2,5				1,51
Mata semidecidual		5,83	0,421	0,435		87,5	2,4				
Capivari		14	0,48/0,39	0,39/0,37		72,7/75,0	2,2/2,5				
Cedro - MG									-0,09/-0,213	0,03/0,013	3,63
Lagoo	isoenzimas	4	0,46/0,52	0,36/0,37		38,46/92,31	1,86/2,46				8,08
Galego		77	0,42/0,39	0,36/0,31		53,85/84,62	2,76/2,54				
Capivari		14	0,39/0,35	0,42/0,29		53,85/84,62	2,71/2,08				
Cedro - GO								0,343	0,371	0,042	5,7
1		24,5	0,795	0,555			9,5				
2		26,5	0,858	0,545			10,0				
3	microsatélites	22,7	0,809	0,467			8,2				
4		24,5	0,860	0,542			9,0				
5		15,25	0,794	0,659			7,5				
Cedro - AC									0,134	0,022	11,11
Pasto	microsatélites	19	0,736	0,634			11,75	0,119			
Mata		56	0,773	0,866			14,50	0,109			
Ipê amarelo - AC									0,336	0,079	2,91
Pasto	isoenzimas	19	0,389	0,600			2,80	0,360			
Mata		56	0,417	0,504			2,80	0,179			
Cambuí - MG									0,1371	0,0555	4,25
Frag. grande - A1		5810	0,386	0,385		85,71	2,14				
Frag. grande - A2		5810	0,347	0,404		85,71	2,14				
Frag. Pequeno 1	isoenzimas	18	0,288	0,350		85,71	2,00				
Frag. Pequeno 2		10	0,332	0,324		85,71	2,00				
Guanandi - RJ										0,17	1,19
REBIO Poço 1		9	0,658	0,708		100	4,7				
REBIO Poço 2		17	0,700	0,667		100	5,0				
REBIO Poço 3	microsatélites	70	0,567	0,611		100	4,3				
REBIO União		20	0,567	0,616		100	4,0				

Ho: heteroziguidade esperada, He: heteroziguidade esperada, P (%): número de locos polimórficos, A: número médio de alelos por locos, f: adultos/progênes, F: coeficiente de endogamia de todas as plantas, FST: divergência genética entre as populações, Nm: número de migrantes.

populações avaliadas haja favorecimento dos indivíduos endogâmicos.
Uma baixa divergência genética foi observada entre as populações

C e SD, enquanto que aquela observada entre a população MC e as demais, foi relativamente mais alta, demonstrando uma correlação entre a distância geográfica e a divergência genética.

A observação de uma elevada taxa média de cruzamento indicou que essa espécie é de reprodução mista predominantemente alógama. Para o conjunto das populações observou-se uma baixa estimativa de fluxo gênico, sugerindo que há pouca troca de material genético, ao contrário do observado entre as populações C e SD, o que sugere um fluxo gênico suficiente para prevenir a diferenciação genética entre elas.

1.5.2. O caso do cedro (*Cedrela fissilis*)

Populações naturais de cedro, espécie arbórea rara de ampla distribuição, foram estudadas por meio de marcadores isoenzimáticos e microssatélites. Foram avaliadas populações em duas regiões distintas no sul de Minas Gerais (três populações) e no vale do Paranã, em Goiás (cinco populações).

Na região de Minas Gerais, o polimorfismo foi relativamente baixo nos adultos e elevado nas progênies (Tabela 3). De maneira geral, foi observada uma elevada diversidade genética dentro das populações além de sua manutenção ao longo das gerações. No entanto, avaliando-se as populações individualmente, observou-se que aquela do fragmento de menor área (5ha) apresentou características peculiares, evidenciando uma baixa diversidade genética dos indivíduos adultos, porém, diversidade genética semelhante às demais para as progênies. Como no caso da copaíba, a alta taxa de cruzamento média indica que a espécie é de reprodução mista predominantemente alógama.

