



DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA EM *OLIGORYZOMYS* SP. (RODENTIA) TENDO O RIO URUGUAI COMO BARREIRA GEOGRÁFICA

L. B. Slaviero

G. B. Kubiak; V. Coppini; C. A. Zanella; C. M. Golunski; F. Zboralski; S. P. S. Miotto; L. A. Lerin; J. R. Marinho; A. J. Mossi; R. L. Cansian

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI-Campus de Erechim, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Sete de Setembro, nº 1621, 99700 - 000, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.
Telefone número: 55 54 3520 9000-gabrielakubiak@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Recentemente, numerosos estudos têm monitorado comunidades de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) em áreas protegidas com o intuito de compreender a dinâmica de populações e comunidades em fragmentos florestais das florestas tropicais^{4,12,13,17,18} e do cerrado^{1,5,6,8}.

Porém, as regiões norte do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina são locais ainda carentes de estudos científicos relacionados à fauna ou à flora natural. Não obstante, são regiões extremamente impactadas, pelo uso agropecuário das terras, com desmatamentos profusos e inundações por barragens, construídas ao longo do rio Uruguai e seus afluentes¹⁹.

As matas ciliares e áreas de preservação permanente são inexistentes ou insuficientes em relação à sua extensão e largura exigidas pela legislação³. Os estudos científicos, por conseguinte, tendem a ter muita importância neste contexto de urgência em termos de conhecimento dos organismos que habitam a região, para prospecção de análises das relações ecológicas e manejos futuros mais adequados para estas áreas. As populações de roedores e suas respectivas variabilidades genéticas podem fornecer importantes subsídios para, inclusive, extrapolar estes dados para outras populações que têm o rio como vizinho e divisor de territórios.

Os roedores pertencem à Classe Mammalia (mamíferos), Ordem Rodentia. São importantes em muitos ecossistemas porque se reproduzem rapidamente, servindo de alimento para predadores, são dispersores de sementes e vetores de doenças²⁰. Os roedores se dispersaram pela América do Sul a aproximadamente 2,7 milhões de anos e embora na nossa região a menos de 15.000 anos, após o degelo da última glaciação, pode - se considerar a diversidade genética como indicador do grau de isolamento reprodutivo.

Os marcadores moleculares estão sendo profusamente usados para delinear e comparar populações em seus ambientes naturais, bem como suas taxas evolutivas e graus de

parentesco. A utilidade dos dados moleculares extrapola a simples análise filogeográfica, sendo muito relevantes para a conservação em nível de área geográfica e de organismos envolvidos¹⁵. Dentre os marcadores moleculares, escolheu - se o RAPD por ser mais rápido e barato, e também por não requerer conhecimento prévio do genoma das espécies que se deseja estudar, assim como justificado por Lynch e Milligan⁹.

OBJETIVOS

Dessa forma, o presente trabalho visa identificar como variam geneticamente diferentes populações de *Oligoryzomys* sp. de populações de ambas as margens do rio Uruguai e em regiões geográficas distintas de uma mesma margem, e discutir qual a influência do rio Uruguai enquanto possível barreira geográfica para populações de roedores que tenham dificuldades para atravessar uma grande massa de água. Como objetivos específicos pretende - se: analisar através de marcadores moleculares RAPD os materiais genéticos obtidos; analisar os dados intra e interpopulacionais para estabelecer possíveis padrões e verificar a divergência genética.

MATERIAL E MÉTODOS

Os tecidos integrantes deste estudo são de populações de *Oligoryzomys* sp. amostrados em Passo Fundo - RS (Flona), Erechim - RS (Horto Florestal), Alpestre - RS, Rio dos Índios - RS e Chapecó - SC. Foram utilizados principalmente pedaços da orelha, coletados previamente e já catalogados, fazendo parte do acervo do Museu Regional do Alto Uruguai (MURAU) da URI Campus de Erechim.

