Dissertação de Mestrado

Keila Aparecida de Almeida

Filogenia, filogeografia e avaliação do código
de barras de DNA em roedores do gênero
Euryoryzomys (Sigmodontinae: Oryzomyini)

Phylogeny, phylogeography and DNA barcoding in the
identification of the genus *Euryoryzomys* (Sigmodontinae:
Oryzomyini)

São Paulo

2014

Dissertação de Mestrado

Keila Aparecida de Almeida

Filogenia, filogeografia e avaliação do código
de barras de DNA em roedores do gênero
Euryoryzomys (Sigmodontinae: Oryzomyini)

Phylogeny, phylogeography and DNA barcoding in the
identification of the genus *Euryoryzomys* (Sigmodontinae:
Oryzomyini)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Biologia (Genética), na
Área de Biologia (Genética).

Orientador(a): Dra Maria José de
Jesus Silva

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Almeida, Keila Aparecida de
Filogenia, Filogeografia e
avaliação do código de barras de DNA
em roedores do gênero *Euryoryzomys*
(Sigmodontinae: Oryzomyini)
Número de páginas 152

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. *Euryoryzomys* 2. Filogenia
molecular 3. Filogeografia I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Dra. Maria José de Jesus Silva
Orientadora

Dedico esta dissertação à memória da minha amada tia Maria Aparecida (Ieda), que viveu uma vida de doações, caridade, perseverança e respeito ao próximo nas mais diversas situações. Sempre presente.

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por fornecer a infraestrutura da pós-graduação e a todos os funcionários que se empenham todos os dias, nos dando suporte e fornecendo informações.

Aos professores do departamento, por compartilharem seus conhecimentos.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo fomento à pesquisa.

À Dra. Maria José de Jesus Silva pela orientação.

Ao Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, da Universidade de São Paulo e ao Dr. Pablo Jayat, da Universidade Nacional de Tucumán, pela cessão de amostras de tecidos e ao Dr. James L. Patton, Universidade da Califórnia, Berkeley, pela cessão de algumas sequências utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan, dirigido na época pelo professor Dr. Paulo Lee Ho, e ao técnico Msc. Leonardo Kobashi, cujas colaborações possibilitaram o sequenciamento das amostras.

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, onde esse trabalho foi desenvolvido.

À MSc. Taís Machado pela ajuda com os programas e sugestões e a MSc. Lorena Corina Bezerra de Lima pela ajuda e amizade ao longo do projeto.

Ao Dr. Elkin Suarez-Villota por compartilhar seu conhecimento com simplicidade e companheirismo, e pela leitura de uma versão preliminar.

À MSc. Camilla Bruno Di Nizo, também pela colaboração e leitura da versão preliminar do primeiro capítulo texto.

À MSc. Natália Araújo, por toda ajuda e disposição sempre que eu enviava um e-mail desesperado. Obrigada pela ajuda desde a graduação.

Ao Dr. João Morgante por ter aberto as portas do LABEC/USP na época em que eu estava na graduação e à Dra Caroline Cotrim Aires e MSc. Ana Carolina d'Oliveira Pavan pelas técnicas moleculares pacientemente ensinadas. Obrigada por terem me acolhido no início dessa empreitada.

Ao prof. Dr. Fábio Mesquita, pelo incentivo desde a graduação e agora como colega de trabalho na Universidade Paulista. Obrigada por compartilhar seu entusiasmo científico.

Às minhas novas companheiras de trabalho Ana Paula e Natália, por tornarem o Laboratório de Ciências da Saúde da Universidade Paulista um local de trabalho agradável, sempre companheiras e dispostas a ajudar.

Aos melhores amigos do mundo que tornaram essa fase da vida muito mais divertida: Denis, Fernanda, Gordo, Roberta, Sá, Junior, Roni, Vera, Rafael, Renata, Fabrício e Carlos Fernando. Obrigada pela amizade, viagens, risadas e os finais de semana divertidos que passamos juntos, vocês são especiais.

