

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da ocorrência de semelparidade em *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) por meio do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites

**Marcela Reis Duarte da Silva**

Brasília- DF  
Agosto de 2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da ocorrência de semelparidade em *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) por meio do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites

**Marcela Reis Duarte da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Zoologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano**  
**Coorientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues**

Brasília- DF  
Agosto de 2021

## **Agradecimentos**

Agradeço ao universo, por ter tornado tudo isso possível.

Agradeço a minha família, em especial a dois grandes mestres: A minha mãe, Fernanda Lima Reis, por todo seu apoio, carinho e confiança. E meu avô, Oswaldo Martins Reis, por me inspirar a fazer ciência, pelos conselhos e ensinamentos de um dos maiores cientistas para mim. A minha irmã Bruna Reis, por todo seu apoio. Ao meu pai, Sergio Duarte, que mesmo longe sempre me incentivou a estudar e me qualificar. Aos Biólogos da minha família que me inspiraram a seguir essa profissão e me ajudaram também nessa caminhada, Marcelo Lima Reis (tio) e Filipe Carneiro Reis (primo). E a todos os outros integrantes da minha família por todo seu amor e presença na minha vida. Amo vocês, Gratidão Eterna.

Ao Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues pela oportunidade e confiança. Por me ensinar, ajudar e orientar nesse período com paciência e dedicação. A Prof. Dra. Lilian Gimenes, pelo acolhimento, pela sua disponibilidade e ajuda em todos os momentos que precisei. Ao Prof. Dr. Renato Caparroz por sempre me ajudar e me ensinar quando precisei. A todos meus colegas do Laboratório de Genética e Biodiversidade, pelos ensinamentos e aprendizados compartilhados. Em especial a Dra. Cássia Lima-Rezende que me ensinou tudo que sei desde que entrei no laboratório e continuou me ajudando e apoiando mesmo longe nesses dois anos de mestrado. E ao técnico Frederico por toda sua proatividade e ajuda. Gratidão pelo carinho de todos e por participarem dessa minha caminhada!

Ao Prof. Dr. Emerson Monteiro Vieira, Dra. Priscilla Zangrandi e aos integrantes do Laboratório de Ecologia de Vertebrados da Universidade de Brasília, pelas amostras fornecidas para esse estudo. Aos professores das disciplinas da pós-graduação, por todos seus ensinamentos. Aos coordenadores do programa de pós-graduação em Zoologia, Prof. Dr. José Roberto Pujol e Angele Dos Reis Martins, por sempre buscarem ajudar e esclarecer a todos os estudantes os assuntos referentes ao curso. Aos meus colegas e amigos de curso pelo apoio e conhecimentos compartilhados. Aos meus amigos da vida por me incentivarem e apoiarem. À CAPES, pela bolsa concedida durante um ano do mestrado, e à FAPDF pelos recursos fornecidos para a realização deste projeto de pesquisa (Processo No. 193.000.914/2015, em favor de Emerson M. Vieira, e Processo No. 0193.001.071/2015, em favor de Fernando P. Rodrigues). E finalmente, a mim mesma por me dedicar e buscar essa qualificação para minha formação profissional.

Gratidão a todos, por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho!

“As **novas opiniões** sempre despertam suspeita e, em geral, oposição, sem qualquer outra razão que não o fato de já não serem comuns”.

JOHN LOCKE, 1690 (Essay Concerning Human understanding)

## Sumário

Resumo Geral .....	1
Introdução Geral.....	4
Semelparidade.....	4
Marcadores Moleculares do tipo Microsatélites.....	5
A espécie estudada ( <i>Gracilinanus agilis</i> ).....	7
A área de estudo e obtenção das amostras.....	8
Objetivos e Hipóteses .....	12
<b>Capítulo 1</b> .....	14
Isolamento e caracterização de marcadores moleculares do tipo microsatélites para o marsupial <i>Gracilinanus agilis</i> (Didelphimorphia: Didelphidae)	
Abstract.....	15
Resumo.....	16
1.1. Introdução.....	17
1.2. Material e Métodos.....	19
1.3. Resultados.....	23
1.4. Discussão.....	26
<b>Capítulo 2</b> .....	28
Análise do parentesco em uma população de <i>Gracilinanus agilis</i> (Didelphimorphia, Didelphidae) por meio do uso de locos de microsatélites e avaliação da estratégia reprodutiva apresentada pela espécie	
Abstract.....	29
Resumo.....	30
2.1. Introdução.....	31
2.2. Material e Métodos.....	34
2.3. Resultados.....	40
2.4. Discussão.....	46
Conclusões Gerais.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	64

## Resumo Geral

Os animais podem apresentar estratégias reprodutivas que permitem classificá-los em um gradiente que varia de espécies semélparas a espécies iteróparas. As espécies semélparas geralmente se reproduzem uma única vez e se encontram no extremo “rápido” desse gradiente, sendo normalmente organismos com menor longevidade e alta fecundidade. A semelparidade é uma estratégia evolutiva rara em vertebrados, porém ocorre em marsupiais das famílias Didelphidae (americanos) e Dasyuridae (australianos). *Gracilinanus agilis*, um marsupial didelfídeo, apresenta fortes evidências para existência da semelparidade, a partir de estimativas de sobrevivência pós-reprodutiva baseadas no método de captura-marcação-recaptura e em parâmetros fisiológicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência da semelparidade em *G. agilis* através do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites em uma população existente em uma área de Cerrado do Distrito Federal. Para isso, isolamos e caracterizamos 15 locos de microssatélites para a espécie, usando sequenciamento de alto rendimento com a plataforma Illumina (capítulo 1). Destes, 12 foram efetivamente utilizados para realizar testes de parentesco genético e atribuição de paternidade/maternidade entre indivíduos ao longo de diferentes estações reprodutivas e, com isso, caracterizar a ocorrência da semelparidade em *G. agilis* (capítulo 2). Nossos resultados sugerem que os machos dessa população apresentam semelparidade obrigatória, podendo ocorrer exceções ao longo dos anos, enquanto que as fêmeas apresentam semelparidade parcial, com algumas podendo sobreviver e se reproduzir na próxima estação reprodutiva. A plasticidade na estratégia reprodutiva evidenciada em nosso trabalho e quando analisada em conjunto com os resultados de outros estudos, nos permite classificar *G. agilis* como uma espécie que apresenta semelparidade facultativa. Na semelparidade facultativa há uma variação nas taxas de sobrevivência/mortalidade ao longo dos anos em diferentes populações: em alguns anos e em algumas populações a morte total dos indivíduos pode ocorrer, assim como em outros uma pequena parcela dos indivíduos pode sobreviver e participar do próximo evento reprodutivo. As diferenças nos números de indivíduos que sobrevivem podem estar relacionadas com fatores como disponibilidade e abundância de alimento, qualidade dos habitats, sincronia na fertilidade dos indivíduos, além da seleção evolutiva, na qual influenciam o custo da reprodução em troca da sobrevivência e sucesso reprodutivo. Porém, estudos mais detalhados precisam ser feitos para entender as relações entre esses fatores e a mortalidade dos indivíduos. Nosso estudo é útil para preencher lacunas ainda existentes sobre

a biologia reprodutiva da espécie e reforça a importância da realização de análises genéticas junto com estudos de dinâmica populacional e fisiologia para avaliar as estratégias reprodutivas em pequenos mamíferos.

**Palavras-chaves:** análises genéticas, estratégia reprodutiva, locos microssatélites, pequenos mamíferos, parentesco, sequenciamento de nova geração.

## **Introdução Geral**



## Introdução Geral

### *Semelparidade*

As estratégias reprodutivas fazem parte da história de vida dos organismos, e incluem características como fecundidade total, longevidade máxima e idade de reprodução e morte (Cole 1954). Existe uma diversidade nos padrões de história de vida utilizados pelos diversos grupos de animais, incluindo mamíferos e que permite classificar as espécies em um gradiente que varia de espécies semélparas a espécies iteróparas (Cole 1954). As espécies semélparas, que se encontram no extremo “rápido” desse gradiente, são organismos de pequeno porte, com alta taxa metabólica, menor longevidade, maturidade precoce, grande número de filhotes e um período curto de gestação. Já as espécies iteróparas, que se encontram no extremo “lento” desse gradiente, são organismos de grande porte, com baixa taxa metabólica, maior longevidade, maturidade tardia, pequeno número de filhotes e longo período de gestação (Promislow e Harvey 1990).

A semelparidade é uma estratégia evolutiva rara em vertebrados (Crespi e Teo 2002) e que ocorre em marsupiais das famílias Didelphidae (americanos) e Dasyuridae (Krajewski *et al.* 2000; Boonstra 2005). A estratégia semélpara nestas famílias é caracterizada geralmente pela alta mortalidade dos machos após o período reprodutivo e pelo declínio acentuado de fecundidade das fêmeas após a primeira estação reprodutiva (Cockburn 1997). Apesar de a semelparidade ser aparentemente restrita aos machos, a senescência pós-reprodutiva nas fêmeas, também contribui para descrição de uma estratégia semélpara (Cockburn 1997; Fisher e Blomberg 2011). A mortalidade completa dos indivíduos de ambos os sexos após a estação reprodutiva resulta em gerações discretas não sobrepostas, o que já foi observado em marsupiais semélparos americanos dos gêneros *Marmosops* e *Monodelphis* (Leiner *et al.* 2008; Baladrón *et al.* 2012) e na espécie australiana, *Ningau ridei* (Dickman *et al.* 2001). Entretanto a mortalidade obrigatória masculina é mais evidente na maior parte das espécies semélparas já estudadas, como nos gêneros de dasyurídeos *Antechinus* e *Phascogale* (Bradley *et al.* 1980; Bradley 1997).

Fatores envolvidos na mortalidade dos machos pós-acasalamento, como por exemplo o surgimento de feridas ao longo do corpo, o aumento do estresse e agressividade, a perda de peso e pelos, o desenvolvimento de anemia e falhas no sistema imune e inflamatório (Bradley 2003; Boonstra 2005; Holleley *et al.* 2006), podem ser decorrentes pela intensa competição

por fêmeas durante a estação reprodutiva curta e sincronizada (Oakwood *et al.* 2001; Naylor *et al.* 2008). Apesar das causas fisiológicas relacionadas à mortalidade desses indivíduos já serem bastante estudadas em marsupiais Australianos, esses fatores ainda não são totalmente conhecidos nos marsupiais Americanos, com apenas dois estudos em *Gracilinanus agilis* (Hernandez *et al.* 2018; Zangrandi 2018).

A estratégia de vida semélpara para pequenos mamíferos neotropicais não-voadores foi descrita em quatro gêneros de marsupiais didelfídeos: *Thylamys* em *Thylamys bruchi* (Albanese *et al.* 2021), *Marmosops* em *Marmosops incanus* (Lorini *et al.* 1994) e *Marmosops paulensis* (Leiner *et al.* 2008), *Monodelphis* em *Monodelphis dimidiata* (Baladrón *et al.* 2012) e *Gracilinanus* em *Gracilinanus microtarsus* (Martins *et al.* 2006a) e *Gracilinanus agilis* (Lopes e Leiner 2015; Puida e Paglia 2015). No entanto, a espécie referida como *G. microtarsus* nos estudos de Martins *et al.* 2006a; b foi posteriormente identificada como *G. agilis* (ver Vieira *et al.* 2017), sendo a população estudada descrita como parcialmente semélpara, com alta mortalidade dos machos e somente alguns deles participando do evento reprodutivo seguinte. Outros estudos com *Gracilinanus agilis*, espécie alvo do presente estudo, apresentam fortes evidências para adoção da semelparidade (Lopes e Leiner 2015; Puida e Paglia 2015; Hernandez *et al.* 2018; Zangrandi 2018), entretanto ainda existem incertezas sobre a ocorrência dessa estratégia reprodutiva na espécie, como por exemplo, a diferença entre machos e fêmeas e se indivíduos recapturados em uma segunda estação reprodutiva são capazes de gerar descendentes.

Os estudos populacionais já existentes sobre a semelparidade em marsupiais neotropicais baseiam-se principalmente no método de captura-marcação-recaptura para estimar parâmetros populacionais e de sobrevivência pós-reprodutiva, sem o acompanhamento de análises genéticas de parentesco e sucesso reprodutivo. No presente trabalho utilizamos marcadores moleculares do tipo microssatélites para avaliar a ocorrência da semelparidade em uma população de *G. agilis* presente em uma unidade de conservação do Distrito Federal, contribuindo assim para uma melhor compreensão da magnitude desta estratégia reprodutiva na espécie em questão.

### *Marcadores moleculares do tipo microssatélites*

Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões do DNA que contém pequenas sequências de nucleotídeos repetidas em *tandem* (Queller *et al.* 1993), e que podem ser utilizadas para estudar diversas questões biológicas, incluindo a análise da

diversidade e estrutura genética das populações, avaliação do fluxo gênico, ocorrência de endogamia, identificação individual, paternidade e parentesco entre os indivíduos, entre outros (Perez-Sweeney *et al.* 2003). A vantagem desses marcadores se deve a características como: alto polimorfismo, codominância, alta frequência e distribuição ao acaso no genoma (Ferreira e Grattapaglia 1998), o que torna possível as diversas análises mencionadas.

O sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) é uma técnica relativamente recente e cada vez mais utilizada para a identificação de locos microssatélites. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez com este fim no trabalho de Allentoft *et al.* (2009), no qual os autores descreveram sequências microssatélites para uma espécie de ave já extinta, a moa de pés pesados (*Pachyornis elephantopus*). Ekblom e Galindo (2011) descreveram o NGS como uma “revolução genômica” em ecologia molecular por gerar uma grande quantidade de dados de sequências de forma muito mais rápida e econômica, possibilitando o desenvolvimento de ferramentas, como os marcadores moleculares, de maneira mais eficiente e abrangente para espécies não-modelos. Devido a eficácia e custo benefício dessa técnica para espécies não-modelo, houve um crescente número de publicações até os dias de hoje (Gardner *et al.* 2011; Hunter *et al.* 2018).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos são bastante utilizados em análises para determinar o tipo de relacionamento biológico (vínculo genético) entre indivíduos. Isso é feito por meio de análises de paternidade, avaliando-se os genótipos dos possíveis pais e da prole, e por meio de análises de parentesco, onde o grau de relacionamento entre os indivíduos pode ser determinados como pais/filhos, meio irmãos e irmãos completos (Lopes *et al.* 2013). Essas análises já foram empregadas em diversos estudos para avaliar a ocorrência de paternidade múltipla (mais de um pai para uma mesma ninhada concebida de uma mesma mãe) como, por exemplo, em espécies de tartarugas marinhas (Hoekert *et al.* 2002; Moore e Ball 2002) e marsupiais dasiurídeos (Holleley *et al.* 2006; Hayes *et al.* 2019), assim como em estudos para avaliar o nível de ocorrência de acasalamento extra-par em espécies de aves socialmente monogâmicas (Li *et al.* 2009; Cramer *et al.* 2011; Lopes *et al.* 2013).

Outras questões biológicas foram evidenciadas por meio desses marcadores e análises de paternidade/parentesco como, por exemplo, a demonstração de padrões mais diversos e complexos de acasalamento e estrutura social em aves (Goossens *et al.* 1998; Thusius *et al.* 2001; Hughes *et al.* 2003; Miño *et al.* 2017) e mamíferos (Parga *et al.* 2016; Turner *et al.* 2016). Além disso, as análises de paternidade e parentesco baseadas em dados de locos de microssatélites são úteis em investigações forenses relacionadas ao comércio ilegal de ovos e

filhotes de espécies selvagens, tanto na natureza como em cativeiro (Caparroz e Rodrigues 2017; Coetzer *et al.* 2017). Os marcadores microssatélites tem sido ainda utilizados em diversas análises de interesse para a Biologia da Conservação, como por exemplo, a avaliação da diversidade e estrutura genética de populações (Haag *et al.* 2010; Figueiredo *et al.* 2015; Mannise *et al.* 2017), a delimitação de unidades de manejo (Hedrick *et al.* 2001; Warwick *et al.* 2015; Welch *et al.* 2017), e a avaliação da conectividade e fluxo gênico (Hrbek *et al.* 2007; Rosa *et al.* 2016), entre outros. As características dos microssatélites e o seu desenvolvimento com melhor custo e eficácia através da técnica de NGS para espécies não-modelos são responsáveis por criar esse cenário em que há uma ampla utilização desses marcadores moleculares nos estudos científicos (Ekblom e Galindo 2011).

### *A espécie estudada*

O marsupial *Gracilinanus agilis* (Burmeister 1854), também conhecido como catita, cuíca ou cuíca graciosa, pertence à família Didelphidae (Figura 1). Esse pequeno marsupial possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em florestas secas e matas de galeria no Brasil Central, leste do Peru, leste da Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (Gardner 2008). Sua dieta insetívora-onívora é constituída principalmente de frutos e artrópodes como himenópteros (Formicidae) e Isópteros (Termitidae) (Bocchiglieri *et al.* 2010; Lessa e da Costa 2010; Camargo *et al.* 2014). Esse marsupial explora primariamente o estrato arbóreo (Rossi *et al.* 2006), apresentando hábito escansorial, solitário e noturno (Emmons e Feer 1997).

A atividade reprodutiva desta espécie é sincronizada entre os indivíduos e começa no final da estação seca com recrutamento ocorrendo na estação chuvosa, quando há maior disponibilidade de recursos alimentares (de Andreazzi *et al.* 2011). Os indivíduos desta espécie apresentam dimorfismo sexual de tamanho variando seu peso entre 20 e 45 gramas nos adultos, no qual os machos são maiores que as fêmeas e geralmente apresentam áreas de vida maiores (Costa *et al.* 2003; Vieira 2006). Essa ocupação do espaço pode estar relacionada com a diferença de tamanho entre os sexos e com comportamentos para assegurar a reprodução (Cáceres e Monteiro-Filho 2006). Lopes (2014) registrou um comportamento mais territorialista das fêmeas durante o período reprodutivo, sem a sobreposição de suas áreas de vida, enquanto no sexo oposto ocorreram extensas sobreposições de áreas com fêmeas e outros machos.

Assim como outros marsupiais didelfídeos, *Gracilinanus agilis* é considerado um potencial dispersor de pequenas sementes de plantas pioneiras, apresentando grande

importância nos processos de regeneração de ambientes (Leiner e Silva 2007; Lessa e da Costa 2010; Camargo et al. 2011). Além disso, contribui para o controle biológico de pragas agrícolas ao incluir vários insetos em sua dieta (Camargo *et al.* 2014). Provavelmente devido a sua ampla distribuição, essa espécie é listada pela IUCN como menos preocupante (Carmignotto *et al.* 2015). Porém, suas populações estão sujeitas aos efeitos da fragmentação de habitat causado por intensa ação humana, como os processos de desmatamento e urbanização (Meyer e Turner II 1994; Klink e Machado 2005), o que pode levar à perda de diversidade genética e depressão endogâmica (Frankham *et al.* 2002; Fahrig 2003). Desta forma, é importante entender e estudar as estratégias reprodutivas utilizadas pela espécie, pois elas têm uma influência direta nas flutuações populacionais e, conseqüentemente, nos níveis de diversidade genética das suas populações (Fisher e Blomberg 2011).



**Figura 1.** *Gracilinanus agilis* (Foto: André Mendonça)

### *Objetivos e Hipóteses*

Tendo em vista as dificuldades e limitações de se avaliar a ocorrência da semelparidade através dos métodos tradicionalmente utilizados em ecologia de populações (captura-marcação-recaptura), desenvolvemos o presente trabalho com os seguintes objetivos:

#### *Objetivo Geral*

Avaliar a ocorrência de semelparidade no marsupial *Gracilinanus agilis* por meio do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

### *Objetivos específicos*

1. Isolar e caracterizar novos locos de microssatélites para *G. agilis*;
2. Analisar a diversidade genética populacional em duas populações do Distrito Federal;
3. Estimar o coeficiente de parentesco e as categorias de relacionamento entre indivíduos da população estudada;
4. Realizar a atribuição parental e avaliar a contribuição genética individual dos espécimes de *Gracilinanus agilis* ao longo de diferentes gerações;
5. Avaliar se há sobreposição de gerações, principalmente de machos ao longo dos anos, para analisar a ocorrência de semelparidade na espécie estudada.