A distância entre as populações escolhidas, localizadas no Rio Grande do Sul (mais de 50 Km), foram determinadas para garantir tratem - se de populações geneticamente

distintas. A população amostrada em Santa Catarina tem o Rio Uruguai como possível barreira de separação das demais populações do Rio Grande do Sul. A população de Chapecó foi composta por quatorze representantes, Horto e Flona por doze, Rio dos Índios por cinco e Alpestre por apenas dois representantes.

O material genético foi extraído usando - se o protocolo descrito por Marinho¹⁰, testando - se diferentes alterações a fim de otimizá - lo. Colocou - se até 20 mg de tecido em um microtubo (1,5 mL) e em seguida, adicionou - se tampão de lise (550 μ L) e proteinase K (11 μ L) e incubou - se overnight a 37^oC ou 2 horas a 60^oC para extrair o DNA. Terminada a incubação, adicionaram - se 350 μ L de NaCl 5M que atua na separação e precipitação do material genético. Neste momento foram feitas centrifugações sucessivas e lavagens com etanol para eliminar as impurezas associadas ao DNA. Por fim, adicionaram - se 100 μ L de TE 1X e incubou - se a 37^oC para depois ressuspender o pellet e conservou - se a 4^oC.

Para amplificação de RAPD foi utilizada a seguinte reação: Tampão de reação (50 mM Tris - HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,5% Triton - X 100), dNTPs (200 mM de cada), 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl₂, 40 ng de DNA e 1,5 U de Taq DNA polimerase.

O processo de amplificação seguiu o seguinte procedimento: 3 min a 92^oC, 40 ciclos de 1 min a 92^oC, 1 min a 36^oC e 2 min a 72^oC. Após, 3 min a 72^oC e resfriamento a 4^oC até a retirada das amostras. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (trisma 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,008M) em cuba de eletroforese horizontal. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Os fragmentos foram visualizados com brometo de etídio sob luz ultravioleta e os géis fotografados digitalmente.

Para otimizar os trabalhos de amplificação por RAPD foi realizada uma seleção de primers pertencentes a sete kits da Operon Technologies, sendo estes analisados em duplicata e observando intensidade e reprodutibilidade de bandas.

RESULTADOS

Foi verificado que os primers OPA 19, OPB 8, OPF 3, OPF 11, OPF 12, OPF 14, OPW 1, OPW 9, OPW 17, OPW 19, OPY 6, OPY 16, OPY 19 e OPY 20 estão entre os que melhor amplificaram as amostras analisadas, sendo estes os utilizados para as reações de amplificação das populações.

Para avaliar - se a variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de 211 bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP 3.1. Os dendrogramas de similaridade foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando - se o coeficiente de Jaccard para cálculo de similaridade. Os resultados genéticos foram avaliados considerando diferenças genéticas entre as populações analisadas, comparando - se principalmente os representante de Chapecó com os demais, afim de responder aos objetivos deste trabalho.

Levando em consideração os 45 indivíduos estudados foi identificado um total de 211 loci, sendo que destes, 181 (85,78%) mostraram - se polimórficos, sendo que o número de loci utilizados para análise foi bastante superior aos utilizados por Trott *et al.*,²¹ em espécies do gênero *Oligoryzomys* que utilizaram 75 loci polimórficos.

A população que apresentou maior número de loci reproduzidos foi Chapecó (192), mas a porcentagem de bandas polimórficas foi relativamente diferente e menor apenas para a população de Alpestre (142 bandas, 29,58% polimórficas). Isto pode ser explicado pelo número de exemplares desta população ser menor que as demais.

O coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,45 A 0,87 para as populações analisadas. A análise de agrupamentos UPGMA permitiu separar quatro grupos distintos. O primeiro grupo corresponde a população de Rio dos Índios, a qual formou um grupo com quase todos os indivíduos amostrados. O segundo grupo apresenta uma tendência de agrupamento da população do Horto de Erechim com 64% dos exemplares do grupo (58% dos indivíduos amostrados). O terceiro grupo tem uma forte tendência de agrupamento da população da Flona de Passo Fundo com 80% dos exemplares do grupo (67% dos indivíduos amostrados). O quarto grupo tem tendência de agrupamento da população de Chapecó, SC com 73% dos exemplares do grupo (57% dos indivíduos amostrados).