À amiga Mariana, pela amizade que desenvolvemos desde a graduação e que vai muito além da vida acadêmica. Obrigada também pela enorme ajuda que me deu na finalização da edição desse documento. Igualmente, agradeço ao Richard Capestrini, que juntamente com ela me ajudou na edição e finalização.

À amiga Adriana, por estar presente sempre. Não há parágrafos suficientes para demonstrar a imensa gratidão que tenho por você. Muito obrigada.

À minha família que participou direta e indiretamente dessa dissertação. Cada encontro de família sempre é uma renovação dos nossos valores, obrigada por me proporcionarem isso sempre que nos reunimos.

Ao meu pai Mário e minha mãe Edna pelos valores que me ensinaram, pela boa educação que me deram e por todo o sacrifício que passaram para que eu pudesse chegar aonde desejasse. Obrigada por compreenderem minha ausência.

Ao meu sobrinho Murillo pelo sorriso e esperteza que só uma criança cinco anos pode ter.

Finalmente, agradeço ao meu namorado Fernando pela paciência nas horas em que me ausentei para o estudo e por toda ajuda no tratamento das imagens, agradeço também pela amizade, carinho, amor e por estar comigo sempre. Meu amigo, companheiro e confidente, te amo.

Sumário

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ORDEM RODENTIA	10
1.2 TRIBO ORYZOMYINI	12
1.3 O GÊNERO EURYZOMYS	14
1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DE DNA	20
1.5 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BASEADA EM SEQUÊNCIAS DO GENE CITOCROMO OXIDASE I - DNA BARCODING.....	22
1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE FILOGEOGRAFIA	24
1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
 CAPÍTULO II – SISTEMÁTICA MOLECULAR EM ROEDORES DO GÊNERO <i>EURYZOMYS</i>	45
2. INTRODUÇÃO	48
2.1 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1.1 AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS 51	
2.1.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DISTÂNCIAS GENÉTICAS.....	52
2.2 RESULTADOS.....	64
2.2.1 FILOGENIA	64
2.3 DISCUSSÃO	72
2.4 CONCLUSÕES	78
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
 CAPÍTULO III – O POTENCIAL DO DNA <i>BARCODING</i> NA IDENTIFICAÇÃO DE ROEDORES DO GÊNERO <i>EURYZOMYS</i> (CRICETIDAE: SIGMODONTINAE: ORYZOMYINI).....	84
3. INTRODUÇÃO	87
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	88
3.1.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	89
3.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES NO BOLD E O TESTE DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES	89
3.2 RESULTADOS.....	90
3.2.1 TOPOLOGIA NEIGHBOR-JOINING	91
3.2.2 DISTÂNCIAS INTRA E INTERESPECÍFICAS.....	92

3.2.3 DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES APLICADA AO DNA <i>BARCODING</i>	93
3.3 DISCUSSÃO	94
3.4 CONCLUSÕES	99
 CAPÍTULO IV – FILOGEOGRAFIA DE <i>EURYORYZOMYS RUSSATUS</i> (SIGMODONTINAE: ORYZOMYINI): ESTRUTURA GENÉTICA E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA.....	115
4. INTRODUÇÃO	118
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	121
4.2.1 AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA, PCR, OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E ALINHAMENTO	121
4.2.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	121
4.2.3 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E ANÁLISES DEMOGRÁFICAS.....	122
4.3 RESULTADOS.....	122
4.3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	122
4.3.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E ANÁLISES DEMOGRÁFICAS	123
4.4 DISCUSSÃO	124
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
 RESUMO GERAL	142
ABSTRACT	145
APÊNDICE	148

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM RODENTIA

Os representantes da ordem Rodentia estão distribuídos por todos os continentes, com exceção da Antártica. Contudo, foram recentemente introduzidos pelo homem nas ilhas oceânicas (Eisenberg e Redford, 1999). Habitam florestas, savanas, pradarias, montanhas, desertos, rios e pântanos. Podem ter hábitos arborícolas, terrícolas, fossórios e semi-aquáticos. Alimentam-se de raízes, grãos, sementes, fungos, frutos, pequenos invertebrados, e alguns representantes chegam a pregar pequenos vertebrados (Nowak, 1991; Emmons e Feer, 1997).