### *Hipóteses*

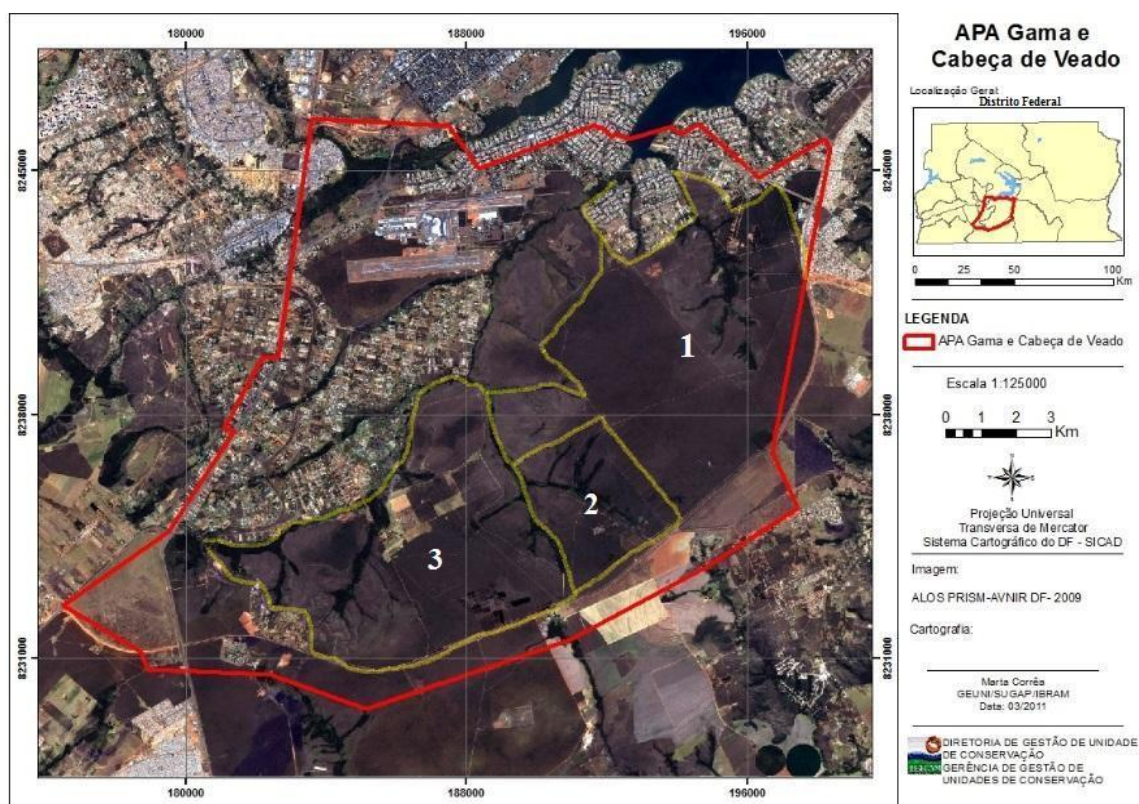
1. *Gracilinanus agilis* apresenta semelparidade masculina obrigatória, com mortalidade abrupta dos machos após uma curta e intensa estação reprodutiva, não havendo sobreposição entre gerações de indivíduos desse sexo.
2. A mortalidade pós-reprodutiva nas fêmeas de *Gracilinanus agilis* contribui para estratégia de vida semélpara, porém com algumas podendo participar de eventos reprodutivos futuros.

Ambas as hipóteses foram avaliadas com base em análises genéticas.

### *Área de estudo e obtenção das amostras*

As amostras foram coletadas na Área de Proteção Ambiental (APA) Gama e Cabeça-de-Veado (APAGCV) localizada ao sul do Distrito Federal (DF) (Figura 2). A APAGCV possui um total de 25 mil ha e cerca de 10.000 ha de área contínua protegida pelas Unidades de Conservação (UCs) que incluem a Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília (EEJBB-GDF), a Reserva Ecológica do IBGE e a Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB) (UNESCO 2002; Felfili e Santos 2004). Essa área de proteção tem como objetivo principal resguardar os mananciais hídricos da bacia dos ribeirões Gama e Cabeça-de-Veado, que integra a bacia do lago Paranoá do Distrito Federal (Felfili e Santos 2004). Além disso, ela tem importante papel na preservação da biodiversidade do bioma Cerrado, e

abriga estudos realizados por instituições de pesquisa do Distrito Federal, como a Universidade de Brasília (UnB) e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Felfili e Santos 2004).



**Figura 2.** Imagem da APA dos córregos Gama e Cabeça-de-Veado delimitada em vermelho. Em amarelo o mosaico composto por três Unidades de Conservação: 1) Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília (EEJBB); 2) Reserva Ecológica do IBGE e; 3) Fazenda Água Limpa (FAL/UnB). Fonte: IBRAM e JBB-Plano de Manejo.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e é considerado um *hotspot* global de biodiversidade com mais de 4.800 espécies endêmicas de plantas e vertebrados, possuindo uma ampla variedade de fitofisionomias coexistentes (Myers *et al.* 2000; Strassburg *et al.* 2017). Apesar de sua importância, o Cerrado é alvo de grande desmatamento pela expansão da agricultura e da pecuária (Klink e Machado 2005), com mais de 50% da sua cobertura vegetal desmatada para a implementação de grandes fazendas (Grecchi *et al.* 2014; Espírito-Santo *et al.* 2016). O bioma apresenta apenas 8,3% da sua área protegida por Unidades de Conservação (UC), entre elas a APA Gama e Cabeça-de-Veado, que corresponde a cerca de 11% do total das APAs existentes no DF (UNESCO 2003; França *et al.* 2015).

As amostras de *G. agilis* foram coletadas em duas manchas de cerradão localizadas na EEJBB. Essa fitofisionomia ocorre em solos fortemente drenados e profundos, formam dossel de 8 a 15 m de altura com algumas árvores podendo chegar até 20 metros, variando em uma cobertura arbórea de 50% a 90% (Ratter *et al.* 1977; Ribeiro e Walter 2008). O cerradão é caracterizado pela flora mista de espécies florestais e savânicas, com maiores valores de similaridade florística com o Cerrado sentido restrito do que com as matas (Ribeiro e Walter 2008). O clima sazonal, com invernos secos e verões chuvosos, é caracterizado por períodos de chuva de outubro a março, seguido por período seco, de abril a setembro (Klink e Machado 2005). A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas variam ao longo do ano entre 18°C e 28°C em média (Dias 1992; Klink e Machado 2005).

As áreas amostradas foram denominadas JB1(15°56'49.0"S 47°56'42.8"W) e JB2 (15°55'25.6"S 47°49'59.3"W) (Figura 3) e possuem 23,83 e 27,33 ha de cerradão, respectivamente, imersos em uma matriz de cerrado *sensu strictu*. A captura dos indivíduos foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Vertebrados (Ecovert) da Universidade de Brasília (IB/UnB) durante um estudo de longa duração. Nesses fragmentos de Cerradão foi disposta uma grade de 1,44 ha (120 m x 120 m) composta por nove linhas paralelas, cada uma com nove estações de captura dispostas a cada 15 m, totalizando 81 estações de captura. Em cada uma dessas estações foram colocadas duas armadilhas do tipo Sherman (23 cm x 9 cm x 8 cm), sendo uma no sub-bosque a cerca de dois metros de altura e outra no solo, utilizando como isca uma mistura de óleo de fígado de bacalhau, fubá, banana, essência de baunilha e pasta de amendoim. A amostragem foi realizada por seis noites consecutivas a cada três meses, entre os anos de 2013 e 2017 (Zangrandi 2018).





**Figura 3.** Localização das áreas amostradas, denominadas JB1 (ponto verde) e JB2 (ponto amarelo). Ambas estão localizadas no Jardim Botânico de Brasília (representado pelo número “1”), dentro da APA Gama e Cabeça-de-Vead0 (delimitada pela linha em vermelho). Fonte: Imagem satélite *Google Maps*.

Os indivíduos capturados pela primeira vez foram marcados com brincos numerados em ambas as orelhas para prevenir a perda da identificação individual (Figura 4). Um pequeno fragmento de tecido da orelha de cada indivíduo foi coletado e armazenado em tubos de polipropileno contendo álcool absoluto, sendo mantido sob refrigeração até o envio para o laboratório. Para cada amostra foram anotados o número de campo do animal, sexo, data de coleta, informações biométricas e o padrão de erupção dentária para determinação da idade (filhotes, jovens, subadultos e adultos). Indivíduos que vieram a óbito durante as campanhas foram taxidermizados e depositados na Coleção de Mamíferos da Universidade de Brasília (CMUNB).



**Figura 4.** *G. agilis* em campo com marcação em ambas as orelhas. (Foto: Priscilla Zangrandi)

## Capítulo 1

# **Isolamento e caracterização de marcadores moleculares do tipo microssatélites para o marsupial *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae)**

## Abstract

*Gracilinanus agilis* is a nocturnal, solitary, and scansorial neotropical marsupial. This small marsupial plays an important role in biological control of other species and seed dispersal. So far there are no microsatellite-type genetic markers described for the species, which makes it impossible to carry out studies on population genetic diversity and structure, and studies on their reproductive behavior. In this chapter we describe the isolation and characterization of microsatellite markers using high-throughput sequencing with the Illumina platform. Primers were developed for a total of 207 loci, of which 26 were tested using 30 samples of *G. agilis*. Of the twenty-six loci tested, 15 were successfully amplified and exhibited high levels of genetic variation, with a mean of 7.73 alleles per locus, mean observed heterozygosity of 0.63, and mean expected heterozygosity of 0.72. Four loci showed a high frequency of null alleles and three showed significant deviation from the Hardy-Weinberg Equilibrium. The 15 loci analyzed have a high probability of paternity exclusion (0.9999) and a low probability of identity ( $3.45 \times 10^{-16}$ ). Our results showed that the loci described have a high potential for analyzing the diversity and population genetic structure of the species, as well as for relatedness and parentage analysis.

**Keywords:** high-throughput sequencing; microsatellites; *G. agilis*; parentage analysis; population genetics.

## Resumo

*Gracilinanus agilis* é um marsupial neotropical noturno, solitário e escansorial. Este pequeno marsupial tem um papel importante no controle biológico de outras espécies e na dispersão de sementes. Até o momento não existem marcadores genéticos do tipo microssatélites descritos para a espécie, o que impossibilita a realização de estudos sobre a diversidade e estrutura genética populacional, e estudos sobre seu comportamento reprodutivo. Neste capítulo descrevemos o isolamento e a caracterização de marcadores microssatélites usando sequenciamento de alto rendimento com a plataforma Illumina. *Primers* foram desenvolvidos para um total de 207 locos, dos quais 26 foram testados utilizando 30 amostras de *G. agilis*. Dos vinte e seis locos testados, 15 foram amplificados com sucesso e exibiram altos níveis de variação genética, com uma média de 7,73 alelos por loco, heterozigosidade observada média de 0,63 e heterozigosidade esperada média de 0,72. Quatro locos apresentaram uma alta frequência de alelos nulos e três mostraram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os 15 locos analisados apresentam uma probabilidade de exclusão de paternidade alta (0,9999) e baixa probabilidade de identidade ( $3,45 \times 10^{-16}$ ). Nossos resultados mostraram que os locos descritos possuem alto potencial para análise da diversidade e estrutura genética populacional da espécie, bem como para análise de parentesco e teste de paternidade.

**Palavras-chave:** análise de parentesco; sequenciamento de alto rendimento; microssatélites; *G. agilis*; genética de populacional.

## Introdução

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, são uma das ferramentas de análise genética mais utilizadas para estimar os níveis de variação populacional, estrutura genética, magnitude e direcionalidade do fluxo gênico, além da análise de paternidade e parentesco entre indivíduos (Perez-Sweeney *et al.* 2003; Selkoe e Toonen 2006). Embora esta seja uma ferramenta bem estabelecida, o uso de microssatélites depende da disponibilidade de *primers* espécie-específicos.

Até recentemente, o isolamento de locos microssatélites para espécies não-modelos só era possível através de metodologias laboratoriais bastante trabalhosas. Entre as técnicas mais utilizadas para esse fim estava o desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites, envolvendo a clonagem de DNA, construção de bibliotecas genômicas e a triagem dos clones obtidos através do sequenciamento de Sanger. Além de ser um processo trabalhoso e demorado, o número de locos obtidos por essa metodologia costumava ser relativamente baixo (tipicamente algumas poucas dezenas), o que fazia com que o custo-benefício fosse muito baixo.

Este cenário começou a mudar em 2009, quando as metodologias de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) começaram a ser utilizadas para a identificação das sequências microssatélites em espécies não-modelos (Allentoft *et al.* 2009). Logo após esse primeiro artigo, outros trabalhos foram publicados mostrando a eficiência desta nova metodologia e a grande redução de custo (duas a cinco vezes menos) e de tempo quando comparado com as metodologias tradicionalmente utilizadas (Abdelkrim *et al.* 2009; Castoe *et al.* 2010; Csencsics *et al.* 2010). Além disso, através do sequenciamento de nova geração é possível identificar de centenas a milhares de locos microssatélites.

Para marsupiais neotropicais, com aproximadamente 100 espécies conhecidas (Gardner 2008), existem locos microssatélites descritos para apenas 11 deles (ver compilação em Almany *et al.* 2009, mais Dias *et al.* 2009 e Valladares-Gómez *et al.* 2019). Neste capítulo apresentamos os primeiros microssatélites isolados e caracterizados para *Gracilinanus agilis* usando dados de sequenciamento de nova geração.

*G. agilis* (Burmeister 1854) é um pequeno marsupial que ocorre principalmente em habitats florestais, como matas ciliares, matas de galeria, savanas florestais (cerradão) e florestas sazonais mesofíticas que vão desde a fronteira do Panamá com a Colômbia até o Peru e Bolívia a leste dos Andes, Paraguai, norte da Argentina e nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (Emmons e Feer 1997; Brown 2004; Gardner 2008). Esta espécie é

insetívoro-onívoro e parece ser um agente de controle biológico em áreas de plantio, além de ser agente dispersor de sementes (Camargo et al. 2011, 2017). *G. agilis* é ainda predado por outras espécies (Souza *et al.* 2010) e é considerado um reservatório selvagem de vários patógenos de interesse na saúde pública e veterinária (Wolf *et al.* 2016; Brandão *et al.* 2019).

Devido à sua ampla distribuição, populações provavelmente grandes, certa tolerância a alguma modificação do habitat e ocorrência em várias áreas protegidas, esta espécie é listada como de menor preocupação pela IUCN (Carmignotto *et al.* 2015). No entanto, mudanças em seu estado de conservação podem ocorrer devido ao declínio contínuo das áreas florestais ao longo de sua distribuição geográfica e ao aumento rápido da fragmentação causada pela ação humana em diferentes fitofisionomias do Cerrado desde a década de 1970 (Klink e Machado 2005). Além disso, pouco se conhece sobre o comportamento reprodutivo e a magnitude da semelparidade nesta espécie, normalmente estudados através de metodologias de ecologia de populações (Lopes e Leiner 2015; Puida e Paglia 2015).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos por nós e apresentados neste capítulo poderão, portanto, ser utilizados para avaliar a estrutura e a diversidade genética existente em suas populações, avaliar o efeito da fragmentação de habitat sobre essa diversidade, e auxiliar no esclarecimento do comportamento reprodutivo da espécie através de análises de paternidade e parentesco genético.

## Material e Métodos

### *Obtenção das amostras e extração do DNA*

Amostras de tecidos (pequenos fragmentos da orelha) de 30 indivíduos foram coletadas no Jardim Botânico de Brasília, como parte de um estudo ecológico de longa duração conduzido por pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Vertebrados (Depto. de Ecologia, UnB), entre os anos de 2013 e 2014. Após a coleta as amostras foram armazenadas em tubos estéreis de polipropileno de 1,5 mL contendo álcool absoluto e mantidas a -20°C até seu processamento em laboratório.

Para o sequenciamento de última geração, usamos uma amostra de tecido de um indivíduo do sexo feminino. O DNA genômico total foi extraído usando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen®), seguindo as orientações do fabricante. Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% e quantificado por meio de um fluorímetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific).

O DNA genômico total das 29 amostras restantes foi isolado através de digestão com proteinase K seguida por extração com fenol-clorofórmio de acordo com protocolo baseado em Sambrook e Russel (2006). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, sendo posteriormente quantificado por espectrofotometria e diluído em água Milli-Q em uma solução de uso contendo aproximadamente 25 ng de DNA/μL.

### *Sequenciamento de nova geração*

Para a identificação de locos microssatélites em *Gracilinanus agilis*, usamos a metodologia de sequenciamento de última geração implementada com o equipamento Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA). Cerca de 1,0 μg de DNA genômico foi usado para preparar a biblioteca de sequenciamento usando o TruSeq Nano DNA HT Sample Preparation Kit (Illumina, EUA). A biblioteca foi então analisada na plataforma Illumina usando estratégia de sequenciamento a partir das duas extremidades dos fragmentos de DNA presentes (*2x250 paired-end*). A preparação e o sequenciamento da biblioteca foram realizados pela GenOne Biotechnologies (<http://www.genone.com.br>). As sequências brutas foram submetidas a uma primeira etapa de triagem para eliminar aquelas com baixa qualidade de leitura.



## *Identificação dos locos microssatélites e desenvolvimento de primers para amplificação dos locos selecionados*

Os locos microssatélites foram identificados a partir dos dados brutos gerados pelo sistema Illumina usando um *pipeline* desenvolvido por Griffiths *et al.* (2016) baseado na ferramenta de bioinformática Galaxy. Esse pacote incorpora uma série de softwares já existentes e um novo *script* de filtragem de dados. Resumidamente, foram realizadas as seguintes análises: i) a qualidade dos *reads* brutos foi avaliada usando a ferramenta FastQC v.0.11.4 (Andrews 2014); ii) as bases de baixa qualidade foram cortadas dos *reads*, e os *reads* de baixa qualidade foram removidos do conjunto de dados usando Trimmomatic v.0.32 (Bolger *et al.* 2014); iii) os *reads* filtrados foram então inspecionados para identificar regiões microssatélites e potenciais locos amplificáveis no Pal\_finder v.0.02.0 (Castoe *et al.* 2012) com pal-filtro e opções de montagem selecionadas para pesquisar locos microssatélites contendo de di a hexanucleotídeos perfeitos e um mínimo de 6 repetições; iv) o desenho dos *primers* foi realizado usando o software Primer3 (Untergasser *et al.* 2012) utilizando como parâmetros comprimento ótimo do *primer* de 20 bp (18 - 25 bp), conteúdo de GC variando de 30% a 80%, temperatura de *melting* variando de 59°C a 61°C, temperatura de anelamento ótima de 60°C, diferença máxima aceitável entre as temperaturas de anelamento dos *primers forward* e *reverse* de 1°C. Todos os parâmetros que não foram especificados aqui foram mantidos de acordo com o padrão do programa.

*Primers* para amplificação de 26 locos contendo tri e tetranucleotídeos foram selecionados de acordo com o tamanho do produto e avaliados por PCR. Quinze locos com os melhores resultados em relação à qualidade do produto amplificado e desempenho foram selecionados e usados em PCRs multiplex, conforme descrito a seguir.