Entretanto, observa - se indivíduos da população de Chapecó - SC similares aos indivíduos de outras populações, principalmente do Horto de Erechim - RS e da Flona de Passo Fundo - RS. Este resultado indica que a separação geográfica do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, feita pelo Rio Uruguai, não resulta em uma barreira genética para esta espécie. A falta de proximidade genética entre a população de Chapecó - SC e Alpestre e Rio dos Índios - RS, os quais são próximos geograficamente, pode ser explicada pelo baixo número de indivíduos representantes destas duas últimas populações.

Alguns indivíduos não puderam ser agrupados, principalmente um indivíduo coletado no Horto de Erechim, o qual por sua distância genética, pode tratar - se de uma espécie distinta, incluída na amostragem. Este resultado fica evidenciado na Análise de Coordenadas Principais (PCO).

A população de Rio dos Índios mostrou - se bastante distinta das demais populações. Com a PCO, isto fica representado com mais nitidez, pelo agrupamento dos indivíduos desta população, mesmo que para as demais não ocorra uma separação clara.

Trott *et al.*,²¹ ao analisar com marcadores RAPD o gênero *Oligoryzomys* distribuído nos diferentes biomas do Brasil, utilizaram um total de 75 produtos polimórficos amplificados simultaneamente em 151 exemplares, e observaram que há uma grande variação genética entre os taxa de *Oligoryzomys* investigados. Porém, as análises de agrupamento utilizando a distância genética de Nei, não correlacionaram a heterogeneidade genética das espécies e populações com as áreas geográficas. Então, é possível que as relações por eles apresentadas seja resultado de uma particular historia da biologia de cada espécie, como o tamanho de suas populações passadas ou as diferentes estratégias desenvolvidas para explorar e ocupar seus territórios atuais.

Por outro lado, utilizando marcadores microssatélites, populações geograficamente próximas de *Nectomys squamipes* apresentaram - se significativamente diferentes mesmo com uma pequena distância separando - as, de acordo com estudos prévios de pequenos roedores que apresentaram uma estrutura populacional significativa em reduzida escala espacial^{17,14}. Esta significativa diferença populacional de *N. squamipes* indica que a migração provavelmente seja restrita (resultando em fluxo limitado do gene), e que a maioria dos movimentos estão confinados aos cursos d'água (diferenciando genética e geograficamente populações muito próximas de *Nectomys*)¹¹.

Almeida *et al.*,² em um trabalho anterior, encontraram um resultado semelhante ao trabalho de Maroja, Almeida e Seuánez¹¹, mas utilizando como marcador o RAPD, sendo que seus dados não indicaram uma diferenciação substancial na extensa área de distribuição de *N. squamipes*.

As diferentes populações de *Oligoryzomys* sp analisadas não tem sua migração restrita ao ambiente aquático, conforme discutido para *N. squamipes*. Além disso, observou - se que corpos d'água podem não ser barreira para migração de indivíduos e, portanto, para o fluxo gênico entre populações. Pode - se esperar então, que a similaridade genética entre os indivíduos seja maior, não ocorrendo uma separação clara entre as populações conforme suas respectivas regiões de localização.

CONCLUSÃO

A análise da variabilidade genética entre as cinco populações em questão utilizando marcadores RAPD, revelou uma tendência de agrupamento dos indivíduos de cada população, conforme a localização geográfica. Entretanto, observam - se indivíduos da população de Chapecó - SC similares aos indivíduos de outras populações, principalmente do Horto de Erechim - RS e da Flona de Passo Fundo - RS. Dessa forma, não se pode afirmar que o Rio Uruguai atue como uma barreira geográfica para o fluxo gênico em populações de *Oligoryzomys* sp.