De modo geral foi observada uma correlação entre distância genética e geográfica para os diferentes fragmentos. Contudo, o fragmento mais isolado apresentou similaridade genética com um fragmento da mata ciliar da mesma bacia, ao contrário dos demais, onde um baixo índice de distância genética entre eles foi observado (Tabela 3). O tamanho efetivo estimado para as populações a partir dos adultos, foi ligeiramente superior ao tamanho real, mostrando um possível comprometimento da manutenção genética da espécie nos fragmentos.

Nas populações amostradas na região do vale do Paranã foram observados elevados índices de polimorfismo e coeficientes de endogamia (Tabela 3). A diferenciação genética entre as populações, embora baixa, foi significativa. Estes resultados diferem dos encontrados em Minas Gerais, onde não foi observada endogamia.

1.5.3. O caso do cedro da Amazônia (*Cedrela* aff. *odorata*)

Duas populações de cedro da Amazônia, espécie arbórea comum, foram estudadas por meio de marcadores microssatélites, sendo um fragmento de área de floresta primária (Reserva Florestal do Catuaba) e outro de pastagem, no Estado do Acre.

O número de alelos foi maior no fragmento florestal do que na pastagem, sendo observados alguns alelos exclusivos ao fragmento (Tabela 3). A diferença genética entre as populações foi baixa, porém significativa. As estimativas de endogamia também foram baixas, mas significativas indicando a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados ou autofecundação (Tabela 3).

1.5.4. O caso do ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*)

Duas populações de ipê amarelo, espécie arbórea rara na Amazônia Ocidental, foram estudadas por meio de marcadores isoenzimáticos, sendo um fragmento de floresta primária (Reserva Florestal do Catuaba) e outro de pastagem, no Acre.

O número médio de alelos foi igual nas populações, no entanto, foi observada maior diversidade genética na pastagem (Tabela 3). As estimativas de diversidade mostraram que houve diferenciação genética entre as populações (Tabela 3). Também se observou endogamia nas populações, sendo que na pastagem ocorreu maior proporção de cruzamentos endogâmicos.

1.5.5. O caso do cambuí (*Myrciaria floribunda*)

Quatro populações naturais de cambuí, espécie arbórea comumente encontrada em florestas altimontanas, foram estudadas por meio de marcadores isoenzimáticos. Duas populações encontram-se num fragmento grande e as outras duas, em pequenos. As populações dos fragmentos pequenos apresentaram um menor número de alelos e de heterozigotos, demonstrando uma menor diversidade genética. Apesar do polimorfismo ter sido igual para as quatro populações, observou-se a perda de um alelo nos fragmentos de menor área (Tabela 3). As quatro populações apresentaram semelhança genética (Tabela 3), provavelmente devido ao curto espaço de tempo decorrido desde a fragmentação da área.

1.5.6. O caso do guanandi (*Shymphonia globulifera*)

Para o caso do guanandi, espécie arbórea comum que ocorre em ambientes periodicamente inundados da Mata Atlântica de baixada, quatro populações naturais, sendo três localizadas na REBIO Poço das Antas e uma na REBIO União, Estado do Rio de Janeiro, foram avaliadas por meio de marcadores microssatélites.

Uma diversidade genética semelhante foi observada em todas populações estudadas, porém o número médio de alelos na população da REBIO União foi inferior ao encontrado nas demais populações (Tabela 3). Não houve diferença genética entre as três populações da REBIO Poço das Antas (Tabela 3), porém estas foram distintas da população da REBIO União. A análise do fluxo gênico entre pares de populações demonstrou que não existem problemas na troca de material genético entre as populações mais próximas, mas entre estas e a REBIO União observou-se um fluxo gênico muito baixo, provavelmente devido à distância geográfica entre elas (30km), o que pode explicar a diferenciação entre esses dois fragmentos.

No caso das espécies arbóreas, os resultados permitem algumas inferências sobre as conseqüências genéticas da fragmentação florestal em populações naturais de espécies arbóreas, tais como: mudança no comportamento reprodutivo; perda de diversidade genética em função do tamanho e isolamento dos fragmentos e; isolamento genético devido à diminuição do fluxo gênico.