### *PCR multiplex e genotipagem*

Os quinze locos microssatélites selecionados foram combinados em duas reações de PCR multiplex com nove e seis locos em cada (9-plex e 6-plex, respectivamente) de acordo com o tamanho do fragmento gerado (Tabela 1). Para a realização de PCRs multiplexes utilizamos a metodologia proposta por Vartia *et al.* 2014, na qual as PCRs são realizadas com três primers (*primer forward* sintetizado com cauda universal, *primer reverse*, e um *primer* correspondente à cauda universal marcada com um fluoróforo). Foram utilizadas três diferentes caudas universais marcadas com diferentes fluoróforos (Hill: TGACCGGCAGCAAATTG marcada com FAM; Neomycin\_rev: AGGTGAGATGACAGGAGATC marcada com CAL Fluor Orange 560 e M13 (- 21):

TGTAACAACGACGGCCAGT marcada com NED). Esta metodologia permite, através da combinação de diferentes fluoróforos e tamanho dos marcadores selecionados, a amplificação e genotipagem de até 12 locos/amostra simultaneamente, o que torna mais rápido e econômico o processo de caracterização dos locos desenvolvidos e a genotipagem das amostras.

Cada multiplex foi inicialmente testado em oito amostras de *G. agilis*. Após a otimização inicial das PCRs multiplexes, elas também foram feitas para os 22 indivíduos restantes. As reações de PCR multiplex foram realizadas em um volume final de 15 µL contendo aproximadamente 25 ng de DNA, 1x Multiplex PCR Master Mix (Quiagen), 0,05 µM de cada *primer forward* modificado com a cauda apropriada, 0,2 µM de cada *primer reverse*, 0,2 µM de *primer* universal marcado com fluoróforo para cada *primer forward* modificado com a respectiva cauda universal. As condições utilizadas no termociclador para as reações de PCR foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 15 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 90 s e 72°C por 60 s; seguido por 8 ciclos a 94°C durante 30 s, 53°C durante 90 s e 72°C durante 60 s; e uma etapa de extensão final a 72°C por 30min. A qualidade dos produtos amplificados foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR foi adicionada a 7,5 µL de formamida e 0,5 µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems), sendo então desnaturada a 95°C por 5 min. Os produtos desnaturados foram analisados em eletroforese capilar no sequenciador de DNA ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o *plug-in* para microssatélites no software GENEIOUS 6.1.6 (Biomatters), através do qual o tamanho dos alelos encontrados para cada um dos locos foi avaliado.

#### *Caracterização de locos microssatélites*

Os erros de genotipagem (alelos nulos, *allele dropout* e *stutter peaks*) foram avaliados usando o programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004). Diversos softwares foram utilizados para caracterizar os locos microssatélites e a diversidade genética neles encontrada. Para cada loco, o número de alelos ( $A$ ) e o número médio de alelos corrigidos pelo menor tamanho da amostra (riqueza alélica -  $RA$ ) foram estimados usando o software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001), enquanto que as heterozigosidades observadas ( $H_O$ ) e esperadas ( $H_E$ ) foram estimadas usando o software IDENTITY 4 (Wagner e Sefc 1999).

O software GENEPOP 4.3 (Rousset 2008) foi utilizado para testar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados (teste G), testar a ocorrência de

desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) através de um teste de deficiência de heterozigotos, e avaliar a frequência de alelos nulos, usando o algoritmo EM (Dempster *et al.* 1977). As análises acima foram realizadas utilizando 10.000 permutações com 5.000 *batches* e 500 iterações. Probabilidades de exclusão de paternidade ( $P_E$ ) e de identidade ( $P_{ID}$ ) genética foram estimadas para cada loco usando o software IDENTITY 4. Para todas as análises, os valores de  $P$  foram ajustados para testes múltiplos utilizando a correção de Bonferroni (Rice 1989).

## Resultados

Um total de 2.331.566 sequências foram obtidas através do sequenciamento Illumina HiSeq, dos quais 1.941.907 (83,29%) foram retidos após a primeira etapa de triagem. Ao analisarmos essas sequências com a plataforma Galaxy Palfinder encontramos 60.102 regiões contendo microssatélites. Após a filtragem desses dados, restaram 4.192 regiões microssatélites das quais, após a montagem (*assembly*) dos *contigs*, resultaram na identificação de 207 locos para os quais foi possível o desenvolvimento de *primers* para amplificação dos mesmos via PCR. Desses locos, 4 possuíam como *motif* (número de bases no motivo de repetição) hexanucleotídeos, 11 pentanucleotídeos, 98 tetranucleotídeos, 94 trinucleotídeos. Apesar de também encontrarmos milhares de locos dinucleotídeos, estes foram descartados por nós através do estabelecimento de parâmetros de filtragens bastante rígidos durante a confecção dos *primers*, já que representam uma classe de microssatélites mais difíceis de serem genotipados. Essas informações são apresentadas na Quadro 1.

**Quadro 1.** Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de desenvolvimento dos *primers* para a amplificação de locos microssatélites em *Gracilinanus agilis*.

Total de sequências obtidas	2.331.566
Total de sequências trabalhadas	1.941.907
Total de microssatélites encontrados	60.102
Total de locos microssatélites após aplicação dos parâmetros de filtragem	4.192
Total de locos microssatélites, com <i>primers</i> desenhados, após montagem dos <i>reads</i>	207
Quantidade de locos microssatélites para cada um dos <i>motifs</i> selecionados	4 hexanucleotídeos 11 pentanucleotídeos 98 tetranucleotídeos 94 trinucleotídeos

Do conjunto de 207 locos de microssatélites obtidos, 26 (11 tri e 15 tetranucleotídeos) foram selecionados para avaliação e caracterização do polimorfismo encontrado. Destes, 15 (58%) foram amplificados com sucesso e apresentaram produtos de PCR dentro do intervalo de tamanho alélico esperado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação dos 15 novos locos microssatélites descritos para *Gracilinanus agilis* mostrando a sequências dos *primers*, o motivo de repetição, a faixa de tamanho dos alelos encontrados (em pares de base), a cauda utilizada e a combinação multiplex utilizada.

Loco	Primer (5'-3')	Repetição	Min-Max	Cauda	Multiplex
Gag 14	F: GATGGAGTTTCAACATTAGGGC R: TCCCTTAGCCTTAGTTTCTCCC	(ATCT)17	212-248	Hill	1
Gag 19	F: CAAACAATAGCTGCTGAAGCC R: TTTCTTCCTCAAATATCCACC	(ATCT)15	212-260	Neo	1
Gag 21	F: TGACTTAAAAGGCTATCCACTGC R: GTGGCTCAGCAAGTTGTGG	(AAC)14	227-281	M13	1
Gag 93	F: TGATGTTAAACAGTGTGAGTGGC R: TGATCACCTAGGATTTGCTCG	(ATCT)14	278-314	Neo	1
Gag 95	F: TCATACAGCTAGTCAGTACCAGAGC R: GGCTTACACTTGGGTAGGAGG	(ATC)14	290-314	Hill	1
Gag 96	F: CCCTGTCATCCCTACAGTGC R: GCTTCCGCAGACTAACTTGG	(TCC)11	284-308	Hill	2
Gag 115	F: TTGACCCTTACAAATACTCTGGG R: AGAGAACTGAGCAGGCTTGG	(ATT)14	300-342	M13	1
Gag 119	F: TCTGAACCCAGAAAAGCTCC R: GGGAGAGACTTGAGCCACC	(ATC)13	287-317	Neo	2
Gag 122	F: AGCTTAGATCAATTCCTGCCC R: GGCAAAGGAGAAATCTAAAGGC	(AATG)12	311-331	M13	2
Gag 124	F: CGACCATATTCCTCCAGGC R: CATCTCCTTGAACAGGTCCC	(ACC)7	316-319	Hill	2
Gag 155	F: ACAAAGGCATTGGAATTTGG R: TTGTATACTGAAATTCATGTTTGGG	(ATCT)15	343-383	Neo	2
Gag 181	F: TGTAGGCTGAACTATTTGAGATGG R: GAAGGAGGCCACTGTTTGG	(AAC)11	364-379	Hill	1
Gag 189	F: GCTGCACCATTAGAGACTACTGC R: TGCCTCCCTTCATATTGTCC	(ATCT)12	388-404	Neo	1
Gag 192	F: AACCTTGATTATGGTGACTCC R: ACTGCCAGATAAAAATTTCCCC	(ATGG)10	384-404	M13	1
Gag 197	F: CACAAAAGACAATGGAGAGGC R: GCGGGAACATAGAATGAAGG	(ATC)17	390-405	Hill	2

O teste de desequilíbrio de ligação não foi significativo para nenhuma das comparações feitas após aplicar a correção de Bonferroni ( $p < 0,000476$ ), indicando a segregação independente dos locos avaliados. A análise com o software Micro-cheker indicou a possível presença de alelos nulos em quatro locos (Gag 14, Gag 96, Gag 181 e Gag 192), além da presença de *stutter bands*, e possíveis erros de genotipagem, para o loco Gag 181. A estimativa de alelos nulos mostrou que os locos Gag 96, Gag 124, Gag 181 e Gag 192 apresentaram frequência de alelos nulos superior a 20%. Além disso, os locos Gag 96, Gag 181 e Gag 192 apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,0033$  - Tabela 2).

Todos os 15 locos mostraram-se polimórficos. O número médio de alelos por loco foi 7,73, com o número de alelos por loco variando de 2 a 15. A heterozigiosidade observada média foi igual a 0,63, variando de 0,17 a 0,97, enquanto que a heterozigiosidade esperada média foi igual a 0,72, variando de 0,48 a 0,91 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracterização de 15 locos microssatélites para *Gracilinanus agilis*: número de indivíduos genotipados ( $N$ ), número de alelos ( $N_A$ ), riqueza alélica ( $RA$ ), heterozigiosidade observada ( $H_O$ ), heterozigiosidade esperada ( $H_E$ ), frequência de alelos nulos ( $F_{AN}$ ), probabilidade de exclusão de paternidade ( $P_E$ ) e probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ). Desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni estão indicados em negrito ( $p < 0,0033$ ).

Loco	$N$	$N_A$	$RA$	$H_O$	$H_E$	Valor de $p$	$F_{AN}$	$P_E$	$P_{ID}$
Gag 14	30	9	8,24	0,60	0,77	0,14	0,09	0,55	0,09
Gag 19	30	10	9,45	0,67	0,80	0,07	0,12	0,60	0,07
Gag 21	28	10	9,64	0,64	0,65	0,44	0,04	0,45	0,15
Gag 93	30	9	8,66	0,90	0,85	0,15	0,00	0,67	0,05
Gag 95	30	8	7,71	0,77	0,80	0,11	0,13	0,60	0,07
Gag 96	23	8	8,00	0,30	0,79	<b>0,00</b>	0,35	0,59	0,07
Gag 115	30	15	14,70	0,83	0,93	0,33	0,16	0,83	0,01
Gag 119	30	7	6,71	0,93	0,78	0,32	0,07	0,56	0,09
Gag 122	30	6	5,94	0,77	0,75	0,92	0,00	0,50	0,11
Gag 124	30	2	1,77	0,03	0,03	-	0,98	0,02	0,94
Gag 155	29	11	10,50	0,97	0,87	0,24	0,02	0,72	0,03
Gag 181	30	5	4,71	0,17	0,49	<b>0,00</b>	0,26	0,26	0,32
Gag 189	29	5	5,00	0,62	0,72	0,31	0,14	0,48	0,12
Gag 192	30	6	5,77	0,43	0,79	<b>0,00</b>	0,34	0,56	0,09
Gag 197	30	5	5,00	0,80	0,78	0,59	0,11	0,55	0,09
Média	---	7,73	7,45	0,63	0,72	<b>0,00</b>	---		
Todos os locos combinados:								0,999	$3,45 \times 10^{-16}$

## Discussão e Conclusões

Comparando com locos já descritos para espécies próximas de marsupiais neotropicais, a heterozigosidade encontrada para *G. agilis* foi menor em relação à *Didelphis virginiana* e *Philander opossum*, que apresentaram médias de heterozigosidade esperada de 0,77 e 0,84 respectivamente (Guillemin *et al.* 2000; Fike *et al.* 2009). Já em um estudo com *Marmosa paraguayana* (Rodrigues *et al.* 2006), a heterozigosidade média esperada foi de 0,43, inferior à encontrada em nosso trabalho para *G. agilis* (0,71). Vários fatores podem influenciar esses valores, incluindo o tamanho populacional, a subdivisão populacional (seja ela natural ou antrópica), a ocorrência de endogamia, o número de indivíduos analisados, entre outros.

Três locos (Gag 96, Gag 181 e Gag192) apresentaram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) após correção de Bonferroni ( $p < 0,0033$ ), possivelmente devido à presença de alelos nulos. A frequência de alelos nulos para esses locos está acima de 0,20, o que é considerado uma frequência alta de acordo com Chapuis e Estoup (2007). Este erro de genotipagem é comum em estudos com microssatélites e pode ser devido a uma mutação na região onde o *primer* se liga, resultando na falha de amplificação de um dos alelos presentes em indivíduos heterozigotos (Pompanon *et al.* 2005). Nestes casos, o redesenho de *primers* pode ser uma alternativa para se evitar essas regiões (Pemberon *et al.* 1995). Em geral, locos que apresentam uma alta frequência de alelos nulos são excluídos durante a realização de análises genéticas populacionais, já que sua presença pode causar estimativas erradas de alguns índices. Entretanto, alguns programas computacionais são capazes de acomodar a análise com locos que apresentam frequência baixa ou intermediária de alelos nulos, o que permite aumentar o número de locos utilizados em um determinado estudo (Kalinowski *et al.* 2007; Carlsson 2008).

Apesar de todas as amostras serem oriundas do Jardim Botânico de Brasília, elas foram coletadas em dois pontos (chamados JB1 e JB2), distantes cerca de 6,4 km um do outro. Desta forma, também é possível que os desvios do EHW observados sejam decorrentes de uma subdivisão populacional, fenômeno conhecido como Efeito Wahlund (Dharmarajan *et al.* 2013).

Mesmo considerando os locos que apresentam desvios do EHW e alelos nulos, nós encontramos uma baixa probabilidade de identidade ( $3,45 \times 10^{-16}$ ) e uma alta probabilidade de exclusão de paternidade (0,999), o que mostra o potencial dos marcadores aqui descritos para a realização de estudos relacionados à determinação do parentesco e paternidade. Além disso,

esses novos marcadores poderão ser utilizados para a avaliação da diversidade genética presente na espécie, contribuindo assim para a realização de estudos populacionais que contribuam para o monitoramento e conservação de suas populações.

Em conclusão, a técnica utilizada, de sequenciamento de nova geração (NGS), foi útil para realizar o objetivo desse trabalho, resultando em um total de quinze locos de microssatélites desenvolvidos e caracterizados para *G. agilis*. A caracterização dos locos utilizando os trinta indivíduos amostrados indicou altos níveis de variação genética. Além de serem úteis para avaliar a diversidade, estrutura genética e biologia reprodutiva da espécie, esses locos de microssatélites podem ser utilizados em outras espécies de marsupiais, ampliando os estudos que podem ser realizados a partir dessa ferramenta genética desenvolvida nesse trabalho.



## Capítulo 2

# **Análise do parentesco em uma população de *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) por meio do uso de locos de microssatélites e avaliação da estratégia reprodutiva apresentada pela espécie**

## Abstract

Animals may have reproductive strategies that allow us to classify them in a gradient that varies from semelparous species to iteroparous species. Semelparous species usually reproduce only once and are on the “fast” end of this gradient: they are organisms with less longevity and high fecundity. Semelparity is a rare evolutionary strategy in vertebrates, but it occurs in marsupials of the Didelphidae (American) and Dasyuridae (Australian) families. The species *Gracilinanus agilis*, a didelphid marsupial, shows strong evidence of the existence of semelparity, based on post-reproductive survival estimates determined using the capture-mark-recapture method and physiological parameters. The present study aimed to evaluate the occurrence of semelparity in this marsupial species through the use of microsatellite markers. For this, 14 microsatellite loci were used in multiplex PCR reactions in a total of 305 individuals from a population of the Federal District in Brazil, and the genotypes obtained were used to assess populational genetic diversity. From this first analysis, 12 loci were selected and used in tests of kinship and attribution of paternity/maternity over different reproductive seasons, making it possible to infer the occurrence and magnitude of semelparity in *G. agilis*. Our results are compatible with those presented by studies of demographic and physiological variation, and show that the individuals of a generation are, for the most part, offspring of individuals from immediately previous generation, having almost no overlap between individuals from the different reproductive cohorts for both sexes. We suggest the occurrence of facultative semelparity in the species, where most individuals are semelparous, although it is possible that a small portion survive and participate in more than one reproductive event. Our study fills some gaps that still exist about the reproductive biology of the species and reinforces the importance of genetic analysis along with population dynamics and physiological studies to assess reproductive strategies in small mammals.

**Keywords:** *Gracilinanus agilis*, microsatellite markers, parentage test, reproductive strategy, semelparity.

## Resumo

Os animais podem apresentar estratégias reprodutivas que permitem classificá-los em um gradiente que varia de espécies semélpas a espécies iteróparas. As espécies semélpas geralmente se reproduzem uma única vez e se encontram no extremo “rápido” desse gradiente: são organismos com menos longevidade e alta fecundidade. A semelparidade é uma estratégia evolutiva rara em vertebrados, porém ocorre em marsupiais das famílias Didelphidae (americanos) e Dasyuridae (australianos). A espécie *Gracilinanus agilis*, um marsupial didelfídeo, apresenta fortes evidências para existência de semelparidade, a partir de estimativas de sobrevivência pós-reprodutiva baseadas no método de captura-marcação-recaptura e em parâmetros fisiológicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de semelparidade nessa espécie de marsupial através do uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Para isso, 14 locos de microssatélites foram utilizados em reações de PCR multiplex em um total de 305 indivíduos de uma população do Distrito Federal, e os genótipos obtidos foram utilizados para avaliar a diversidade genética populacional. A partir dessa primeira análise, 12 locos foram selecionados e utilizados em testes de parentesco e de atribuição de paternidade/maternidade entre indivíduos ao longo de diferentes estações reprodutivas, sendo com isso, possível inferir a ocorrência e a magnitude da semelparidade em *G. agilis*. Nossos resultados são compatíveis com aqueles apresentados por estudos de variação demográfica e fisiológica, com os indivíduos de uma geração sendo, na maior parte, filhos dos indivíduos da geração imediatamente anterior, não havendo quase sobreposição entre indivíduos de diferentes coortes reprodutivas para ambos os sexos. Sugerimos a ocorrência de semelparidade facultativa na espécie, onde a maioria dos indivíduos são semélpas, sendo, porém, possível que uma pequena parcela sobreviva e participe de mais de um evento reprodutivo (apresentando sobrevivência variável ao longo dos anos e entre populações). Nosso estudo preenche algumas lacunas ainda existentes sobre a biologia reprodutiva da espécie e reforça a importância da utilização de análises genéticas em conjunto com estudos de dinâmica populacional e de fisiologia para avaliar as estratégias reprodutivas em pequenos mamíferos.

**Palavras-chaves:** *Gracilinanus agilis*, marcadores microssatélites, teste de parentesco, estratégia reprodutiva, semelparidade.

## Introdução

Existe uma diversidade de padrões de história de vida, que é consequência de uma esperada seleção natural para formação de populações eficientes, aptas a sobreviver às condições que seu ambiente lhe oferece (Cole 1954). Características da história de vida, como fecundidade total, longevidade máxima e idade de reprodução e morte, estão relacionadas com o tipo de estratégia reprodutiva apresentada pela espécie, a qual interfere diretamente nas taxas de natalidade, mortalidade e na composição etária da população, regulando o tamanho populacional (Sinclair 2003).