Musser e Carleton (2005) enumeraram 2277 espécies na ordem Rodentia, o que corresponde a cerca de 40% da biodiversidade total de mamíferos do mundo, embora haja controvérsias quanto ao número de subordens para o grupo.

Atualmente, a ordem Rodentia está dividida em cinco subordens: Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha, Anomaluromorpha e Hystricomorpha, entretanto as relações entre elas ainda são incertas (Blanga-Kanfi *et al.*, 2009) e somente as três primeiras são consideradas monofiléticas (Musser e Carleton, 2005; Blanga-Kanfi *et al.*, 2009)

O contexto histórico demonstra que o estabelecimento de entidades taxonômicas precisas para os roedores é uma tarefa difícil em decorrência da ampla diversidade, abundância e adaptabilidade ecológica observadas, o que leva a uma imprecisão no número de espécies e gêneros em vários grupos, bem como em categorias taxonômicas mais elevadas (Weksler *et al.*, 2006; Blanga-Kanfi *et al.*, 2009). Essa situação é refletida na dificuldade de elaboração de hipóteses evolutivas, inclusive para a subfamília Sigmodontinae (Subordem Myomorpha; Família Cricetidae), que representa uma das radiações mais significantes dos roedores (Weksler, 1996; 2003; Smith e Patton, 1999; Patton *et al.*, 2000; Bonvicino e Moreira, 2001).

Na América do Sul, a subfamília Sigmodontinae é a mais abundante (Reig, 1984; Steppan, 1995; D'Elía, 2003; Steppan *et al.*, 2004) e, durante muito tempo, acreditou-se que os representantes dessa subfamília eram encontrados exclusivamente nessa região. Os roedores encontrados na

América do Norte pertenceriam, portanto, a outra subfamília, denominada Neotominae (Hooper e Musser, 1964; Carleton, 1980). Essa separação, proposta por diversos autores, tinha como base: dados de morfologia miológica, anatomia peniana, morfologia de glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino, estrutura do pêlo, morfologia de dentes e crânio, morfologia gástrica, zoogeografia, parasitologia e dados paleontológicos (Hooper e Musser, 1964; Vorontzov, 1967; Reig, 1986; Stewart e Goerlich, 1972; Reig, 1977; Voss e Linzey, 1981).

Posteriormente, foi observado que a distinção entre as subfamílias Sigmodontinae e Neotominae não era tão precisa quanto previamente estabelecida (Carleton e Musser, 1984; Musser e Carleton, 1993), de modo que Sigmodontinae se apresentava distribuída tanto nas Américas do Sul e Central quanto na América do Norte.

Em decorrência de sua complexidade, a subfamília Sigmodontinae passou a ser subdividida em tribos (Vorontzov, 1959; Reig, 1986), sendo sete propostas por Reig (1986): Oryzomyini (Vorontzov, 1959), Ichthyomyini (Vorontzov, 1959), Akodontini (Vorontzov, 1959), Scapteromyini (Massoia, 1979), Wiedomyini (Reig, 1980), Phyllotini (Vorontzov, 1959) e Sigmodontini (Wagner, 1843).

Atualmente, nove tribos são reconhecidas, sendo elas: Abrotrichini (D'Elia *et al.*, 2003), Akodontini, Ichthyomyini, Phyllotini, Thomasomyini (Steadman e Ray, 1982), Reithrodontini (Vorontzov, 1959), Sigmodontini, Wiedomyini e Oryzomyini, sendo essa última constituída por um número variável de gêneros, subgêneros e espécies, e considerada como um dos grupos de roedores neotropicais mais complexo (Reig, 1986).