Os autores agradecem a FAPERGS, CNPq, SC&T - RS e URI - Campus de Erechim pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1 - Alho, C. J. R. Small mammal populations of Brazilian Cerrado: The dependence of abundance and diversity on habitat complexity. *Revista Brasileira de Biologia*, 41: 223 - 230, 1981.
- 2 - Almeida F. C.; Maroja, L. S.; Seuánez, H. N.; Cerqueira, R.; Moreira, M. A. M. Identification of microsatellite loci in the water - rat *Nectomys squamipes* (Rodentia Sigmodontinae). *Molecular Ecology*, 9: 2172 - 2173, 2000.
- 3 - Brasil. 1989. Legislação Federal. Lei nr. 7.803 de 15 de agosto de 1989. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamentoo/legislacao/federal/leis/1989LeiFed7803.pdf> .Acessado em 19/09/2007.

- 4 - Bonvicino, C. R.; Langguth, A., Lindbergh, S.M.; Paula, A.C. An elevational gradient study of small mammals at Caparaó National Park, southeastern Brazil. *Mammalia*, 61: 547 - 560, 1997.
- 5 - Bonvicino, C. R.; Lindbergh, S. M.; Maroja, L. S. Small non - flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 765 - 774, 2002.
- 6 - Bonvicino, C. R.; Freitas, S. R.; D'Andrea, P. S. *Influence of bordering vegetation, width and state of conservation of a gallery forest on the presence of small mammals*. In: Leila, L. L.; Saito, C. H. (Ed), *Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado*. Brasília: Universidade de Brasília, p. 147 - 167, 1997.
- 7 - Dallas J. F. Dod, B.; Boursot, P.; Prager, E. M.; Bonhomme, F. Population subdivision and gene flow in Danish house mice. *Molecular Ecology*, 4: 311 - 320, 1995.
- 8 - Fonseca, G. A. B.; Redford, K. H. The mammals of IBGE Ecological Reserve, Brasília, and the analysis of the role of gallery forest in increasing diversity. *Revista Brasileira de Biologia*, 44: 517 - 523, 1984.
- 9 - Lynch, M.; Milligan, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91 - 99, 1994.
- 10 - Marinho, J.R. Estudo da comunidade e do fluxo gênico de roedores silvestres em um gradiente altitudinal de mata atlântica na área de influência da RST 453/RS - 486 Rota - do - Sol. Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2003, 119p.
- 11 - Maroja, L.S.; Almeida, F.C.; Seuánez, H.N. Genetic differentiation in geographically close populations of the water rat *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Society of Genetics*, 26(4): 403 - 410, 2003.
- 12 - Pardini, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodiversity and Conservation*, 13: 2567-2586, 2004.
- 13 - Pires A. S. Lira, P.K.; Fernandez, F.A.S.; Schittini, G.M.; Oliveira, L.C. *et al.*, Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, 108: 229-237, 2002.
- 14 - Selander R. K. Behavior and genetic variation in natural populations. *American Zoologist*, 10: 53 - 66, 1970.
- 15 - Silva, M. N. F.; Patton, J. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*, 7:475 - 486, 1998.
- 16 - Silveira, L. Rodrigues, F. H. G., Jacomo, A. T. D.; Diniz, J. H. F. Impact of wildfires on the megafauna of Emas National Park, central Brazil. *Oryx*, 33: 108 - 114, 1999.
- 17 - Stallings, J. R. Small mammal inventories in an eastern Brazilian park. *Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences*, 34: p. 153 - 200, 1989.
- 18 - Stevens, S. M.; Husband, T. P. The influence of edge on small mammals: evidence of Brazilian Atlantic forest fragments. *Biological Conservation*, 85: p. 1 - 8, 1998.
- 19 - Vieira, E. F.; Rangel, S. R. S. Rio Grande do Sul: *Geografia Física e Vegetação*. Porto Alegre: Sagra, 1984.
- 20 - Wilson, D. E. 2005. *Mammal Species of the World*, Johns Hopkins University Press. Disponível

em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Roedor>. Acesso em 27/08/2007.

21 - Trott, A. Callegari - Jacques, S. M.; Oliveira, L. F.

B.C.; Langguth, A.; Mattevi, M.S. Genetic diversity and relatedness within and between species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia; Sigmodontinae). *Brazilian Journal of Biology*, 67(1): 153 - 160, 2007.