Em estudos demográficos com populações de pequenos mamíferos é possível observar a estratégia reprodutiva por meio dos seus efeitos na densidade populacional e pelas taxas de sobrevivência estimadas pré e pós o período de acasalamento (Martins *et al.* 2006b; Puida e Paglia 2015). A semelparidade é uma estratégia reprodutiva onde há o investimento da energia disponível em um período curto de reprodução intensa (Naylor *et al.* 2008; Fisher *et al.* 2013). Dessa forma, os organismos semélparos participam de um único evento reprodutivo na vida, devido a “troca” (*trade-off*) da sobrevivência pela reprodução (Lee e Cockburn 1985). Em contraste, espécies iteróparas participam de vários eventos reprodutivos ao longo da vida, sendo a estratégia mais comum entre mamíferos com exceção de algumas espécies de marsupiais (Braithwaite e Lee 1977).

Duas famílias de marsupiais apresentam espécies registradas com casos de semelparidade: Dasyuridae, na Oceania, em seis gêneros incluindo 22 espécies (ver compilação em Dickman e Braithwaite 1992, Dickman *et al.* 2001 e Hayes *et al.* 2019) e Didelphidae, nas Américas, em quatro gêneros incluindo 5 espécies (Lorini *et al.* 1994; Leiner *et al.* 2008; Baladrón *et al.* 2012; Lopes e Leiner 2015; Albanese *et al.* 2021). Nos marsupiais australianos, espécies dos gêneros *Antechinus* e *Phascogale* apresentam semelparidade restrita aos machos, com a mortalidade abrupta total dos machos (*die-off*) após o período reprodutivo e fêmeas sobrevivendo e podendo se reproduzir mais de uma vez (Braithwaite e Lee 1977; Krajewski *et al.* 2000). Em marsupiais neotropicais a mortalidade completa de indivíduos de ambos os sexos já foi relatada nos gêneros *Marmosops* e *Monodelphis* (Leiner *et al.* 2008; Baladrón *et al.* 2012), o que também já foi observado em uma espécie de dasiurídeo, *Ningauiridei* (Dickman *et al.* 2001).

Estudos com dasiurídeos dos gêneros *Dasyurus*, *Parantechinus* e *Dasyculate* relataram diferentes resultados para mortalidade dos machos dentro da mesma espécie, observando o seu completo desaparecimento (Dickman e Braithwaite 1992; Hayes *et al.*

2019) ou uma proporção de machos sobreviventes (Begg 1981; Mills e Bencini 2000). As divergências observadas na ocorrência da semelparidade evidencia a plasticidade dessa estratégia reprodutiva em marsupiais, que além de variar entre populações de uma mesma espécie pode variar em uma mesma população ao longo dos anos (Schmitt *et al.* 1989; Dickman e Braithwaite 1992; Oakwood *et al.* 2001). Essas variações levam à classificação das populações dentro de um gradiente de estratégias reprodutivas, em que a semelparidade obrigatória (*die-off*) representa um extremo, passando pela semelparidade facultativa (Mills e Bencini 2000) e parcial (Boonstra 2005; Martins *et al.* 2006a), até chegar na iteroparidade (Lee *et al.* 1982) no outro extremo. A forma em que a semelparidade ocorre pode ser explicada por fatores ambientais e evolutivos (Krajewski *et al.* 2000; Mills e Bencini 2000), podendo resultar em gerações discretas ou em indivíduos adultos de ambos os sexos e de diferentes gerações se sobrepondo ao longo dos eventos reprodutivos.

A mortalidade dos machos pós-acasalamento, por ser mais evidente do que nas fêmeas em espécies semélparas, já foi melhor compreendida, e parece ser consequência de uma intensa competição por fêmeas durante um período curto e sincronizado de reprodução intensa (Oakwood *et al.* 2001; Bradley 2003). As consequências são feridas ao longo do corpo, aumento da agressividade e do estresse, falhas nos sistemas imune e inflamatório, aumento da infestação por parasitas, perda de peso e pelos, desenvolvimento de anemia, degradação de órgãos e possível morte do indivíduo (Bradley 2003; Boonstra 2005; Naylor *et al.* 2008). Embora para marsupiais australianos as causas fisiológicas para mortalidade dos machos sejam bem estudadas (Lee *et al.* 1977; Bradley *et al.* 1980; Bradley 2003; Naylor *et al.* 2008), para marsupiais americanos ainda há uma carência dessas informações. No estudo de Zangrandi (2018) foram encontradas alterações hormonais características de uma resposta adaptativa ao estresse relacionado a uma estratégia semélpara em *Gracilinanus agilis*, espécie alvo do presente trabalho.

*Gracilinanus agilis* é um pequeno marsupial neotropical de hábito escansorial, solitário e noturno (Emmons e Feer 1997). Sua dieta é constituída principalmente de insetos e frutos (Camargo *et al.* 2014), o que o torna provavelmente um agente de controle biológico em áreas de plantio e um importante agente dispersor de sementes (Camargo *et al.* 2011, 2017). A reprodução é sazonal e sincronizada entre os indivíduos com início da fase de acasalamento no final da estação seca e com as fases da lactação e pós-desmame (períodos de maior demanda energética para as fêmeas), durante a estação quente e úmida quando há maior disponibilidade de recursos alimentares (Lee e Cockburn 1985; de Andreazzi *et al.* 2011). A semelparidade já foi estudada nesta espécie, sendo encontrada diferenças na adoção dessa

estratégia reprodutiva entre populações de diferentes localidades. No estudo de Lopes e Leiner (2015) gerações discretas e não sobrepostas foram observadas para ambos os sexos, com a mortalidade total dos indivíduos. Já em outros dois estudos (Martins *et al.* 2006a; Puida e Paglia 2015) é relatado a sobrevivência de alguns indivíduos machos e fêmeas até o próximo evento reprodutivo. Esses trabalhos foram realizados utilizando-se a metodologia de captura-marcação-recaptura, sendo suas conclusões baseadas na observação de flutuações populacionais de machos e fêmeas ao longo do tempo, persistindo ainda incertezas relacionadas ao desenho amostral utilizado, ocorrência de eventos de dispersão (emigração) e capacidade reprodutiva dos indivíduos recapturados em diferentes períodos de reprodução.

Tendo em vista a hipótese de semelparidade na espécie estudada, buscamos avaliar no presente trabalho a ocorrência dessa estratégia reprodutiva em uma população de *Gracilinanus agilis* encontrada em uma área de Cerrado do Distrito Federal. Para tanto, utilizamos os marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie (Capítulo 1) em análises de parentesco genético e de atribuição parental entre os indivíduos amostrados ao longo de diferentes gerações, conforme descrito a seguir.

## Material e Métodos

### Área de estudo e obtenção das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas na Área de Proteção Ambiental (APA) Gama-Cabeça de Veado (APAGCV), localizada ao sul do Distrito Federal (DF) distante cerca de 16 km da região central de Brasília-DF. A APAGCV possui cerca de 10.000 ha de área protegida contínua e abrange o Jardim Botânico de Brasília (JBB-GDF), a Reserva Ecológica do IBGE e a Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB). As amostras de *Gracilinanus agilis* foram coletadas em uma mancha de Cerradão localizada no JBB, e a captura dos indivíduos foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Vertebrados (Ecovert) da Universidade de Brasília (IB/UnB) durante o desenvolvimento de um estudo de longa duração. A área amostrada foi denominada JB2 (Figura 5) ( $15^{\circ}55'25.6''S$   $47^{\circ}49'59.3''W$ ) e possui 27,33 ha de cerradão imerso em uma matriz de cerrado *sensu strictu*.



**Figura 5.** Área de estudo denominada JB2 (ponto amarelo), localizada no Jardim Botânico de Brasília (representado pelo número “1”), dentro da APA Gama e Cabeça-de-Veado (delimitada pela linha em vermelho). Fonte: Imagem satélite *Google Maps*.

Nesse fragmento de cerradão foi disposta uma grade de 1,44 ha (120 m x 120 m) composta por nove linhas paralelas, cada uma com nove estações de captura dispostas a cada 15 m, totalizando 81 estações de captura. Em cada uma dessas estações foram colocadas duas armadilhas do tipo Sherman (23 cm x 9 cm x 8 cm), sendo uma no sub-bosque a cerca de dois metros de altura e outra no solo, utilizando como isca uma mistura de óleo de fígado de bacalhau, fubá, banana, essência de baunilha e pasta de amendoim. A amostragem foi realizada por seis noites consecutivas a cada três meses, entre os anos de 2013 e 2017 (Zangrandi 2018).

Os indivíduos capturados pela primeira vez foram marcados com brincos numerados em ambas as orelhas para prevenir a perda da identificação individual. Um pequeno fragmento de tecido da orelha de cada indivíduo foi coletado e armazenado em tubos de polipropileno contendo álcool absoluto, sendo mantidos sob refrigeração até o envio para o laboratório. Para cada amostra foram anotados o número de campo do animal, sexo, data de coleta, informações biométricas, peso e o padrão de erupção dentária para determinação da idade (filhotes, jovens, subadultos e adultos). Indivíduos que vierem a óbito durante as campanhas foram taxidermizados e depositados na Coleção de Mamíferos da Universidade de Brasília (CMUNB).

No laboratório, os tecidos coletados e armazenados em tubos contendo álcool etílico absoluto foram mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA, a qual foi realizada através do método de fenol:clorofórmio de acordo com protocolo baseado em Sambrook e Russel (2006). Após a extração o DNA das amostras foi quantificado por espectrofotometria e diluído em água Milli-Q em uma solução de uso contendo aproximadamente 25 ng/ $\mu\text{L}$ .

### *Genotipagem dos locos microssatélites*

Um conjunto de 14 locos microssatélites isolados e caracterizados por nós (Capítulo 1) foi amplificado via reações de PCR multiplex, seguindo o protocolo descrito por Vartia *et al.* 2014, para o conjunto total de amostras (n=305). Os quatorzes locos microssatélites foram combinados em duas reações de PCR multiplex, uma com nove e a outra com cinco locos (9-plex e 5-plex), de acordo com o tamanho dos fragmentos (ver Capítulo 1). As PCRs multiplex foram realizadas utilizando o kit de PCR multiplex da Qiagen (Qiagen Multiplex PCR Kit) em um volume final de 15  $\mu\text{L}$  contendo aproximadamente 25ng de DNA, 1x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0,05  $\mu\text{M}$  de cada *primer forward* modificado com a cauda apropriada, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer reverse*, 0,2  $\mu\text{M}$  de *primer* universal marcado com fluoróforo para cada *primer forward* modificado com a respectiva cauda universal. Controles negativos (sem



DNA) foram incluídos para monitorar a possível ocorrência de contaminação. As PCRs multiplex foram realizadas utilizando-se o seguinte ciclo de temperatura: 95°C por 15 minutos seguido por 30 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 90s e 72°C por 60s, seguidos de 8 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 90s e 72°C por 60s, e finalmente 72°C por 30 minutos.

O sucesso e a qualidade da amplificação foram avaliados através de uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Após a avaliação da qualidade do produto amplificado, preparamos uma solução contendo 2,0 µL de produto do PCR multiplex, 7,6 µL de formamida e 0,4 µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems), a qual foi desnaturada à 95°C por 5 minutos e analisada em eletroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o software GENEIOUS 6.1.6 (Biomatters), através do qual o tamanho dos alelos e os genótipos presentes em cada loco/indivíduo foram determinados.

### *Análise da diversidade genética*

Depois de obtido os genótipos de todos os indivíduos, diversas análises foram realizadas para avaliar a diversidade genética populacional (n=305) e selecionar os locos utilizados nas análises de parentesco. Os erros de genotipagem (alelos nulos, *large allele dropout* e *stutter peaks*) foram verificados no programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) com 10.000 repetições e intervalo de confiança de 95%. A frequência de alelos nulos por loco foi estimada usando o algoritmo EM (Dempster *et al.* 1977) no programa FREENA (Chapuis e Estoup 2007).

O software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001) foi utilizado para testar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos utilizados (usando o teste G), a ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (deficiência de heterozigotos) e realizar a caracterização da diversidade genética populacional utilizando os seguintes índices: número de alelos por loco ( $A$ ) e sua média, riqueza alélica ( $RA$ ), a heterozigosidade esperada (diversidade gênica  $H_E$ ) (Nei 1987), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) (Weir e Cockerham 1984) e o valor de significância ( $p$ ) relacionado ao  $F_{IS}$ . Os parâmetros utilizados para realizar as análises mencionadas foram de 10.000 permutações, 10.000 *batches* e 5.000 iterações. Para todas as análises, os valores de  $P$  foram ajustados para testes múltiplos usando o procedimento de Bonferroni (Rice 1989). As probabilidades de não exclusão de paternidade ( $P_{NE}$ ) e não exclusão de identidade ( $P_{NID}$ ) foram estimadas para cada

loco e para a combinação de todos os locos usando o programa CERVUS (Kalinowski *et al.* 2007).

#### *Estimativa do coeficiente de parentesco e classificação dos pares de indivíduos analisados em categorias de relacionamento*

A análise do coeficiente de parentesco entre os indivíduos amostrados, e a sua classificação em categorias de relacionamento, foram realizadas utilizando-se o software ML-Relate (Kalinowski *et al.* 2006). Esse programa calcula o parentesco entre indivíduos utilizando uma estimativa de máxima-verossimilhança, o que apresenta várias vantagens em relação à outros índices comumente utilizados, como por exemplo uma menor variação (menor erro padrão), uma interpretação biológica mais direta do resultado, já que as estimativas de probabilidade ficam restritas à faixas de valores com significado biológico, e uma maior facilidade para acomodar diferentes conjuntos de dados genéticos (Milligan 2003). Além da obtenção do coeficiente de parentesco, o programa permite ainda a classificação dos pares de indivíduos analisados em quatro categorias de relacionamento (U: não relacionados, HS: meio irmãos, FS: irmãos-completos, PO: pai/mãe e filho), fornecendo a probabilidade (*log-likelihood*) do relacionamento mais provável e sua diferença (*relative log-likelihood*) para as demais categorias. Utilizamos 10.000 permutações e informamos os locos que apresentaram frequência de alelos nulos acima de 2% (Gag 119 e Gag 192).

#### *Análise de alocação parental*

O programa Cervus v.3.0.7 (Kalinowski *et al.* 2007) foi utilizado para avaliar, de forma probabilística, a paternidade e maternidade entre os indivíduos amostrados. Para tanto, 304 indivíduos foram inicialmente separados em gerações, levando em consideração a data de coleta e a faixa etária determinada de acordo com características morfológicas obtidas durante o trabalho de campo (padrão de erupção dentária, tamanho corporal, peso, e desenvolvimento das glândulas mamárias e da bolsa escrotal). Dessa forma, o número de indivíduos em cada geração (2014, 2015, 2016, 2017 e 2018) foi correspondente à 74, 76, 86, 54 e 14, respectivamente (excluímos desta análise o único indivíduo da geração de 2013). Após a separação dos indivíduos em diferentes gerações, realizamos quatro análises separadas, cada uma referente a uma geração de filhos (2015, 2016, 2017 e 2018) e seus possíveis pais (sendo considerados como candidatos a pais os machos e fêmeas pertencentes às duas gerações anteriores à geração filial analisada).

Para cada uma das análises nós inicialmente realizamos uma simulação para determinar valores críticos de LOD que fornecessem um nível de confiança de 95% (confiança estrita) e 80% (confiança relaxada) durante as atribuições de paternidade/maternidade nos nossos dados reais. Essas simulações foram realizadas utilizando as frequências alélicas do conjunto total de genótipos incluídos na análise de determinada geração (genótipos dos candidatos a pais + genótipos das candidatas a mães + genótipos dos filhos), uma proporção de locos genotipados entre 0,995 e 1,0 e taxa de erro de genotipagem igual a 1,5%. A proporção de candidatos a pais amostrados foi estabelecida como 60% para machos e fêmeas nas análises de 2015, 2016 e 2017, e de 50% na análise de 2018 e o número de filhos testados correspondeu aos indivíduos de cada geração. No total foram feitas 100.000 simulações para cada análise, gerando valores críticos de LOD para a identificação do candidato mais provável a pai, à mãe, e ao par de pais. Após esse procedimento realizamos a análise de alocação parental utilizando os genótipos reais dos indivíduos analisados, comparando os valores de LOD encontrados para cada pai, mãe e trio (par de pais + filho) com os valores críticos de LOD pré-estabelecidos durante a simulação. Posteriormente, as atribuições com LOD acima do LOD crítico e com níveis de confiança de 95% ou 80% foram analisadas em conjunto com o resultado do ML-Relate, como descrito a seguir.

#### *Crítérios utilizados para a atribuição final da paternidade/maternidade*

Os resultados obtidos através das duas análises descritas anteriormente foram analisados em conjunto para realizar a atribuição do relacionamento de pais e filhos entre os indivíduos analisados. Para tanto, foram considerados os seguintes critérios (apresentados também na tabela 3):

1. ML-Relate = PO e Cervus = 95% de confiança na identificação do pai/mãe verdadeiro
2. ML-Relate  $\neq$  PO e Cervus = 95% de confiança na identificação do pai/mãe verdadeiro
3. ML-Relate = PO e Cervus = 80% de confiança na identificação do pai/mãe verdadeiro
4. ML-Relate = PO e Cervus = Sem atribuição de confiança, mas com LOD  $\geq$  que o valor crítico e 95% de confiança para o trio formado por filho+mãe+pai

**Tabela 3.** Critérios utilizados para considerar atribuições de parentescos ao analisar o resultado dos dois programas em conjunto.

<b>Critérios</b>	<b>ML- RELATE</b>	<b>CERVUS</b>
<b>1.</b>	PO	95%
<b>2.</b>	HS/FS	95%
<b>3.</b>	PO	80%
<b>4.</b>	PO	---

Atribuições que apresentaram como resultado ML-Relate = HS ou FS e/ou Cervus  $\leq$  80% foram descartados.

Nas situações onde dois ou mais candidatos com valores de LOD próximos foram atribuídos como possíveis pais ou mães de um indivíduo, utilizamos o número de incompatibilidades (*mismatches*) como critério de desempate, assumindo a atribuição correta àquele apresentando o menor número de incompatibilidades.

Já nos casos onde, individualmente, o candidato a pai e a mãe atingiram o critério estabelecido no item 1 acima, mas que juntos eram incompatíveis como um casal (nível de confiança do Trio  $<$  80%, com muitos *mismatches*), selecionamos apenas um dos candidatos, sendo este o que apresentava o maior valor de LOD entre eles.

## Resultados

### *Diversidade genética*

Um total de 305 indivíduos foram utilizados nas análises de diversidade genética, sendo 159 machos e 145 fêmeas. A análise com os 14 locos testados (Anexo 1) indicou uma alta frequência de alelos nulos para o loco Gag 181 ( $F_{AN} = 0,18$ ). Tanto este loco, como o loco Gag 96, apresentaram um desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e déficit de heterozigotos ( $P_{Fis} = 0,036$ ), e foram excluídos das análises posteriores.

Entre os 12 locos restantes utilizados nas análises de parentesco (Tabela 4), o número de alelos variou de 6 a 18, com um valor médio de 10,083/loco e uma riqueza alélica média semelhante. A heterozigosidade esperada média foi de 0,798 (intervalo: 0,677–0,919), enquanto a heterozigosidade observada média foi 0,801 (intervalo: 0,685–0,915). Com exceção dos locos Gag 119 e Gag 192, todos os demais encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Apesar desses dois locos apresentarem um desvio do EHW, a deficiência de heterozigotos observada é bastante pequena, o que reflete numa baixa frequência de alelos nulos. A frequência de alelos nulos no conjunto de locos analisados foi igual à 0,007 (variando entre 0 e 0,04), enquanto que o coeficiente geral de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi igual à -0,003 (variando entre -0,08 e 0,06)

As probabilidades de não exclusão de paternidade combinada, ou seja, a probabilidade de que um indivíduo que não é pai seja considerado um pai verdadeiro, foram baixas: 0,00058 para primeiro progenitor e 0,00000548 para o segundo progenitor (assumindo que o primeiro progenitor foi atribuído corretamente; Tabela 4). A probabilidade de não exclusão de identidade combinada, ou seja, a probabilidade média de que o conjunto de locos não consiga diferenciar dois indivíduos selecionados aleatoriamente, foi de  $2,105 \times 10^{-15}$ .