As relações filogenéticas entre as tribos também são alvos de incertezas e discussões na literatura. Com base em dados morfológicos, alguns autores afirmam que Oryzomyini é a tribo mais basal da subfamília Sigmodontinae, entretanto estudos integrando caracteres morfológicos e moleculares demonstram que as tribos mais basais seriam Ichthyomyini e Sigmodontini (Weksler, 2003).

1.2 TRIBO ORYZOMYINI

Oryzomyini é a tribo que possui o maior número de representantes de Sigmodontinae, pois compreende 35% das espécies descritas atualmente para a subfamília (Miranda, 2007). Apresenta grande diversidade anatômica e ecológica (Reig, 1984) e este fato é refletido em uma imprecisão no número de seus componentes e suas relações filogenéticas (Weksler *et al.*, 2006).

Embora a tribo seja considerada como monofilética (Steppan, 1995; Weksler, 2003), sua subdivisão em categorias genéricas não está bem estabelecida, pois há grande dificuldade na distinção de suas entidades taxonômicas, o que resulta em controvérsias entre os diferentes autores (Weksler, 1996).

Reig (1980, 1984, 1986), por exemplo, agrupou 13 gêneros e cerca de 110 espécies na tribo Oryzomyini: *Aepeomys*, *Chilomys*, *Delomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Nezoryzomys*, *Oecomys*, *Oryzomys*, *Phanomys*, *Rhipidomys*, *Scolomys*, *Thomasomys* e *Wilfredomys*.

Musser e Carleton (1993) consideraram pertencentes à tribo somente 10 gêneros: *Melanomys*, *Microryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Nezoryzomys*, *Oecomys*, *Oryzomys*, *Oligoryzomys*, *Sigmodontomys* e *Scolomys*, ressaltando que os gêneros *Aepeomys*, *Delomys*, *Phaenomys*, *Rhipidomys*, *Thomasomys* e *Wilfredomys*, propostos por Reig (1980, 1984, 1986), seriam pertencentes à tribo Thomasomyini, e *Chilomys*, embora um gênero agrupado em Oryzomyini, estaria mais proximamente relacionado à Thomasomyini.

Voss e Carleton (1993), além de definirem as sinapomorfias morfológicas que confirmaram a tribo como monofilética, relacionaram como pertencentes à sua composição os 14 gêneros a seguir: *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Zygodontomys*, *Lundomys*, *Megalomys*, *Microryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Nesoryzomys*, *Pseudoryzomys*, *Holochilus*, *Oecomys*, *Scolomys* e *Sigmodontomys*.

Mais tarde, Musser e Carleton (2005) consideraram a tribo com 18 gêneros para a tribo: *Amphinectomys*, *Handleyomys*, *Holochilus*, *Lundomys*, *Megalomys*, *Melanomys*, *Microakodontomys*, *Microryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Nesoryzomys*, *Noronhomys*, *Oecomys*, *Oligoryzomys*,

Pseudoryzomys, *Sigmodontomys*, *Zygodontomys* e *Oryzomys*, sendo este último o mais numeroso e controverso gênero da tribo.

O monofiletismo de *Oryzomys* permaneceu incerto por décadas e sua diversidade passou a ser caracterizada em grupos de espécies. De acordo com Musser e Carleton (1993), as espécies do gênero *Oryzomys* foram divididas em sete grandes grupos, sendo eles: (1) *albigularis*, (2) *alfaroi*, (3) *capito*, (4) *melanotis*, (5) *palustres*, (6) *subflavus* e (7) *nitidus* e um grupo *incertae sedis*.