Ao longo de várias gerações, as conseqüências da fragmentação podem ocasionar a perda de informações genéticas importantes para a readaptação em casos de distúrbios ambientais, o que pode resultar até na extinção local de espécies. Medidas que promovam tanto a recupera-

ção como a conectividade de fragmentos florestais, podem diminuir as perdas genéticas. No estudo do cedro, observou-se perda de diversidade genética devido, provavelmente, ao reduzido tamanho do fragmento e baixo número de indivíduos. No entanto, avaliando-se as progênies dessas plantas, constatou-se a presença de potencial genético para sua recuperação e, para que isso ocorra, são necessárias intervenções que propiciem a sua regeneração como, por exemplo, impedir a entrada de gado nos fragmentos.

Os resultados apontam para uma maior eficiência na conservação genética de populações de espécies arbóreas quando grandes áreas são delimitadas e protegidas. Onde isso não for possível, deve ser priorizada a conservação de vários fragmentos que propiciem certa conectividade. Para o cedro, no caso de Minas Gerais, a área mínima estimada para conservação *in situ* foi de 260ha.

2. Considerações finais

Independente do grupo taxonômico, de maneira geral, os casos aqui estudados ilustram alguns efeitos da fragmentação de habitats na genética populacional: 1) a perda da variabilidade genética e, conseqüentemente, do poder adaptativo (*fitness*) da população; 2) a alteração no modo de reprodução da espécie, podendo ocasionar mudanças genéticas nos novos indivíduos gerados e, 3) aumento das diferenças genéticas entre as populações remanescentes. Entre estes efeitos, o mais preocupante é a perda de variabilidade genética que possibilita a adaptação às variações ambientais e condições de *stress*, pois neste caso a extinção é mais eminente.

Considerando os eventos ecológicos e demográficos, várias são as características das áreas remanescentes que podem influenciar a intensidade do impacto da fragmentação, por exemplo: tempo de isolamento (ou idade do fragmento), tipo de matriz (grau de isolamento) e tamanho do fragmento (área). Uma matriz pouco permeável aumenta o isolamento entre os fragmentos, contribuindo para a divergência entre populações. Paralelamente, a área do fragmento influencia principalmente o tamanho populacional, ou mesmo a densidade de indivíduos. Em populações pequenas e isoladas, a possibilidade aleatória de um indivíduo encontrar um parceiro não-aparentado é reduzida, e isto causa um aumento da homozigose na população.

Todos estes efeitos são cumulativos e mais acentuados com o passar do tempo. Os efeitos da endogamia só são perceptíveis após o reflexo dos atributos genéticos nos aspectos morfológico, comportamental ou ecológico da espécie, e isto somente ocorre quando a diversidade genética já se encontra comprometida por um lento processo de fixação de alelos, proporcional ao ciclo de vida e o tempo de geração da espécie. Ainda, a pequena diferenciação genética entre populações de diferentes fragmentos, pode não significar elevados índices de fluxo gênico, mas sim, que a fragmentação tenha ocorrido num período de tempo relativamente curto para que a diferenciação já possa ser detectada²⁹. Isso aponta para a necessidade de estudos de longo prazo, pois os efeitos da fragmentação na diversidade genética de qualquer espécie não podem

ser detectados imediatamente, como evidenciados nos casos dos anfíbios e das aves migratórias.

O sistema social das espécies também pode incrementar os efeitos da fragmentação. Numa espécie que possui uma razão sexual muito desproporcional, configurada na poliandria ou na poligenia, o número efetivo populacional é inferior ao mensurável pelo número de indivíduos, pois o conjunto genético a ser passado para as próximas gerações fica concentrado nos poucos indivíduos reprodutivos. Além disso, a sobreposição de gerações aumenta a ocorrência de endocruzamento. Já a habilidade de dispersão influencia a facilidade de transpor algumas matrizes. Em geral, as espécies menos dispersoras são aquelas mais especializadas em determinados habitats, que dependem de condições mais restritas e que possuem uma relação muito estreita com o nicho que ocupam. Antagonicamente, as espécies generalistas não encontram problemas para ocupar ambientes modificados ou diferentes como os das matrizes, e migram por elas com maior facilidade.