**Tabela 4.** Caracterização de 12 locos microssatélites para análises de parentesco em *Gracilinanus agilis*: número de indivíduos genotipados ( $N$ ), número de alelos ( $N_A$ ), riqueza alélica ( $RA$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endogamia ( $FIS$ ), frequência de alelos nulos ( $F_{AN}$ ), probabilidade de exclusão de paternidade ( $P_{NE}$ ) para o primeiro e segundo candidato e probabilidade de identidade ( $P_{NID}$ ). Desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni estão indicados em negrito ( $p < 0,004$ ).

Locos	$N$	$N_A$	$RA$	Min-Max	$H_O$	$H_E$	Valor de P (EHW)	$F_{IS}$	$F_{AN}$	$P_{NE-1}$	$P_{NE-2}$	$P_{NID}$
<b>Gag14</b>	305	10	9,997	210-250	0,807	0,818	0,3990	0,014	0,001	0,533	0,359	0,058
<b>Gag19</b>	304	12	12,000	208-260	0,845	0,847	0,0645	0,002	0,010	0,464	0,300	0,040
<b>Gag21</b>	305	16	15,993	224-290	0,685	0,677	0,8409	-0,012	0,000	0,701	0,512	0,127
<b>Gag93</b>	305	8	8,000	276-308	0,839	0,817	0,9241	-0,027	0,000	0,533	0,358	0,057
<b>Gag95</b>	305	10	10,000	290-317	0,820	0,814	0,1399	-0,007	0,006	0,526	0,350	0,054
<b>Gag115</b>	305	18	17,993	300-351	0,915	0,919	0,6621	0,004	0,000	0,285	0,167	0,013
<b>Gag119</b>	305	10	10,000	288-327	0,757	0,769	<b>0,0000</b>	0,015	0,022	0,608	0,427	0,082
<b>Gag122</b>	305	6	6,000	311-331	0,810	0,750	0,9790	-0,080	0,000	0,650	0,469	0,100
<b>Gag155</b>	305	11	11,000	343-383	0,843	0,861	0,2375	0,022	0,006	0,438	0,278	0,035
<b>Gag189</b>	305	7	7,000	388-412	0,764	0,730	0,6709	-0,046	0,000	0,668	0,485	0,107
<b>Gag192</b>	305	6	6,000	384-404	0,734	0,782	<b>0,0000</b>	0,061	0,040	0,609	0,430	0,083
<b>Gag197</b>	305	7	7,000	381-408	0,787	0,791	0,7238	0,005	0,000	0,588	0,409	0,075
<b>Média</b>	---	10,083	10,082	---	0,801	0,798	<b>0,0026</b>	-0,003	0,0072	0,00058	$5,48 \times 10^{-6}$	$2,105 \times 10^{-15}$

### *Parentesco e categorias de relacionamento*

Através da análise realizada com o software ML-Relate foi possível identificar 256 pares de indivíduos dentro da categoria de relacionamento pai-filho (PO) entre as gerações (Gráfico 1), sendo 134 entre pai e filho (denominados por nós como FO – Father/Offspring) e 122 entre mãe e filho (denominados por nós como MO – Mother/Offspring).

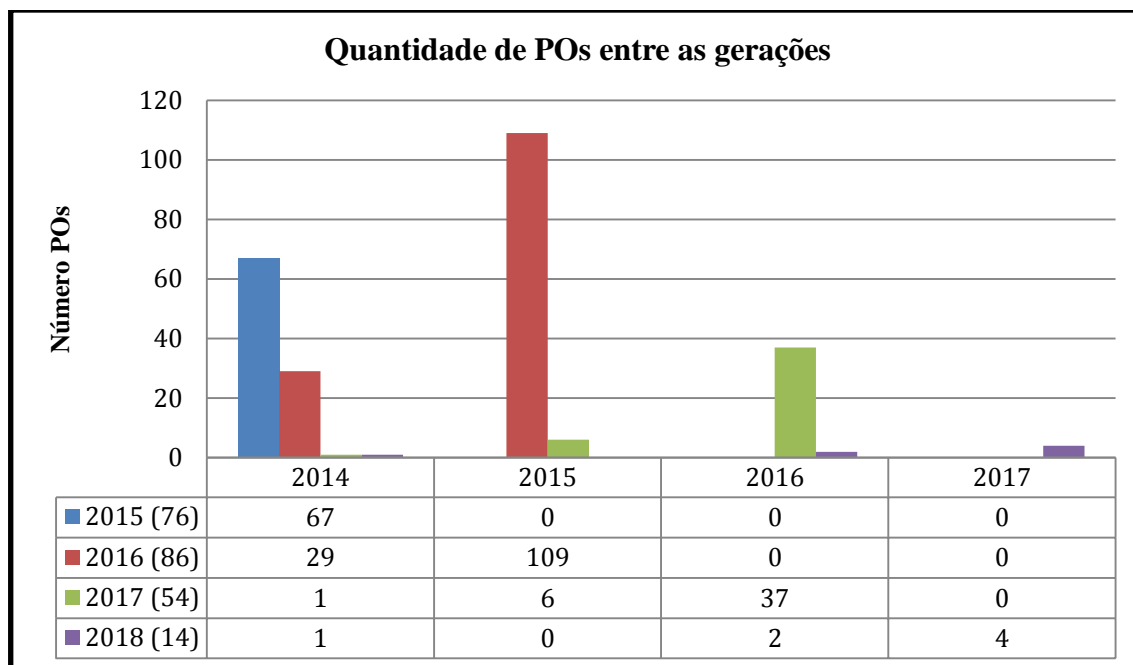
Das 256 relações PO encontradas, 217 (84,77%) foram observadas entre gerações subsequentes (ou seja: Pais no ano X, Filhos no ano X + 1). Destas, foram identificadas 67 relações POs (sendo 31 MO e 36 FO) entre indivíduos de 2014 e 2015, 109 POs (MO52; FO57) entre indivíduos de 2015 e 2016, 37 POs (MO22; FO15) entre indivíduos de 2016 e 2017 e 4 POs (todos FO) entre indivíduos de 2017 e 2018 (Tabela 5).

Os outros 39 relacionamentos da categoria PO encontrados (ou seja, 15,23% do total) foram observados entre indivíduos de gerações não subsequentes. Destes, 94,87% (37 POs, correspondentes à 14,45% do total) foram encontrados pulando uma geração (ou seja: Pais no ano X, Filhos no ano X+2), enquanto que apenas 5,13% (2 POs, correspondentes à 0,78% do total) foram observados pulando mais de uma geração. Estas relações POs estão distribuídas da seguinte forma: entre 2014 e 2016 foram encontrados 29 POs (sendo 11 MOs e 18 FOs), entre 2015 e 2017 foram identificados 6 POs (MO = 3; FO = 3) e entre 2016 e 2018 encontramos 2 POs (MO = 2). Pulando mais de uma geração temos 2014-2017 e 2014-2018 com apenas 1 PO cada, sendo ambos MO. (Tabela 5).

**Tabela 5.** Número de relações classificadas como PO (separadas por relação entre mãe-filho - MO; entre pai-filho – FO, e número total).

	2014			2015			2016			2017		
	MO	FO	Total	MO	FO	Total	MO	FO	Total	MO	FO	Total
<b>2015</b>	31	36	67									
<b>2016</b>	11	18	29	52	57	109						
<b>2017</b>	1	0	1	3	3	6	22	15	37			
<b>2018</b>	1	0	1	0	0	0	2	0	2	0	4	4

**Gráfico 1.** Histograma mostrando o número de pares de indivíduos dentro da categoria PO (pai/mãe-filho) entre todas as gerações. Entre parentes o número de indivíduos de cada geração de filhos.



A categoria de relacionamento PO também foi encontrada na análise entre indivíduos pertencentes à mesma geração sendo, entretanto, desconsideradas por nós. A presença de POs entre indivíduos de uma mesma geração pode ser explicada pelo fato de que, em uma mesma geração, podemos encontrar mais indivíduos que são de fato irmãos completos - FS (com a mesma mãe e o mesmo pai). O coeficiente de parentesco ( $r$ ) para irmãos-completos – FS e para a relação entre pai e filho – PO resultam no mesmo coeficiente de 0,5, embora os padrões de compartilhamento de alelos sejam diferentes entre essas duas relações (Kalinowski *et al.* 2006). Apesar de FS apresenta uma maior variação (podem compartilhar 0, 1 ou 2 alelos), estes podem ser considerados como PO nos casos em que o coeficiente ( $r$ ) apresentar valores próximos a 0,5 (Wang 2006). Dessa forma, a diferenciação entre as categorias de relacionamento FS e PO em indivíduos de uma mesma geração pode ser difícil, já que os valores de  $r$  podem se encontrar no limiar entre uma categoria e outra.

Além das relações entre pais e filhos (PO), identificamos 386 pares de indivíduos relacionados como irmãos completos (FS), 6329 como meios-irmãos (HS), e 39.315 pares não relacionados (U).



### *Alocação parental*

Os valores de LOD crítico, assim como as atribuições de paternidade/maternidade observadas e esperadas obtidas em cada uma das análises realizadas com o programa Cervus, podem ser visualizados na Tabela 6. Conforme pode ser observado, a porcentagem de atribuições considerando apenas a mãe sozinha, o pai sozinho, ou o par de pais, assim como o número de não atribuições, foi variável para cada um dos anos analisados. O número total de atribuições parentais observado com confiança estrita (95%) foi igual a 244 atribuições, sendo 120 para mães sozinhas e 124 para pais sozinhos. Entre estes verificamos 91 atribuições correspondentes a pares de pais (trio - par de pais com o filho). Se considerarmos a confiança relaxada (80%) o número total de atribuições observadas foi igual a 321, sendo 152 atribuições para mãe sozinha, 169 para pai sozinho, e 113 para pares de pais.

**Tabela 6.** Valores críticos de LOD estrito (95%) e relaxado (80%) para cada categoria de atribuição (mãe sozinha, pai sozinho e par de pais), calculados durante as simulações de alocação parental para cada uma das gerações de filhos analisadas, e a porcentagem de atribuições observadas (Obs) e esperadas (Esp) nas análises de atribuição parental com dados reais.

			LOD Crítico							
			2015	2016	2017	2018				
Simulação	Mãe sozinha	Restrito	2,39	3,91	4,32	4,63				
		Relaxado	-1,69	0,23	0,75	1,36				
	Pai sozinho	Restrito	2,78	4,20	4,14	4,69				
		Relaxado	-1,18	0,53	0,52	1,43				
	Par de pais	Restrito	10,21	12,03	12,05	12,77				
		Relaxado	5,56	7,52	7,75	8,59				
			% Atribuições							
			Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp
Dados Reais	Mãe sozinha	Restrito	47	61	64	59	46	59	29	48
		Relaxado	68	74	73	74	54	73	57	61
		Não atribuído	32	26	27	26	46	27	43	39
	Pai sozinho	Restrito	55	61	69	59	33	59	36	48
		Relaxado	74	74	83	74	65	73	50	61
		Não atribuído	26	26	17	26	35	27	50	39
	Par de pais	Restrito	36	38	58	37	20	37	21	26
		Relaxado	46	45	66	45	30	45	36	31
		Não atribuído	54	55	34	55	70	55	64	69
<b>Nº total de filhos avaliados</b>			76	76	86	86	54	54	14	14

### *Análise conjunta dos resultados e atribuição parental*

Os resultados obtidos com os programas ML-Relate e Cervus foram analisados de

forma conjunta, sendo considerados para a atribuição final da paternidade/maternidade os critérios apresentados na seção de Material e Métodos. No total foram consideradas 232 atribuições de parentesco entre pais e filhos, sendo 116 entre pai-filho e 116 entre mãe-filhos (Tabela 7 e Anexos de 2 a 5). Destas, 78 formavam também pares de pais (trio) com confiança estrita (95%).

**Tabela 7.** Número total de atribuições mãe-filho e pai-filho entre as gerações. Entre parêntese: o número de atribuições em concordância pelos dois programas (critério 1)/ Número de atribuições com PO ou confiança estrita de 95% (critérios 2, 3 e 4). N° = Número de indivíduos de cada geração.

N°	Filhos	MÃE 2014	PAI 2014	MÃE 2015	PAI 2015	MÃE 2016	PAI 2016	MÃE 2017	PAI 2017
76	2015	35(26/9)	40(30/10)						
86	2016	3(3/0)	1(0/1)	52(47/5)	57(43/14)				
54	2017	0	0	2 (2/0)	0	20(16/4)	14(13/1)		
11	2018	0	0	0	0	3(1/2)	0	1(0/1)	4 (3/1)

Do total de 232 atribuições realizadas, 184 se encontravam dentro da categoria PO na análise com o ML-Relate e confiança estrita de 95% na análise com o Cervus (critério 1 de atribuição, ver material e métodos). Para as outras 48 atribuições este critério mais restritivo não foi atingido, sendo considerado para a atribuição os critérios 2, 3 e 4 (ver material e métodos)

Atendendo os critérios definidos para a atribuição conjunta da paternidade/maternidade, verificamos que a maior parte das atribuições realizadas (223, ou 96,12%) ocorrem entre indivíduos de gerações subsequentes. O restante (9 atribuições, ou 3,88%) referem-se a atribuições observadas entre geração não consecutivas. Nestes casos, foram observados a atribuição de maternidade entre os anos de 2014-2016 (3 casos, sendo todos referentes à mesma fêmea F-206), 2015-2017 (2 casos) e 2016-2018 (3 casos). A única exceção para a semelparidade obrigatória masculina foi o macho M\_210 de 2014, para o qual foi atribuído um filho em 2016 (neste caso, apresentando 95% de confiança no teste de alocação parental realizado com o software Cervus, e classificado como FS na análise de categorias de relacionamento com o software ML-Relate).

## Discussão

Tanto o método convencional de alocação parental quanto a abordagem por categoria de relacionamento no ML-Relate apresentaram inferências concordantes na maior parte dos resultados, com 184 atribuições dentro da categoria PO e com 95% de confiança (dentro do critério 1). A análise feita com o programa Cervus se mostrou mais conservadora do que a apresentada pelo ML-Relate se consideramos apenas as atribuições com confiança estrita (95%). No entanto as duas abordagens em conjunto mostraram estimativas mais confiáveis para representar a relação de parentesco entre os indivíduos, sendo a matriz de relacionamentos do ML-Relate utilizada como uma abordagem complementar, como sugerido por Jones *et al.* (2010). O número de casos com participação de indivíduos em mais de um evento reprodutivo representou menos de 3% dos casos analisados. Entretanto, é importante ressaltar que os métodos moleculares também são limitados à amostragem dos indivíduos incluídos nas análises, o que pode ocultar informações do sistema de acasalamento genético das populações estudada.

As análises de parentesco com marcadores codominantes são baseadas na probabilidade combinada de compartilhamento de alelos entre pais e filhos de acordo com as regras mendelianas, os quais devem compartilhar pelo menos um alelo em cada loco. O poder estatístico dos 12 locos aqui utilizados está relacionado com a diversidade alélica encontrada, que variou de 6-18 alelos/loco, sendo bastante informativos para as análises de parentesco aqui realizadas. Porém, os erros de genotipagem, como a presença de alelos nulos, também podem aumentar com um maior número de locos. Esse erro de genotipagem é comum em dados de microssatélites e pode afetar negativamente as estimativas de parentesco atribuídas pelos cálculos de verossimilhança, pois envolvem homozigotos enganosos devido a um alelo não amplificado, resultando em incompatibilidades aparentes entre pais verdadeiros e seus filhos (Pompanon *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2006). Entretanto os dois programas que utilizamos fazem acomodação de alelos nulos, diminuindo seu impacto nas análises de parentesco por permitir incompatibilidades causadas por alelos nulos, assim como outros erros de genotipagem e mutações (Kalinowski *et al.* 2006, 2007).

Os resultados apresentados aqui são consistentes com uma estratégia de vida semélpara em *G. agilis* em ambos os sexos. Por meio das análises moleculares realizadas foi possível verificar que os descendentes de cada geração são filhos, predominantemente, de pais da geração anterior, com um número mínimo de sobreposição de indivíduos reprodutores de

diferentes gerações em um mesmo evento reprodutivo. A observação de gerações discretas sem sobreposição entre os machos foi evidente nas coortes de 2015, 2016 e 2017, com apenas um único indivíduo da coorte de 2014 (M\_210) apresentando probabilidade de ter se sobreposto aos machos na estação reprodutiva de 2015 e ter deixado um descendente em 2016. Entretanto, a relação de parentesco pai-filho (2014-2016) entre esses dois indivíduos não foi confirmada pela análise com o ML-RELATE (sendo categorizado como FS), e no estudo de campo não houve a recaptura desse indivíduo (M\_210) no ano de 2015 (dados não publicados). Ao contrário do observado para os machos, a sobreposição nas fêmeas ocorreu nas coortes de 2014, 2015, 2016 e 2017, com uma única fêmea da coorte de 2014 apresentando parentesco com três indivíduos de 2016, duas fêmeas da coorte de 2015 sobrevivendo e gerando descendentes em 2017 e três fêmeas da coorte de 2016 com descendentes em 2018, sendo que duas não foram confirmadas pelo ML-Relate (categorizadas como FS, ao invés de PO).

Nossos dados se assemelham aos resultados de estudos de campo que relatam a semelparidade em *Gracilinanus agilis* com base em análises demográficas realizadas pelo método de captura-marcação-recaptura e estimativas da taxa de sobrevivência pré e pós o período reprodutivo, com uma diminuição drástica dos machos (Martins *et al.* 2006a; Lopes e Leiner 2015; Puida e Paglia 2015) e as fêmeas apresentando padrão semelhante (Lopes e Leiner 2015; Puida e Paglia 2015). No estudo de Lopes e Leiner (2015), o número de machos e fêmeas adultos atinge zero e volta a subir no próximo evento reprodutivo, resultando em gerações discretas com ausência completa de sobreposição entre elas. Puida e Paglia (2015) encontram uma pequena taxa de sobrevivência para ambos os sexos que, embora tenha diminuído, não atingiu zero, sendo algumas fêmeas (menos 4%) recapturadas numa segunda temporada de reprodução. Esse resultado se assemelha aos apresentados aqui, em que as fêmeas que geraram descendentes em um segundo ano reprodutivo representavam de 3 a 6% das fêmeas amostradas em cada ano.

Em estudos de observação de campo, o desaparecimento das fêmeas logo após o período de acasalamento pode não ser tão evidente quanto nos machos devido ao período de gestação, de aproximadamente duas semanas, e de amamentação, que dura de 3-4 meses (Lopes e Leiner 2015). Apesar de a espécie apresentar um padrão sazonal de reprodução (Martins *et al.* 2006b; de Andreazzi *et al.* 2011) com o acasalamento mais concentrado em um curto período de tempo (no final da estação seca, entre agosto/setembro) este não é totalmente sincronizado, sendo possível encontrar fêmeas em condições reprodutivas (grávidas e lactantes) até dezembro (Martins *et al.* 2006b; Lopes e Leiner 2015). Dessa forma, o

desaparecimento acentuado dos machos já pode ser visto no mês de outubro logo após o começo do período de acasalamento (agosto/setembro) e nas fêmeas a partir dezembro/fevereiro. Entretanto, fêmeas que se acasalaram mais tarde (novembro/dezembro) só desapareceram da população em abril/maio.