Trabalhos multidisciplinares, utilizando dados morfológicos e análises de dados moleculares, foram realizados na tentativa de investigar as relações filogenéticas desses grupos, cuja composição sempre sofreu alterações ao longo do tempo (Bonvicino e Moreira, 2001; Weksler, 2003; Weksler *et al.*, 2006). Sob esta perspectiva, Weksler *et al.* (2006) elevaram à categoria de gênero alguns desses membros anteriormente pertencentes a esses grupos de espécies. Os autores utilizaram caracteres morfológicos, dados de distribuição geográfica e sistemática molecular, que permitiram reconhecer 10 novos gêneros a partir de *Oryzomys*, sendo eles: *Aegialomys*, *Eremoryzomys*, *Euryoryzomys*, *Hylaeamys*, *Mindomys*, *Nephelomys*, *Oreoryzomys*, *Sooretamys*, *Transandinomys* e *Cerradomys*. O gênero *Oryzomys* ficou restrito às espécies do grupo *palustris*.

Posteriormente, também com base em dados morfológicos e moleculares, um novo gênero endêmico da Mata Atlântica foi descrito como pertencente à Tribo Oryzomyini e recebeu o nome de *Drymoreomys* (Percequillo *et al.*, 2011).

Pine *et al.* (2012) elevaram à categoria de gênero a espécie então denominada *Sigmodontomys aphrastus* a *Tanyuromys aphrastus*, descrevendo, portanto, um novo gênero presente em regiões da Costa Rica e Equador, ocorrendo predominantemente em regiões transandinas.

Mais recentemente, Machado *et al.* (2013) caracterizaram como um gênero novo a espécie extinta *Holochilus primigenus* (Steppan, 1996). Inicialmente, essa espécie foi confundida com *Lundomys* devido à semelhança entre os molares, entretanto era mais próxima filogeneticamente de *Holochilus*. Somente com a descoberta de que *Noronhomys* e *Carletonomys* eram gêneros mais próximos de *Holochilus* do que *H. primigenus*, sua validade

como espécie pertencente ao gênero foi questionada e hoje considerada pertencente ao gênero *Reigomys* (Machado *et al.*, 2013).

Acredita-se que a tribo Oryzomyini seja composta atualmente pelos gêneros vivos, conforme Tabela 1.1. Entretanto, as relações filogenéticas entre eles e a distribuição geográfica também são alvos de controvérsias (Weksler, 2003) e muitos estudos envolvendo abordagens multidisciplinares têm sido desenvolvidos com o intuito de esclarecer essas relações (Percequillo *et al.*, 2011; Pine *et al.*, 2012).

O presente trabalho tem como objetivo realizar estudos moleculares em *Euryoryzomys*, um dos gêneros pertencentes à tribo Oryzomyini, para o qual estão descritos vários problemas de sistemática. A seguir, será realizada uma compilação de informações taxonômicas, citogenéticas, de distribuição geográfica e sistemática para o gênero, alvo de controvérsias entre muitos autores.

1.3 O GÊNERO *EURYORYZOMYS*

Anteriormente reconhecido como *Oryzomys* do grupo *nitidus*, *Euryoryzomys* compreende um conjunto de sete espécies: *E. emmonsae* Musser *et al.*, 1998; *E. lamia* Thomas, 1901; *E. legatus* Thomas, 1925; *E. macconnelli* Thomas, 1910; *E. nitidus* Thomas, 1910; *E. russatus* Wagner, 1848; e *Euryoryzomys* sp., espécie reconhecida para o grupo com base em dados cariotípicos, porém ainda não descrita formalmente (Silva *et al.*, 2000).

Essas espécies estão distribuídas em regiões de elevada a baixa altitude, ocorrendo em zonas tropicais andinas, até as demais planícies subtropicais (Musser e Carleton, 2005; Weksler *et al.*, 2006; Miranda, 2007). Com exceção de *E. legatus*, todas as outras espécies ocorrem no Brasil (Figura 1.1) (Bonvicino *et al.*, 2008).