Em suma, os efeitos da fragmentação de habitat nos padrões de diversidade genética das populações, ainda são de difícil predição, pois um complexo de fatores contribui diretamente e, ainda, interagem indiretamente para influenciar os processos microevolutivos numa população local que, em última análise, define a estrutura genética de metapopulações. Estes fatores relacionam-se amplamente tanto à demografia da espécie (densidade, sensibilidade de parâmetros demográficos às variações ambientais e habilidade de dispersão) quanto à estrutura da paisagem na qual a espécie reside (quantidade de habitat presente, sua configuração e estabilidade temporal). Isto reforça a necessidade de se avaliar caso a caso as conseqüências genéticas da fragmentação, reduzindo assim os prejuízos genéticos irreversíveis.

3. Recomendações

- a. Incluir a variabilidade genética como um componente importante em questões relacionadas à conservação da biodiversidade.
- b. Considerar a manutenção de variabilidade genética como um dos objetivos em planos de manejo, na delimitação de Unidades de Conservação e em estudos de impacto ambiental.
- c. Potencializar o uso das ferramentas moleculares em questões ambientais, consolidando um banco de dados nacional com informações sobre a variabilidade genética de espécies raras e(ou) de grande distribuição e(ou) exploradas economicamente.
- d. Desenvolver e incentivar unidades de pesquisa básica em genética de populações voltadas para a conservação da biodiversidade das espécies nacionais.
- e. Reforçar políticas para conservação *in situ* e *ex situ* de espécies nativas exploradas economicamente.
- f. Aplicar modelos genéticos aliados ao conhecimento das características ecológicas de espécies ameaçadas visando a garantia da persistência, em longo prazo, de suas populações em escala regional. Estes parâmetros determinarão aspectos da paisagem (conectividade, qualidade de fragmentos etc.) e populações a serem considerados

dentro de um programa de conservação.

g. Estimular estudos genéticos de longo prazo visando avaliar os efeitos cumulativos da perda de variabilidade genética e da estrutura genética original de populações. O desconhecimento da estrutura genética populacional antes da fragmentação do habitat pode ser um sério problema nos esforços de conservação ou mitigação das mudanças após os distúrbios, exemplificado neste capítulo, pelo caso do mico-leão-dourado.

h. Proteger habitats contra a continuidade da fragmentação. Como evidenciado nos casos dos anfíbios e aves, a erosão genética não ocorre imediatamente após o processo de fragmentação, portanto, a preservação de fragmentos de habitat é crítica para a manutenção da variabilidade genética e, conseqüentemente, para a viabilidade das populações onde os efeitos de deriva genética e endocruzamento ainda não foram pronunciados.

i. Manter ou gerar conectividade por meio da implantação de corredores de vegetação nativa entre os fragmentos. A persistência de populações no cenário da fragmentação de habitat é criticamente dependente da manutenção da conectividade da paisagem, que por sua vez impede o isolamento de populações locais.

Referências bibliográficas

1. GOODMAN, D., 1987, Considerations of stochastic demography in the design and management of biological reserves. *Nat. Res. Model.*, 1: 205-234.
2. FRANKEL, O. H. & SOULÉ, M. E., 1981, Conservation and evolution. *Cambridge*, Cambridge University Press.
3. LANDE, R., 1988, Genetics and demography I biological conservation. *Science*, 241: 1455-1460.
4. GAINES, M. S., DIFFENDORFER, J. E., TAMARIN, R. H. & WHITTAN, T. S., 1997, The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *J. Hered.*, 88: 294-304.
5. HENDRICK, P. W., LACY, R. C., ALLENDORF, F. W. & SOULÉ, M. E., 1996, Directions in conservation biology: Comments on Caughley. *Conserv. Biol.*, 10: 1312-1320.
6. LACY, R. C., 1993, Vortex: a computer simulation model for population viability analysis. *Wildlife Research*, 20: 45-65.
7. FRANKLIN, I. R., 1980, Evolutionary change in small populations. In: M. E. Soulé & B. A. Wilcox (eds.), *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*, Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts.
8. TEMPLETON, A. R., ROBERTSON, R. J., BRISSON, J. & STRASBURG, J., 2001, Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 98(10): 5426-5432.
9. BALLOU, J. D. & LACY, R. C., 1995, Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in captive populations. In: J. D. Ballou, M. Gilpin, and T. Foose (eds.), *Population Management for Survival and Recovery*, Columbia University Press, New York.
10. KIERULFF, M. C. M., 1993, Avaliação das populações selvagens de mico-leão-dourado, *Leontopithecus rosalia*, e proposta de estratégia

para sua conservação. Unpublished Master's thesis, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 172p.