No estudo de Martins *et al.* (2006a) é observado um decaimento significativo na sobrevivência dos machos no período de pós-acasalamento, enquanto que nas fêmeas a estimativa na taxa de sobrevivência é relativamente constante entre o período pré e pós-acasalamento. Entretanto, a janela de tempo utilizada para modelar as taxas de sobrevivência e recaptura nesse estudo incluía um período de 14 meses, estendendo-se até fevereiro do ano seguinte nas duas coortes avaliadas. Esse período pode ter interferido na observação do desaparecimento de fêmeas com reprodução mais tardia, impedindo assim o registro de uma menor taxa de recaptura e sobrevivência, semelhante ao observado para os machos. Além disso, uma avaliação da densidade populacional da população estudada em Martins *et al.* (2006a;b) registrou a presença de fêmeas grávidas até novembro e de fêmeas lactantes até março do próximo ano, reforçando o possível desaparecimento mais tardio de uma parte das fêmeas da população. Nossas análises genéticas, ao avaliarem o número de descendentes das fêmeas em cada geração ao longo de quatro coortes, contribuem para uma maior clareza em relação ao desaparecimento das fêmeas, que pode ocorrer de forma gradual.

Martins 2006b mostra que, a cada ano, ocorre uma substituição gradual dos pais na população, de modo que no início da estação fria e seca (abril), a população é composta principalmente por indivíduos no primeiro ano de vida (juvenis). Assim ocorreria uma substituição anual das gerações, no qual existe um momento nessa transição etária em que os machos e fêmeas adultos estão ausentes na população, como revelou Lopes e Leiner (2015). Embora Martins (2006a) tenha classificado a espécie como parcialmente semélpara diante da incompleta mortalidade dos indivíduos machos, e tenha sugerido que o número de sobreviventes observados (pela recapturas de indivíduos marcados), seja menor que o número real de machos que podem sobreviver a uma segunda temporada de reprodução não é o que a análise genética de descendentes aqui revelada, e outros estudos de campo, sugerem. Entretanto, é notável a variação do número de indivíduos sobreviventes em cada estudo, observando um desaparecimento completo ou não, sendo difícil descrever a espécie em um dos extremos do eixo de estratégias reprodutivas (Krajewski *et al.* 2000).

A plasticidade da estratégia reprodutiva em marsupiais semélparos entre populações de uma mesma espécie e em uma mesma população ao longo dos anos já foi relatada em dasiurídeos (Dickman e Braithwaite 1992; Mills e Bencini 2000), sendo também observada

nesse nosso estudo com *G. agilis* e em outros estudos já realizados com a espécie. Os dados genéticos aqui apresentados confirmam a semelparidade para a maior parte dos indivíduos machos e fêmeas da população estudada. Entretanto verificamos variações ao longo dos anos, com machos reproduzindo apenas uma vez na maioria dos anos e com uma pequena parcela de fêmeas (de uma a três) podendo apresentar um padrão de reprodução iterópara em cada ano. Pelos resultados de Lopes e Leiner (2015) a espécie apresenta semelparidade obrigatória para os dois sexos, enquanto Puida e Paglia (2015) discutem sobre uma classificação parcialmente semelpara devido sobrevivência de uma pequena parcela de indivíduos, como sugerido por Martins (2006a). Nós sugerimos, para espécie, a adoção de uma semelparidade facultativa como descrito por Mills e Bencini (2000) para *Parantechinus apicalis* onde a morte dos indivíduos não é obrigatória, mas ocorre na maior parte da população, podendo tanto ser completa (semelparidade obrigatória) em alguns anos e em algumas populações, como parcial em outros, com uma pequena parcela de indivíduos podendo sobreviver, principalmente fêmeas.

As flutuações espaço-temporal dos indivíduos sobreviventes após o período reprodutivo é resultante da plasticidade da estratégia reprodutiva, que reflete a capacidade de se adaptar as condições e variações do meio (Sinclair 2003). Fatores ambientais como a disponibilidade de recursos alimentares pode estar relacionada com o custo na reprodução e afetar a sobrevivência ou fecundidade futuras dos indivíduos (Dickman 1987; Banks e Dickman 2000). Entretanto no estudo de Zangrandi (2018), realizado com a mesma população de *G. agilis* utilizada no nosso estudo, não foi encontrado nenhuma relação conclusiva em relação ao efeito da suplementação alimentar sobre a sobrevivência e o esforço reprodutivo de ambos os sexos, não havendo alteração em parâmetros populacionais em comparação à outras áreas utilizadas como controle (sem suplementação alimentar). As análises genéticas aqui apresentadas parecem confirmar essa observação, já que uma maior quantidade de alimento disponível na área estudada parece não ter favorecido a sobrevivência e participação dos indivíduos em eventos de reprodução futura. Esta observação é contrária ao que seria previsto, já que uma maior abundância de alimentos gera um menor custo reprodutivo e reduz o contato antagonista intraespecífico pela busca de alimentos (Dickman 1987; Banks e Dickman 2000). No estudo de Puida e Paglia (2015), realizado com uma população de *G. agilis* no estado de MG, também não foi encontrado influência da produtividade primária (relacionada à abundância de artrópodes, que é a principal fonte alimentar desse marsupial) nos parâmetros demográficos (Bocchiglieri *et al.* 2010).

Outro fator que pode estar relacionados com a plasticidade da estratégia reprodutiva é a diferença na qualidade dos habitats, como foi demonstrado em estudos com *Parantechinus apicalis* em populações de ilhas, continente e cativeiro (Woolley 1971; Dickman e Braithwaite 1992; Mills e Bencini 2000). Resultados obtidos em cativeiro mostraram que os machos e fêmeas sobrevivem após o acasalamento, diferente do que pode ocorrer em populações naturais, evidenciando a influência de estressores ambientais na sobrevivência dos indivíduos. Os estudos com *G. agilis* citados anteriormente foram feitos com populações que habitam regiões do Cerrado brasileiro que apresentam semelhanças na vegetação e no clima, marcados com uma forte sazonalidade das estações. Entretanto, é necessário uma avaliação mais refinada sobre as diferenças nas condições ambientais das áreas amostradas nesses diferentes estudos para explicar as divergências no padrão reprodutivo de sobrevivência encontrado em cada população. Fatores mais específicos teriam que ser considerados, como competição com outras espécies por recursos e refúgio (abrigo), riqueza e abundância de espécies parasitas, temperatura, precipitação e densidade populacional.

O acasalamento sincronizado pela ovulação das fêmeas é uma das características das espécies semélparas de dasiurídeos (Scott 1986; Naylor *et al.* 2008). No estudo de Mills e Bencini (2000) com *Parantechinus apicalis* em cativeiro foi observado que machos e fêmeas podem ser assíncronos no momento da condição de procriação, com machos não espermatorreicos enquanto as fêmeas estão em estro, e algumas fêmeas em estro fora da estação reprodutiva normal. A fertilidade sincronizada dos indivíduos pode estar relacionada com a plasticidade da estratégia reprodutiva em *G. agilis*, pois a poliandria (acasalamento das fêmeas com vários machos) com fertilidade sincronizada das fêmeas e da espermatogênese nos machos é apontada como um dos fatores relacionados com a morte dos indivíduos, devido a períodos intensos de acasalamento que resultam em maior competição, esforço reprodutivo e estresse (Braithwaite e Lee 1977; Fisher *et al.* 2013). Em espécies de *Antechinus* onde ocorre mortalidade total dos machos, o curto período de acasalamento se resume a cerca de duas-três semanas (Braithwaite e Lee 1977; Lee *et al.* 1977).

Apesar de *G. agilis*, apresentar uma reprodução sazonal e o acasalamento concentrado no início da estação reprodutiva (julho/agosto), ele pode se estender até novembro/dezembro (Lopes e Leiner 2015). A falta de sincronia na fertilidade dos indivíduos dentro do período reprodutivo resulta em acasalamentos mais tardios de algumas fêmeas e machos, o que pode favorecer a sobrevivência de alguns indivíduos devido à menor intensidade e estresse relacionado à reprodução, ocasionado pela distribuição da atividade de cópula dentro do período reprodutivo (Scott 1986; Fisher *et al.* 2013). Na população estudada por Lopes e

Leiner (2015) foi observando padrão anual de forte sincronia reprodutiva entre as fêmeas adultas, com o desaparecimento e renovação quase total durante a época de reprodução. Entretanto para um melhor entendimento dos padrões de sobrevivência encontrados em *G. agilis*, são necessários estudos que complementem informações do ciclo reprodutivo dessa espécie, com avaliações da espermatogênese nos machos e do ciclo estral nas fêmeas, para entender a sincronia e duração da fertilidade dos machos e das fêmeas e confirmar o número possível de ninhadas por fêmea (monoestral ou poliestral) em cada estação reprodutiva.

Diferentemente de algumas espécies semélparas de dasiurídeos que apresentam mortalidade obrigatória restrita aos machos, *G. agilis* aparentemente apresenta morte das fêmeas após o desmame dos filhotes. A mortalidade das fêmeas se deve principalmente a um desgaste reprodutivo devido à gestação e amamentação, levando a uma senescência reprodutiva que pode causar a morte (Cockburn 1997; Martins *et al.* 2006b; Fisher e Blomberg 2011). O estudo de Fisher e Blomberg (2011) mostrou que fêmeas que alocavam mais recursos para os filhotes no primeiro ano reprodutivo tinham menor probabilidade de sobreviver, contudo os filhotes apresentavam crescimento mais rápido. Além disso, foi observado que a iteroparidade não aumenta o sucesso reprodutivo ao longo da vida, indicando que o investimento terminal na primeira estação reprodutiva a custo da sobrevivência materna (i. e. semelparidade) provavelmente é vantajosa para as fêmeas. Nossos dados de descendência genética apoiam essa hipótese para a maioria das fêmeas de *G. agilis* e mostra que para as fêmeas iteróparas, o número de descendentes do primeiro evento reprodutivo foi geralmente maior do que no segundo. O sucesso reprodutivo pode ser avaliado pelo número de descendentes deixados pelos indivíduos e relacionado com o custo para tal. Contudo nossos resultados são limitados já que o número de capturas durante o trabalho de campo pode não refletir o número de descendentes total de um indivíduo.

Nossos resultados mostraram que a fêmea F\_206, pertencente à coorte de 2014 (conforme definido através dos dados de biometria), não se reproduziu nesse ano, acasalando somente em 2015 e gerando três descendentes na geração de filhos de 2016. Desta forma, esta seria uma fêmea semélpara, participando de um único evento reprodutivo em 2015. A fêmea F\_460 apresentou uma estratégia de reprodução iterópara, apresentando um maior número de descendentes no primeiro ano reprodutivo (com seis filhotes) enquanto que no segundo ano foi amostrado apenas um único descendente. A fêmea F\_781 iterópara não apresentou diferença no número de descendentes entre os dois anos reprodutivos, com apenas um filho amostrado em cada geração. Entretanto, novamente, esses resultados não podem ser correlacionados diretamente com o sucesso reprodutivo, pois se referem ao número de



indivíduos que foram coletados durante o trabalho de campo, e não ao número real de filhotes gerados (que pode ser maior, não capturados durante a amostragem).

A mortalidade dos machos está relacionada com competição por fêmeas durante período reprodutivo curto e sincronizado e aumento do contato antagonístico intraespecífico, os quais geram respostas fisiológicas referidas como “resposta adaptativa ao estresse” ou “síndrome da semelparidade” (Lee *et al.* 1977; Bradley *et al.* 1980; Lee e Cockburn 1985; Boonstra 2005). No trabalho de Zangrandi (2018), que inclui os indivíduos utilizados no presente estudo, a resposta fisiológica dos indivíduos foi semelhante ao esperado quando há uma ativação crônica do eixo do estresse, com níveis elevados de cortisol livre, menor concentração de hemoglobina, principalmente em animais com anemia, e deterioração da condição corpórea. Além disso, o parasitismo pela mosca cuterebrídea, causou uma anemia que se intensificou com a desidratação em dias mais secos e quentes, coincidindo com o período reprodutivo e desaparecimento dos machos no início da primavera, de setembro até outubro. Dessa forma, a resposta adaptativa ao estresse em *G. agilis* diminui a aptidão dos indivíduos, previsto pelo aumento de glicocorticoides em resposta a estressores, no qual reflete em falhas do sistema imune e inflamatório (Hernandez *et al.* 2018; Zangrandi 2018).

Apesar da plasticidade apresentada por *G. agilis*, onde uma parcela de indivíduos pode sobreviver por mais de uma geração, a mortalidade da maior parte dos indivíduos (sugerida pelos nossos resultados relacionados à reprodução em apenas uma estação reprodutiva), indica uma forte pressão adaptativa relacionada ao sucesso reprodutivo dos indivíduos em ambientes sazonais. Os períodos de acasalamento curtos e com extrema promiscuidade, aumentam a competição espermática, o que resulta em um esforço letal e na evolução para a estratégia semélpara (Fisher *et al.* 2013). Assim, a semelparidade facultativa é provavelmente um precursor da semelparidade obrigatória que ocorre em certas condições que precisam ser melhor estudadas e compreendidas. Além de fatores ambientais e evolutivos, as variações observadas na estratégia reprodutiva também podem estar relacionadas com as dificuldades e falhas das metodologias adotadas em trabalhos de campo. Desta forma, reforçamos a necessidade da utilização de análises moleculares de parentesco genético e de fisiologia em conjunto com os estudos de dinâmica populacional para avaliar a estratégia reprodutiva e sobrevivência de pequenos mamíferos.

## Conclusões Gerais

O conjunto de locos microssatélites isolados e caracterizados para *Gracilinanus agilis* foi útil para alcançar os objetivos propostos e os nossos dados apoiam as hipóteses iniciais desse trabalho. A determinação do parentesco genético e a atribuição da paternidade/maternidade para os indivíduos analisados, junto com a avaliação da contribuição genética dos indivíduos ao longo dos anos, realizada por meio da utilização desses marcadores, permitiu caracterizar geneticamente a ocorrência da semelparidade nessa espécie. A partir da contribuição genética dos indivíduos em cada geração, sugerimos que os machos dessa população apresentam semelparidade obrigatória podendo ocorrer exceções ao longo dos anos e as fêmeas apresentam semelparidade parcial, com algumas podendo sobreviver e se reproduzir na próxima estação reprodutiva. Levando em consideração outros estudos feitos com populações de *G.agilis*, podemos classificar a espécie com semelparidade facultativa, devido à variação do número de indivíduos que se reproduzem uma segunda vez ao longo dos anos e em cada população.

Nossos resultados reforçam a importância do acompanhamento genético em estudos de campo para avaliar as estratégias reprodutivas de acordo com a dinâmica populacional, tendo em vista as dificuldades para demonstrar conclusivamente a ocorrência da semelparidade apenas com dados de captura-marcação-recaptura. Desta forma as informações aqui geradas, em conjunto com informações sobre fisiologia e ecologia populacional obtidas por outros pesquisadores, podem preencher as lacunas de conhecimento existentes sobre a história de vida e biologia reprodutiva desse marsupial sul-americano, possibilitando a compreensão de fatores que regulam o tamanho populacional, fornecendo subsídios para avaliação da persistência da espécie, e contribuindo com informações úteis para a elaboração de planos de conservação e manejo. Além disso, os marcadores genéticos descritos aqui para *G. agilis*, poderão ser utilizados em outros estudos para avaliar paternidade múltipla, diversidade genética e estrutura populacional, como também serem utilizados em estudos com outras espécies de marsupiais a partir de testes de transferência dos *primers* desenvolvidos.

## Referências Bibliográficas

- ABDELKRIM, J., B. C. ROBERTSON, J. A. L. STANTON, E N. J. GEMMELL. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46:185–192.
- ALBANESE, M. S., R. A. OJEDA, E A. A. ASTIÉ. 2021. Delayed mortality of males in *Thylamys bruchi*, a semelparous marsupial from the Monte Desert, Argentina. *Journal of Mammalogy* 102:258–269.
- ALLENTOFT, M. E. ET AL. 2009. Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *BioTechniques* 46:195–200.
- ALMANY, G. R. ET AL. 2009. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 May 2009-31 July 2009. *Molecular Ecology Resources* 9:1460–1466.
- DE ANDREAZZI, C. S., V. RADEMAKER, R. GENTILE, H. M. HERRERA, A. M. JANSEN, E P. S. D'ANDREA. 2011. Population ecology of small rodents and marsupials in a semi-deciduous tropical forest of the southeast Pantanal, Brazil. *Zoologia* 28:762–770.
- ANDREWS, S. 2014. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data (Online). <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- BALADRÓN, A. V., A. I. MALIZIA, M. S. BÓ, M. S. LIÉBANA, E M. J. BECHARD. 2012. Population dynamics of the southern short-tailed opossum (*Monodelphis dimidiata*) in the Pampas of Argentina. *Australian Journal of Zoology* 60:238–245.
- BANKS, P. B., E C. R. DICKMAN. 2000. Effects of winter food supplementation on reproduction, body mass, and numbers of small mammals in montane Australia 78:1775–1783.
- BEGG, R. J. 1981. The Small Mammals of Little Nourlangie Rock , N . T .III. Ecology of *Dasyurus hallucatus*, the Northern Quoll (Marsupialia : Dasyuridae):73–85.
- BOCCHIGLIERI, A., A. F. MENDONÇA, E J. B. CAMPOS. 2010. Diet composition of *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) in dry woodland areas of Cerrado in central Brazil. *Mammalia* 74:225–227.
- BOLGER, A. M., M. LOHSE, E B. USADEL. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120.
- BOONSTRA, R. 2005. Equipped for life: The adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Mammalogy* 86:236–247.
- BRADLEY, A. J. 1997. Reproduction and life history in the red-tailed phascogale, *Phascogale calura* (Marsupialia : Dasyuridae ) : the adaptive-stress senescence hypothesis:739–755.
- BRADLEY, A. J. 2003. Stress, hormones and mortality in small carnivorous marsupials. P. 250–263 in *Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials* (M. Jones, C.

- . Dickman & M. Archer, orgs.). CSIRO Publishing, Melbourne, Australia.
- BRADLEY, A. J., I. R. McDONALD, E A. K. LEE. 1980. Stress and mortality in a small marsupial (*Antechinus stuartii*, Macleay). *General and Comparative Endocrinology* 40:188–200.
- BRAITHWAITE, R. W., E A. K. LEE. 1977. A mammalian example of semelparity. *American Naturalist* 113:151–155.
- BRANDÃO, E. M. V. ET AL. 2019. Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in Central Brazil: Another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape. *Pathogens* 8:1–17.
- BROWN, B. 2004. Atlas of the new world marsupials. *Fieldiana Zoology: New Series* 102:1–108. Field Museum of Natural History.
- CÁCERES, N. C., E E. L. . MONTEIRO-FILHO. 2006. Uso do espaço por marsupiais: fatores influentes, comportamento e heterogeneidade espacial. P. 203–215 in *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução* (N. C. Cáceres & E. L. A. Monteiro-Filho, orgs.). Editora UFMS, Campo Grande.
- CAMARGO, N. F., A. J. A. DE CAMARGO, A. F. MENDONÇA, E E. M. VIEIRA. 2017. Potencial Serviço Ecosistêmico Prestado pelo Marsupial *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) com a Predação do Percevejo Marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *Embrapa Cerrados, Planaltina, DF*.
- CAMARGO, N. F., R. M. S. CRUZ, J. F. RIBEIRO, E E. M. VIEIRA. 2011. Frugivoria e potencial dispersão de sementes pelo marsupial *Gracilinanus agilis* (Didelphidae: Didelphimorphia) em áreas de Cerrado no Brasil central. *Acta Botanica Brasilica* 25:646–656.
- CAMARGO, N. F., J. F. RIBEIRO, A. J. A. DE CAMARGO, E E. M. VIEIRA. 2014. Diet of the gracile mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in a neotropical savanna: Intraspecific variation and resource selection. *Acta Theriologica* 59:183–191.
- CAPARROZ, R., E F. P. RODRIGUES. 2017. Análise de Filiação como Metodologia para o Gerenciamento de Criadores Comerciais e Amadoristas de Aves no Brasil. P. 141–158 in *Ciência contra o tráfico: Avanços no combate ao comércio ilegal de Animais Silvestres* (F. J. . Costa, J. . Ferreira, K. R. . Monteiro & R. . Mayrink, orgs.). Imprel, João Pessoa.
- CARLSSON, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99:616–623.
- CARMIGNOTTO, A. P., S. SOLARI, N. DE LA SANCHA, E L. COSTA. 2015. *Gracilinanus agilis* . *The IUCN Red List of Threatened Species 2015*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> (21 dezembro 2020).
- CASTOE, T. A. ET AL. 2010. Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources* 10:341–347.
- CASTOE, T. A. ET AL. 2012. Rapid Microsatellite Identification from illumina Paired-End

- CHAPUIS, M. P., E A. ESTOUP. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24:621–631.
- COCKBURN, A. 1997. Living slow and dying young: senescence in marsupials. P. 28–40 in *Marsupial biology: recent research new perspectives* (N. Saunders & L. Hinds, eds.). Berlin, Springer.
- COETZER, W. G., C. T. DOWNS, M. R. PERRIN, E S. WILLOWS-MUNRO. 2017. Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): Paternity testing and monitoring trade. *PeerJ* 2017.
- COLE, L. C. 1954. The population consequences of life history phenomena. *The Quarterly review of biology* 29:103–137.
- COSTA, L. P., Y. L. R. LEITE, E J. L. PATTON. 2003. Phylogeography and systematic notes on two species of gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* (Marsupialia: Didelphidae) from Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 116:275–292.
- CRAMER, E. R. A., M. L. HALL, S. R. DE KOR, I. J. LOVETTE, E S. L. VEHRENCAMP. 2011. Infrequent extra-pair paternity in the banded wren, a synchronously breeding tropical passerine. *Condor* 113:637–645.
- CRESPI, B. J., E R. TEO. 2002. Comparative phylogenetic analysis of the evolution of semelparity and life history in salmonid fishes. *Evolution* 56:1008–1020.
- CSENCICS, D., S. BRODBECK, E R. HOLDEREGGER. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity* 101:789–793.
- DEMPSTER, A. P., N. M. LAIRD, E D. B. RUBIN. 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data Via the *EM* Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 39:1–22.
- DHARMARAJAN, G., W. S. BEATTY, E O. E. RHODES. 2013. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: Dispelling unfounded expectations. *Journal of Wildlife Management* 77:226–234.
- DIAS, B. F. 1992. Alternativas de desenvolvimento dos Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. *Fundação Pró-Natureza (FANATURA)*:118.
- DIAS, I. M. G. ET AL. 2009. Isolation, characterization and cross-species amplification of new microsatellite markers for three opossum species of the Didelphidae family. *Conservation Genetics Resources* 1:405–410.
- DICKMAN, C. R. 1987. Demographic responses of *Antechinus stuartii* (Marsupialia) to supplementary food:387–398.
- DICKMAN, C. R., E R. W. BRAITHWAITE. 1992. Postmating mortality of males in the dasyurid marsupials, *Dasyurus* and *Parantechinus*. *Journal of Mammalogy* 73:143–147.
- DICKMAN, C. R., A. S. HAYTHORNTHWAITE, G. H. MCNAUGHT, P. S. MAHON, B. TAMAYO, E

- M. LETNIC. 2001. Population dynamics of three species of dasyurid marsupials in arid central Australia: A 10-year study. *Wildlife Research* 28:493–506.
- EKBLOM, R., E J. GALINDO. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107:1–15.
- EMMONS, L., E F. FEER. 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: a field Guide*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- ESPÍRITO-SANTO, M. M. ET AL. 2016. Understanding patterns of land-cover change in the Brazilian Cerrado from 2000 to 2015. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371.
- FAHRIG, L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:487–515.
- FELFILI, J. M., E A. Á. B. SANTOS. 2004. Diretrizes para o Plano de Manejo da APA Gama e Cabeça de Veado. *Flora e diretrizes ao Plano de Manejo da APA Gama e Cabeça de Veado*:107–157.
- FERREIRA, M. E., E D. GRATTAPAGLIA. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3<sup>o</sup> edição. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.
- FIGUEIREDO, M. G. ET AL. 2015. Lack of Population Genetic Structuring in Ocelots (*Leopardus pardalis*) in a Fragmented Landscape. *Diversity* 7:295–306.
- FIKE, J. A., J. C. BEASLEY, E O. E. RHODES. 2009. Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Molecular Ecology Resources* 9:1200–1202.
- FISHER, D. O., E S. P. BLOMBERG. 2011. Costs of reproduction and terminal investment by females in a semelparous marsupial. *PLoS ONE* 6.
- FISHER, D. O., C. R. DICKMAN, M. E. JONES, E S. P. BLOMBERG. 2013. Sperm competition drives the evolution of suicidal reproduction in mammals.
- FRANÇOZO, R. D., R. BRANDÃO, C. C. NOGUEIRA, Y. B. SALMONA, R. B. MACHADO, E G. R. COLLI. 2015. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. *Natureza e Conservação* 13:35–40.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, E D. A. BRISCOE. 2002. Population fragmentation. P. 309–335 in *Introduction to Conservation Genetics* (R. Frankham, J. D. Ballou & D. A. Briscoe, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- GARDNER, A. L. 2008. *Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- GARDNER, M. G., A. J. FITCH, T. BERTOZZI, E A. J. LOWE. 2011. Rise of the machines - recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources* 11:1093–1101.
- GOOSSENS, B. ET AL. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43:281–

- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. (Version 2.9.3). Available at <http://www.unil.ch/zea/software/fstat.html>.
- GRECCHI, R. C., Q. H. J. GWYN, G. B. BÉNIÉ, A. R. FORMAGGIO, E F. C. FAHL. 2014. Land use and land cover changes in the Brazilian Cerrado: A multidisciplinary approach to assess the impacts of agricultural expansion. *Applied Geography* 55:300–312.
- GRIFFITHS, S. M. ET AL. 2016. A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimised, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data. *Conservation Genetics Resources* 8:481–486.
- GUILLEMIN, M.-L., A. LAVERGNE, E F. CATZEFLIS. 2000. Microsatellite markers in the common grey four-eyed opossum (*Philander opossum*: Didelphidae, Marsupialia). *Molecular Ecology* 9:1436–1438.
- HAAG, T. ET AL. 2010. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: Loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology* 19:4906–4921.
- HAYES, G. L. T. ET AL. 2019. Male semelparity and multiple paternity confirmed in an arid-zone dasyurid. *Journal of Zoology* 308:266–273.
- HEDRICK, P. W., K. M. PARKER, E R. N. LEE. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. *Molecular Ecology* 10:1399–1412.
- HERNANDEZ, S. E., A. L. S. STRONA, N. O. LEINER, G. SUZÁN, E M. C. ROMANO. 2018. Seasonal changes of faecal cortisol metabolite levels in *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) and its association to life histories variables and parasite loads. *Conservation Physiology* 6:1–11.
- HOEKERT, W. E. J., H. NEUFÉGLISE, A. D. SCHOUTEN, E S. B. J. MENKEN. 2002. Multiple paternity and female-biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89:107–113.
- HOLLELEY, C. E., C. R. DICKMAN, M. S. CROWTHER, E B. P. OLDROYD. 2006. Size breeds success: Multiple paternity, multivariate selection and male semelparity in a small marsupial, *Antechinus stuartii*. *Molecular Ecology* 15:3439–3448.
- HRBEK, T., M. CROSSA, E I. P. FARIAS. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology* 67:909–917.
- HUGHES, J. M., P. B. MATHER, A. TOON, J. MA, I. ROWLEY, E E. RUSSELL. 2003. High levels of extra-group paternity in a population of Australian magpies *Gymnorhina tibicen*: Evidence from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12:3441–3450.
- HUNTER, M. E., S. M. HOBAN, M. W. BRUFORD, G. SEGELBACHER, E L. BERNATCHEZ. 2018. Next-generation conservation genetics and biodiversity monitoring. *Evolutionary Applications* 11:1029–1034.

- JONES, A. G., C. M. SMALL, K. A. PACZOLT, E N. L. RATTERMAN. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10:6–30.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, E T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099–1106.
- KALINOWSKI, S. T., A. P. WAGNER, E M. L. TAPER. 2006. ML-RELATE: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576–579.
- KLINK, C. A., E R. B. MACHADO. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19:707–713.
- KRAJEWSKI, C., P. A. WOOLLEY, E M. WESTERMAN. 2000. The evolution of reproductive strategies in dasyurid marsupials: Implications of molecular phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society* 71:417–435.
- LEE, A. K., A. J. BRADLEY, E R. W. BRAITHWAITE. 1977. Corticosteroid levels and male mortality in *Antechinus stuartii*. P. 209–220 in *The Biology of Marsupials* (B. Stonehouse & D. Gilmore, eds.). The Macmillan Press LTD.
- LEE, A. K., E A. COCKBURN. 1985. *Evolutionary ecology of marsupials*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- LEE, A. K., P. WOOLLEY, E R. W. BRAITHWAITE. 1982. Life history strategies of dasyurid marsupials. *Carnivorous marsupials* 1: 1-11. Archer, M. (Ed.). Sydney: Royal Zoological Society of New South Wales.
- LEINER, N. O., E. Z. F. SETZ, E W. R. SILVA. 2008. Semelparity and factors affecting the reproductive activity of the Brazilian slender opossum (*Marmosops paulensis*) in southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* 89:153–158.
- LEINER, N. O., E W. R. SILVA. 2007. Seasonal variation in the diet of the Brazilian slender opossum (*Marmosops paulensis*) in a montane Atlantic forest area, southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88:158–164.
- LESSA, L. G., E F. N. DA COSTA. 2010. Diet and seed dispersal by five marsupials (Didelphimorphia: Didelphidae) in a Brazilian cerrado reserve. *Mammalian Biology* 75:10–16.
- LI, M. H., K. VÄLIMÄKI, M. PIHA, T. PAKKALA, E J. MERILÄ. 2009. Extrapair paternity and maternity in the three-toed woodpecker, *Picoides tridactylus*: Insights from microsatellite-based parentage analysis. *PLoS ONE* 4:2–7.
- LOPES, G. P. 2014. Estratégia reprodutiva e organização espacial de uma população de *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) na Estação Ecológica do Panga, em Uberlândia/MG. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.
- LOPES, G. P., E N. O. LEINER. 2015. Semelparity in a population of *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) inhabiting the Brazilian Cerrado. *Mammalian Biology* 80:1–6.



- LOPES, I. F., C. I. MIÑO, C. D. ROCHA, D. M. M. OLIVEIRA, E S. N. DEL LAMA. 2013. Inferred kinship patterns reveal low levels of extra-pair paternity in the endangered Neotropical Jabiru Stork (*Jabiru mycteria*, Aves: Ciconiiformes). *Genetica* 141:195–203.
- LORINI, M. L., J. A. DEOLIVEIRA, E V. G. PERSSON. 1994. Annual age structure and reproductive patterns in *Marmosa incana* (Lund, 1841) (Didelphidae, Marsupialia). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 59:65–73.
- MANNISE, N. ET AL. 2017. Maned wolves retain moderate levels of genetic diversity and gene flow despite drastic habitat fragmentation. *Endangered Species Research* 34:449–462.
- MARTINS, E. G., V. BONATO, C. Q. DA-SILVA, E S. F. DOS REIS. 2006a. Partial semelparity in the neotropical didelphid marsupial *Gracilinanus microtarsus*. *Journal of Mammalogy* 87:915–920.
- MARTINS, E. G., V. BONATO, C. Q. DA-SILVA, E S. F. DOS REIS. 2006b. Seasonality in reproduction, age structure and density of the gracile mouse opossum *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia: Didelphidae) in a Brazilian cerrado. *Journal of Tropical Ecology* 22:461–468.
- MEYER, W. B., E B. L. TURNER II. 1994. *Changes in Land Use and Land Cover: A Global Perspective*. Cambridge University Press.
- MILLIGAN, B. G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163:1153–1167.
- MILLS, H. R., E R. BENCINI. 2000. New evidence for facultative male die-off in island populations of dibblers, *Parantechinus apicalis*. *Australian Journal of Zoology* 48:501–510.
- MIÑO, C. I., E. D. DE SOUZA, E. MORALES-SILVA, T. A. VALDES, V. L. C. C. RODRIGUES, E S. N. DEL LAMA. 2017. Use of noninvasive ‘ bug-eggs ’ to enable comparative inferences on genetic mating system with and without parental information: A study in a cattle egret colony:1–18.
- MOORE, M. K., E R. M. BALL. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: A microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 11:281–288.
- MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C. G. MITTERMEIER, G. A. B. DA FONSECA, E J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.
- NAYLOR, R., S. J. RICHARDSON, E B. M. MCALLAN. 2008. Boom and bust: A review of the physiology of the marsupial genus *Antechinus*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 178:545–562.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- OAKWOOD, M., A. J. BRADLEY, E A. COCKBURN. 2001. Semelparity in a large marsupial. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268:407–411.

- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, E P. SHIPLEY. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- PARGA, J. A. ET AL. 2016. Paternity in wild ring-tailed lemurs (*Lemur catta*): Implications for male mating strategies. *American Journal of Primatology* 78:1316–1325.
- PEMBERTON, J. M., J. SLATE, D. R. BANCROFT, E J. A. BARRETT. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 4:249–252.
- PEREZ-SWEENEY, B. M., F. P. RODRIGUES, E D. J. MELNICK. 2003. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. P. 343– 380 in Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre (L. Cullen, R. Rudran & C. Valladares-Padua, orgs.). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná , Brasil.
- POMPANON, F., A. BONIN, E. BELLEMAIN, E P. TABERLET. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847–859.
- PROMISLOW, D. E. . L., E P. H. HARVEY. 1990. Living Fast and Dying Young: A Comparative Analysis of Live History Variation among Mammals. *Journal of Zoology, London, Lond.*, 220: 417-437. *Journal of the Zoological Society of London* 220:417–437.
- PUIDA, D. B. C., E A. P. PAGLIA. 2015. Primary productivity and the demography of *Gracilinanus agilis*, a small semelparous marsupial. *Journal of Mammalogy* 96:221–229.
- QUELLER, D. C., J. E. STRASSMANN, E C. R. HUGHES. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8:285–288.
- RATTER, J. A., G. P. ASKEW, R. F. MONTGOMERY, E D. . FIFFORD. 1977. Observações adicionais sobre o Cerradão de solos mesotróficos no Brasil central. São Paulo, Brasil.
- RIBEIRO, J. F., E B. M. T. WALTER. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. P. 151–212 in Cerrado: Ecologia e Flora (S. M. Sano, S. P. Almeida & J. F. Ribeiro, orgs.). Embrapa Cerrados, Brasília.
- RICE, W. R. 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43:223–225.
- RODRIGUES, F. P., F. S. ROCHA, J. E. GARCIA, J. F. GARCIA, M. DE VIVO, E S. R. MATIOLI. 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia: Didelphimorphia). *Molecular Ecology Notes* 6:686–688.
- ROSA, J. F., M. RAMALHO, E M. C. ARIAS. 2016. Functional connectivity and genetic diversity of *Eulaema atleticana* (Apidae, Euglossina) in the Brazilian Atlantic Forest Corridor: assessment of gene flow. *Biotropica* 48:509–517.
- ROSSI, R. V., G. V. BIANCONI, E W. A. PEDRO. 2006. Ordem Didelphimorphia. P. 27–66 in Mamíferos do Brasil (N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro & I. P. Lima, orgs.). Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.
- ROUSSET, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software

- for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103–106.
- SAMBROOK, J., E D. W. RUSSEL. 2006. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHMITT, L. H., A. J. BRADLEY, C. M. KEMPER, D. J. KITCHENER, W. F. HUMPHREYS, E R. A. HOW. 1989. Ecology and physiology of the northern quoll, *Dasyurus hallucatus* (Marsupialia, Dasyuridae), at Mitchell Plateau, Kimberley, Western Australia. *J. ZOOL. (Lond.)*:539–558.
- SCOTT, M. P. 1986. The Timing and Synchrony of Seasonal Breeding in the Marsupial , *Antechinus stuartii* : Interaction of Environmental and Social Cues *American Society of Mammalog. American Society of Mammalogists* 67:551–560.
- SELKOE, K. A., E R. J. TOONEN. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615–629.
- SINCLAIR, A. R. E. 2003. Mammal population regulation, keystone processes and ecosystem dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:1729–1740.
- SOUZA, D. P., P. H. ASFORA, T. C. LIRA, E D. ASTÚA. 2010. Small mammals in Barn Owl (*Tyto alba* - Aves, Strigiformes) pellets from Northeastern Brazil, with new records of *Gracilinanus* and *Cryptonanus* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalian Biology* 75:370–374.
- STRASSBURG, B. B. N. ET AL. 2017. Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology and Evolution* 1:1–3.
- THUSIUS, K. J., P. O. DUNN, K. A. PETERSON, E L. A. WHITTINGHAM. 2001. Extrapair paternity is influenced by breeding synchrony and density in the common yellowthroat. *Behavioral Ecology* 12:633–639.
- TURNER, M. M., C. S. DEPERNO, W. BOOTH, E. L. VARGO, M. C. CONNER, E R. A. LANCIA. 2016. The mating system of white-tailed deer under Quality Deer Management. *Journal of Wildlife Management* 80:935–940.
- UNESCO. 2002. *Vegetação no Distrito Federal: Tempo e Espaço. Uma Avaliação Multitemporal da Perda de Cobertura Vegetal no DF e da Diversidade Florística da Reserva da Biosfera do Cerrado – Fase I.* UNESCO.
- UNESCO. 2003. *Subsídios ao zoneamento da APA Gama-Cabeça de Veado e Reserva da Biosfera do Cerrado: caracterização e conflitos socioambientais.* UNESCO.
- UNTERGASSER, A. ET AL. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40:1–12.
- VALLADARES-GÓMEZ, A., J. L. CELIS-DIEZ, C. SEPÚLVEDA-RODRÍGUEZ, O. INOSTROZA-MICHAEL, C. E. HERNÁNDEZ, E R. EDUARDO PALMA. 2019. Genetic Diversity, population structure, and migration scenarios of the marsupial “Monito del Monte” in south-central Chile. *Journal of Heredity* 110:651–661.