11. GRATIVOL, A. D., 1998, *Effects of forest fragmentation on the genetic variability of golden lion tamarins (Leontopithecus rosalia)*. Master's thesis, American University. 44p.

12. HAMRICK, J. L., MITTON, J. B. & LINHART, Y. B., 1981, Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. In: M. T. Conkle (ed.), *Isoenzymes of North American Forest Trees and Forest Insects*. Berkeley, CA: USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48, USDA Forest Service.

13. LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J. L., 1984, Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 69-95.

14. GLAUBITZ, J. C. & MORAN, G. F., 2000, Genetic tools. In: A. Young, T. Boyle and D. BOSCHER (eds.), *Forest conservation genetics*. Melbourne: CSIRO Publishing.

15. AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BIRMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A. & SAUNDERS, C. N., 1987, Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.

16. GOTTELLI, D., SILLERO-ZUBIRI, C., APPLEBAUM, G. D., ROY, M. S., GIRMAN, D. J., GARCIA-MORENO, J., OSTRANDER, E. A. & WAYNE, R. K., 1994, Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Mol. Ecol.*, 3: 301-312.

17. TAUTZ, D., TRICK M. & DOVER, G. A., 1986, Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652-656.

18. TAUTZ, D., 1989, Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.*, 17: 6463-6471.

19. TAYLOR, A. C., SHERWIN, W. B. & WAYNE, R. K., 1994, Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiornhinus krefftii*. *Mol. Ecol.*, 3: 277-290.

20. MACHUGH, D. E., LOFTUS, R. T., BRADLEY, D. G., SHARP, P. M. & CUNNINGHAM, P., 1994, Microsatellite DNA variation within and among european cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 256 : 25-31.

21. PAETKAU, D. & STROBECK C., 1994, Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.*, 3: 489-495.

22. HUGHES, C. R. & QUELLER, D. C., 1993, Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.*, 2: 131-137.

23. BATISTA, C. G., 2001, *Estrutura genética populacional de Physalaemus cuvieri Fitzinger, 1826 (Lisamphibia:Leptodactylidae) em fragmentos antrópicos e naturais de Cerrado*. Dissertação de mestrado. UnB. Brasília, DF, 38p.

24. RODRIGUES, A. A. F., 2001, *Estratégias Migratórias de Calidris pusilla (Aves: Scolopacidae) na Costa Norte da América do Sul*: Proposta de Rotas. Tese de doutorado. Belém, Pará. Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi. 2001. 83p.

25. CLARK, K., NILES, L. J. & DOOLITTLE, A., 2001, *Fifteen years of spring shorebird Surveys at Delaware Bay*. Wader Study Group, Special Spring 2001 Meeting. Wallops Marine Science Consortium, Virginia, U. S. A.

26. COIMBRA-FILHO, A. F., 1969, Mico-leão, *Leontideus rosalia* (Linnaeus, 1766), situação atual da espécie no Brasil (Callithricidae-Primates). *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 41: 29-52.

27. FREITAS, S. R., MORAES, D. A.; SANTORI, R. & CERQUEIRA, R., 1997, Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and

Didelphis aurita (Marsupialia, Didelphidae) in a restinga forest at Rio de Janeiro. Brazil. Rev. Brasil. Biol., 57: 93-98.

28. GENTILE, R. & CERQUEIRA, R., 1995, Movement patterns of five species of small mammals in a Brazilian restinga. *J. Trop. Ecol.* 11: 671-677.

29. MONAGHAN, M. T. SPAAK, P. ROBINSON, C. T. & WARD, J. V., 2001, Genetic differentiation of *Baetis alpinus* picket (Ephemeroptera: Baetidae) in fragmented alpine streams. *Heredity* 86 (4): 395-403.