- VARTIA, S. ET AL. 2014. Multiplexing with three-primer PCR for rapid and economical microsatellite validation. *Hereditas* 151:43–54.
- VIEIRA, E. M., N. F. DE CAMARGO, P. F. COLAS, J. F. RIBEIRO, E A. P. CRUZ-NETO. 2017. Geographic Variation in Daily Temporal Activity Patterns of a Neotropical Marsupial (*Gracilinanus agilis*). *PLoS ONE* 12:1–17.
- VIEIRA, M. V. 2006. Locomoção, morfologia e uso do habitat em marsupiais neotropicais: uma abordagem ecomorfológica. P. 145–156 in *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução* (N. C. Cáceres & E. L. A. Monteiro Filho, orgs.). Editora UFMS, Campo Grande.
- WAGNER, A. P., S. CREEL, E S. T. KALINOWSKI. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles 25:336–345.
- WAGNER, H., E K. SEFC. 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.
- WANG, J. 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference 70:300–321.
- WARWICK, A. R., J. TRAVIS, E E. M. LEMMON. 2015. Geographic variation in the Pine Barrens Treefrog (*Hyla andersonii*): Concordance of genetic, morphometric and acoustic signal data. *Molecular Ecology* 24:3281–3298.
- WEIR, B. S., E C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- WELCH, M. E. ET AL. 2017. Molecular variation and population structure in critically endangered Turks and Caicos Rock Iguanas: identifying intraspecific conservation units and revising subspecific taxonomy. *Conservation Genetics* 18:479–493.
- WOLF, R. W. ET AL. 2016. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7:449–456.
- WOOLLEY, P. A. 1971. Observations on the reproductive biology of the dibbler, *Antechinus apicalis*, (Marsupialia : Dasyuridae). *Journal of the Royal Society of Western Australia* 54:99–102.
- ZANGRANDI, P. L. 2018. Semelparidade em *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae): variação demográfica e fisiológica em remanescentes naturais de Cerrado do Distrito Federal. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Caracterização de 14 locos microssatélites analisados em *Gracilinanus agilis*: número de indivíduos genotipados ( $N$ ), número de alelos ( $N_A$ ), riqueza alélica ( $RA$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), frequência de alelos nulos ( $F_{AN}$ ). Desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni estão indicados em negrito ( $p \leq 0,0036$ ).

Loco	$N_A$	$A$	$RA$	Min-Max	$H_O$	$H_E$	Valor de P (EHW)	$F_{IS}$	Valor de P ( $F_{IS}$ )	$F_{AN}$
Gag 14	305	10	9,997	210-250	0,807	0,818	0,3990	0,014	0,3071	0,00096
Gag 19	304	12	12,000	208-260	0,845	0,847	0,0645	0,002	0,5393	0,01023
Gag 21	305	16	15,993	224-290	0,685	0,677	0,8409	-0,012	0,6714	0,00000
Gag 93	305	8	8,000	276-308	0,839	0,817	0,9241	-0,027	0,8750	0,00000
Gag 95	305	10	10,000	290-317	0,820	0,814	0,1399	-0,007	0,6679	0,00641
Gag 96	304	10	10,000	284-317	0,727	0,802	<b>0,0000</b>	0,094	<b>0,0036</b>	0,04444
Gag 115	305	18	17,993	300-351	0,915	0,919	0,6641	0,004	0,4321	0,00001
Gag 119	305	10	10,000	288-327	0,757	0,769	<b>0,0000</b>	0,015	0,3179	0,02204
Gag 122	305	6	6,000	311-331	0,810	0,750	0,9787	-0,080	0,9964	0,00000
Gag 155	305	11	11,000	343-383	0,843	0,861	0,2373	0,022	0,1679	0,00622
Gag 181	304	6	6,000	364-388	0,194	0,424	<b>0,0000</b>	0,543	<b>0,0036</b>	0,18497
Gag 189	305	7	7,000	388-412	0,764	0,730	0,6751	-0,046	0,9429	0,00001
Gag 192	305	6	6,000	384-404	0,734	0,782	<b>0,0000</b>	0,061	0,0286	0,04015
Gag 197	305	7	7,000	381-408	0,787	0,791	0,7213	0,005	0,4536	0,00001

**Anexo 2.** Avaliação conjunta dos resultados das análises de categorização do parentesco (ML\_Relate) e de alocação parental (Cervus) para a geração filial de 2015.

<b>FILHOS 2015</b>														
Filho	MAE	Valor de LOD	mismatches	confiança	ML-Relate	Critério	PAI	Valor de LOD	mismatches	confiança	ML-Relate	Critério	Trio-mismatches	confiança
<b>M_0364</b>	F_0014	1,01E+15	0	**	PO	1	M_0370	7,98E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0365</b>	F_0151	5,15E+14	1	**	FS	2	M_0234	9,41E+14	0	**	PO	1	2	**
<b>F_0367</b>							M_0234	3,26E+14	1	**	PO	1		
<b>F_0368</b>	F_0076	5,08E+14	0	**	PO	1	M_0210	1,05E+15	0	**	PO	1	3	*
<b>M_0369</b>	F_0207	9,17E+14	0	**	PO	1	M_0210	5,39E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0371</b>							M_0214	5,80E+14	0	**	PO	1		
<b>M_0372</b>	F_0315	6,43E+14	0	**	PO	1								
<b>F_0375</b>	F_0145	1,28E+15	0	**	PO	1	M_0226	8,22E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0377</b>	F_0203	8,33E+14	0	**	PO	1	M_0234	4,01E+14	1	**	PO	1	1	**
<b>F_0380</b>	F_0207	8,84E+14	0	**	PO	1	M_0210	1,04E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0381</b>	F_0014	8,08E+14	0	**	PO	1	M_0370	1,12E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0382</b>	F_0021	5,25E+14	1	**	FS	2	M_0012	6,09E+14	1	**	FS	2	3	*
<b>F_0383</b>	F_0315	7,12E+14	0	**	PO	1	M_0214	3,63E+14	1	**	HS	2	2	**
<b>M_0385</b>	F_0222	8,32E+14	0	**	PO	1								
<b>M_0386</b>	F_0151	7,47E+14	1	**	HS	2	M_0024	7,41E+14	0	**	PO	1	1	**
<b>F_0448</b>	F_0207	4,86E+14	0	**	PO	1	M_0024	9,56E+14	0	**	PO	1	1	**
<b>M_0449</b>							M_0225	3,65E+14	1	**	FS	2		
<b>F_0450</b>	F_0014	8,16E+14	0	**	PO	1	M_0210	5,95E+14	1	**	HS	2	1	**
<b>F_0452</b>	F_0315	7,35E+14	0	**	PO	1	M_0024	1,10E+15	0	**	FS	2	0	**
<b>F_0454</b>							M_0225	1,13E+15	0	**	PO	1		
<b>M_0455</b>							M_0136	7,33E+14	1	**	FS	2		
<b>M_0457</b>							M_0210	1,05E+15	0	**	PO	1		
<b>M_0459</b>	F_0139	9,50E+14	0	**	PO	1								
<b>F_0460</b>	F_0203	1,20E+15	0	**	FS	2	M_0214	1,02E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0461</b>	F_0014	2,61E+14	1	**	PO	1	M_0234	1,31E+15	0	**	FS	2	1	**

<b>M_0462</b>	F_0376	1,10E+15	0	**	PO	1	M_0225	8,28E+14	1	**	FS	2	1	**
<b>M_0463</b>							M_0210	7,65E+14	0	**	PO	1		
<b>M_0465</b>	F_0076	2,91E+14	1	**	FS	2								
<b>F_0466</b>	F_0151	1,06E+15	0	**	PO	1	M_0234	1,17E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0467</b>	F_0203	3,91E+14	1	**	HS	2								
<b>M_0468</b>	F_0228	4,94E+14	0	**	PO	1								
<b>F_0524</b>	F_0014	7,37E+14	0	**	PO	1	M_0370	9,53E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0526</b>	F_0203	7,48E+14	0	**	PO	1	M_0234	9,12E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0527</b>	F_0315	5,83E+14	0	**	PO	1								
<b>F_0528</b>	F_0315	8,40E+14	0	**	PO	1	M_0225	8,15E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0530</b>							M_0208	1,23E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0531</b>							M_0208	9,91E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0532</b>	F_0315	7,35E+14	0	**	PO	1	M_0210	1,06E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0533</b>							M_0208	1,07E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0536</b>	F_0207	1,09E+15	0	**	PO	1								
<b>M_0537</b>							M_0208	1,13E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0540</b>							M_0213	1,02E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0576</b>	F_0207	9,65E+14	0	**	FS	2	M_0210	5,91E+14	0	**	PO	1	1	**
<b>M_0628</b>	F_0203	5,50E+14	1	**	FS	2								
<b>M_0630</b>	F_0145	6,59E+14	0	**	PO	1								
<b>F_0634</b>							M_0210	8,99E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0635</b>	F_0138	3,80E+14	1	**	HS	2	M_0024	7,30E+14	1	**	HS	2	3	**
<b>F_0638</b>	F_0222	9,48E+14	0	**	PO	1	M_0213	5,05E+14	1	**	PO	1	1	**
<b>F_0639</b>							M_0223	8,88E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0781</b>							M_0208	6,60E+14	1	**	HS	2		

Fêmeas realçadas de rosa = Não pertencem à geração anterior. Machos realçados de verde = Não pertencem à geração anterior.

\*\* = Confiança estrita (95%). \* = Confiança relaxada (80%).



**Anexo 3.** Avaliação conjunta dos resultados das análises de categorização do parentesco (ML\_Relate) e de alocação parental (Cervus) para a geração filial de 2016.

<b>FILHOS 2016</b>														
<b>Filho</b>	<b>MÃE</b>	<b>Valor de LOD</b>	<b>Mismatches</b>	<b>Confiança</b>	<b>ML-Relate</b>	<b>Critério</b>	<b>PAI</b>	<b>Valor de LOD</b>	<b>Mismatches</b>	<b>Confiança</b>	<b>ML-Relate</b>	<b>Critério</b>	<b>TRIO-mismatches</b>	<b>Confiança</b>
<b>F_0687</b>	F_0460	8,76E+14	0	**	PO	1	M_0575	1,05E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0688</b>							M_0538	7,08E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0689</b>							M_0462	6,48E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0691</b>	F_0454	8,30E+14	0	**	PO	1	M_0462	9,46E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0692</b>	F_0461	9,70E+14	0	**	PO	1	M_0453	1,17E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0693</b>	F_0368	6,99E+14	0		PO	4	M_0462	9,65E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0694</b>	F_0526	1,03E+15	0	**	PO	1	M_0631	6,47E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0695</b>	F_0526	8,45E+14	0	**	PO	1	M_0575	8,42E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0696</b>	F_0383	9,35E+14	0	**	PO	1	M_0632	4,60E+14	2	**	FS	2	2	**
<b>F_0697</b>	F_0532	7,00E+14	0	**	PO	1	M_0453	1,14E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0698</b>	F_0454	9,10E+14	0	**	PO	1	M_0539	5,82E+14	0		PO	4	0	**
<b>F_0699</b>							M_0577	7,16E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0700</b>	F_0530	1,04E+15	0	**	FS	2	M_0577	5,29E+14	0		PO	4	0	**
<b>M_0701</b>	F_0383	8,99E+14	0	**	PO	1	M_0577	6,43E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0702</b>	F_0454	9,48E+14	0	**	PO	1								
<b>M_0703</b>	F_0383	8,44E+14	0	**	PO	1								
<b>M_0704</b>	F_0530	7,34E+14	0	**	PO	1	M_0449	6,52E+14	0		PO	4	1	**
<b>F_0707</b>	F_0454	8,96E+14	0	**	PO	1	M_0539	9,49E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0708</b>	F_0526	5,90E+14	0	**	PO	1	M_0577	5,52E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0710</b>	F_0460	1,01E+15	0	**	PO	1	M_0627	1,23E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0711</b>	F_0530	8,22E+14	0	**	PO	1								

<b>F_0775</b>	F_0526	1,01E+15	0	**	PO	1	M_0462	5,17E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0778</b>	F_0368	6,93E+14	0	**	PO	1	M_0462	6,63E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0780</b>	F_0368	8,29E+14	0	**	PO	1	M_0462	8,21E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0782</b>	F_0460	4,76E+14	1	**	PO	1	M_0462	1,15E+15	0	**	PO	1	1	**
<b>F_0784</b>	F_0460	5,99E+14	1	**	PO	1	M_0575	5,76E+14	1	**	FS	2	2	**
<b>F_0785</b>	F_0532	8,88E+14	0	**	PO	1	M_0468	4,92E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0786</b>	F_206	9,05E+14	0	**	PO	1	M_0462	4,88E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0787</b>	F_206	1,07E+15	0	**	PO	1								
<b>F_0788</b>	F_0460	7,28E+14	0	**	PO	1	M_0462	6,70E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0790</b>							M_0629	6,75E+14	0	**	PO	1		
<b>F_0791</b>	F_0526	8,78E+14	0	**	PO	1	M_0575	5,56E+14	1	**	FS	2	1	**
<b>F_0792</b>	F_0526	6,89E+14	0	**	PO	1	M_0577	8,85E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0793</b>	F_0460	7,51E+14	1	**	PO	1	M_0462	7,13E+14	0	**	PO	1	1	**
<b>M_0796</b>	F_0530	1,08E+15	0	**	PO	1	M_0577	5,02E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0797</b>							M_0633	1,09E+15	0	**	PO	1		
<b>M_0798</b>	F_0454	6,70E+14	0	**	PO	1	M_0539	7,16E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0799</b>	F_0454	7,78E+14	0		PO	4	M_0525	9,81E+14	0	**	PO	1	2	
<b>M_0800</b>							M_0535	1,29E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0801</b>							M_0633	1,05E+15	0	**	PO	1		
<b>F_0802</b>	F_0460	3,99E+14	1	**	PO	1	M_0462	1,16E+15	0	**	PO	1	1	**
<b>F_0803</b>	F_0368	8,87E+14	0	**	PO	1	M_0462	4,95E+14	0		PO	4	0	**
<b>F_0804</b>	F_0383	8,81E+14	0	**	PO	1	M_0577	3,46E+14	0	*	PO	3	0	**
<b>F_0806</b>	F_0460	6,36E+14	0	**	PO	1	M_0462	7,70E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0807</b>							M_0535	8,12E+14	1	**	HS	2		
<b>F_0838</b>	F_0383	8,18E+14	0	**	PO	1	M_0462	1,15E+15	0	**	FO	1	0	**
<b>M_0878</b>	F_0380	5,10E+14	1	**	FS	2	M_0577	5,98E+14	0		PO	4	1	**
<b>F_0879</b>	F_0528	9,38E+14	0	**	PO	1	M_0449	6,35E+14	0		PO	4	1	**
<b>M_0880</b>	F_0530	1,03E+15	0	**	PO	1	M_0449	4,60E+14	1	**	HS	2	1	**
<b>F_0881</b>	F_0530	5,85E+14	0	**	PO	1	M_0449	7,87E+14	0	**	PO	1	1	**

<b>M_0882</b>							M_0630	6,98E+14	0	**	PO	1		
<b>M_0883</b>							M_0630	8,18E+14	0	**	PO	1		
<b>M_0884</b>	F_0637	7,79E+14	0	**	PO	1	M_0629	7,38E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_0886</b>	F_0638	1,08E+15	0	**	PO	1								
<b>F_0888</b>	F_0530	8,58E+14	0	**	PO	1	M_0462	6,93E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0889</b>	F_0460	7,13E+14	0	**	PO	1	M_0462	7,71E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0890</b>	F_0530	8,88E+14	1	**	FS	2	M_0577	8,19E+14	0		PO	4	1	**
<b>F_0894</b>	F_0634	1,01E+15	0	**	PO	1								
<b>M_0896</b>							M_0636	5,51E+14	1	**	HS	2		
<b>F_0982</b>	F_0454	8,07E+14	0	**	PO	1	M_0539	6,89E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0983</b>	F_0634	1,08E+15	0	**	PO	1	<b>M_210</b>	4,59E+14	1	**	PO	1	2	*
<b>F_0984</b>	<b>F_206</b>	1,05E+15	0	**	PO	1	M_0462	4,39E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0985</b>	F_0536	6,95E+14	0	**	PO	1	M_0462	7,17E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_0986</b>	F_0536	9,41E+14	0	**	PO	1								
<b>M_0987</b>	F_0454	1,06E+15	0	**	PO	1	M_0628	9,98E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>F_1069</b>	F_0781	8,09E+14	0	**	PO	1								

Fêmeas realçadas de rosa = Não pertencem à geração anterior. Machos realçados de verde = Não pertencem à geração anterior.

\*\* = Confiança estrita (95%). \* = Confiança relaxada (80%).

**Anexo 4.** Avaliação conjunta dos resultados das análises de categorização do parentesco (ML\_Relate) e de alocação parental (Cervus) para a geração filial de 2017.

<b>FILHOS 2017</b>														
Filho	MÃE	Valor de LOD	Mismatches	Confiança	ML-Relate	Critério	PAI	Valor de LOD	Mismatches	Confiança	ML-Relate	Critério	TRIO-mismatches	Confiança
F_0988	F_0799	4,73E+14	1	**	PO	1								
F_0989	F_0894	9,12E+14	0	**	PO	1	M_0887	5,38E+14	0	**	PO	1	0	**
M_0991	F_0707	5,39E+14	1	**	HS	2								
F_0992	F_0806	6,43E+14	0	**	PO	1	M_0886	9,59E+14	0	**	PO	1	0	**
M_0994	F_0689	7,76E+14	0	**	PO	1								
F_0996	F_0689	7,89E+14	0	**	PO	1	M_0886	1,01E+15	0	**	PO	1	0	**
F_0998	F_0689	8,23E+14	0	**	PO	1	M_0886	1,12E+15	0	**	PO	1	0	**
M_1002	F_0689	8,70E+14	0	**	PO	1								
F_1004	F_0799	1,07E+15	0	**	PO	1								
F_1006	F_0985	5,90E+14	0	**	PO	1	M_0896	8,72E+14	0	**	PO	1	0	**
M_1007							M_0798	8,69E+14	0	**	PO	1		
F_1009	F_0982	6,67E+14	0	**	PO	1	M_0878	6,51E+14	0	**	PO	1	0	**
F_1010							M_0886	8,56E+14	0	**	PO	1		
M_1053	F_0889	4,50E+14	0	**	PO	1								
F_1054	F_0707	4,35E+14	1	**	HS	2								
F_1056	F_460	1,00E+15	0	**	PO	1								
F_1063	F_0707	8,35E+14	0	**	PO	1								
M_1065	F_0799	5,61E+14	1	**	HS	2								
F_1066	F_0707	9,78E+14	0	**	PO	1								
F_1067	F_0890	5,18E+14	1	**	HS	2								
M_1068	F_781	5,52E+14	0	**	PO	1								
F_1071							M_0883	1,46E+14	1	**	HS	1		

<b>F_1072</b>	F_0782	6,08E+14	1	**	PO	1								
<b>F_1075</b>	F_0799	1,01E+15	0	**	PO	1	M_0805	1,09E+15	0	**	PO	1	0	**
<b>M_1076</b>							M_1005	1,40E+15	0	**	PO	1		
<b>F_1080</b>							M_0896	9,47E+14	0	**	PO	1		
<b>M_1081</b>	F_0985	7,00E+14	0	**	PO	1	M_0896	7,66E+14	0	**	PO	1	0	**
<b>M_1090</b>							M_1005	1,44E+15	0	**	PO	1		

Fêmeas realçadas de rosa = Não pertencem à geração anterior. Machos realçados de verde = Não pertencem à geração anterior.

\*\* = Confiança estrita (95%). \* = Confiança relaxada (80%).

**Anexo 5.** Avaliação conjunta dos resultados das análises de categorização do parentesco (ML\_Relate) e de alocação parental (Cervus) para a geração filial de 2018.

<b>FILHOS 2018</b>														
Filho	MAE	Valor de LOD	Mismatches	Confiança	ML-Relate	Critério	PAI	Valor de LOD	Mismatches	Confiança	ML-Relate	Critério	TRIO-mismatches	Confiança
F_1086	F_1001	7,20E+14	0		PO	4	M_1064	7,29E+14	0		PO	4	0	**
F_1088	F_0799	4,97E+14	1	**	FS	2								
M_1092							M_1065	6,77E+14	0	**	PO	1		
M_1093	F_0698	9,33E+14	0	**	PO	1								
F_1097	F_0707	4,97E+14	1	**	HS	2	M_1064	8,82E+14	0	**	PO	1	1	**
F_1099							M_1062	1,08E+15	0	**	PO	1		

Fêmeas realçadas de rosa = Não pertencem à geração anterior. Machos realçados de verde = Não pertencem à geração anterior.

\*\* = Confiança estrita (95%). \* = Confiança relaxada (80%).