Morfologicamente, os representantes desse gênero apresentam características semelhantes entre si, o que dificulta sua precisa identificação (Mattevi e Andrades-Miranda, 2006). Caracteristicamente, apresentam pelagem fina e grisalha, com um tom amarelado ou marrom-avermelhado no dorso e coloração esbranquiçada no ventre, as caudas são pouco pilosas, com comprimento similar ou maior com relação ao do corpo, e as patas são longas e estreitas, em geral, recobertas por pelos claros (Bonvicino *et al.*, 2008).

O estudo realizado por Patton *et al.* (2000), utilizando cinco espécies do gênero¹ (*E. nitidus*, *E. legatus*, *E. emmonsae*, *E. macconnelli* e *E. russatus*) e 801 pares de bases (pb) do gene citocromo-*b* (*cyt-b*), possibilitou a recuperação de dois clados principais (Figura 1.2), porém as relações entre eles são incertas. O primeiro clado apresentou as espécies *E. nitidus* e *E. legatus* como espécies-irmãs das demais, entretanto não há suporte para separar *E. nitidus* de *E. legatus*; o outro clado é formado por uma politomia entre *E. emmonsae*, *E. russatus* e *E. macconnelli*. O mesmo estudo também sugeriu a ocorrência de mais de uma espécie no clado composto por *E. macconnelli* (*bootstrap*=73), já que apareceu dividido em dois subclados com representantes ao norte (*bootstrap*=92) e ao sul (*bootstrap*=100) e um valor de divergências genéticas esperadas para espécies diferentes (11,10%).

Especificamente neste grupo de roedores, a citogenética desempenha um papel importante na caracterização de algumas espécies, como no caso de *E. lamia* e *E. macconnelli*, que apresentam grande diversidade cariotípica. Porém em alguns casos, como *E. emmonsae*, *E. nitidus* e *E. russatus*, a semelhança do cariótipo e dos padrões de bandas são pouco informativos, de modo que a associação de estudos moleculares, utilizando sequências do DNA nuclear e mitocondrial, têm desempenhado papel fundamental na obtenção de reconstruções filogenéticas, recuperando a história evolutiva do gênero.

Abaixo é apresentado um breve histórico das espécies do gênero *Euryoryzomys*, contemplando informações citogenéticas e de suas áreas de distribuição, compiladas na Tabela 1.2.

Euryoryzomys russatus

Euryoryzomys russatus é a espécie melhor reportada na literatura. Na década de 1980, considerava-se que exemplares de *Euryoryzomys nitidus* (então, *Oryzomys nitidus*) ocorriam na Mata Atlântica (Sbalqueiro *et al.*, 1987). Posteriormente, esses exemplares foram considerados sinônimos de *Oryzomys intermedius*, e hoje são denominados *E. russatus* (Weksler *et al.*, 2006). Esse equívoco ocorreu porque *E. russatus* apresenta uma composição

¹ *Euryoryzomys* foi reconhecido somente em Weksler *et al.* (2006), sendo assim, em Patton *et al.* (2000), as espécies do gênero eram ainda denominadas *Oryzomys* do grupo *nitidus*

cariotípica idêntica a de *E. nitidus* ($2n=80$ e NF (número fundamental), que corresponde ao número de braços dos cromossomos autossomos) = 86, cuja descrição foi realizada por Gardner e Patton (1976). O padrão de bandas também é similar nas duas espécies (Almeida, 1980; Sbalqueiro *et al.*, 1987; Geise, 1995).

Somente um registro de variação cromossômica foi encontrado para a *E. russatus*. Trata-se de um rearranjo do tipo inversão pericêntrica em um dos pares cromossômicos acrocêntricos, resultando em um NF=88 (Geise, 1995). Weksler (1996) sugere que a semelhança cariotípica apresentada entre as duas espécies seja, na realidade, reflexo de uma plesiomorfia presente entre elas.

Contudo, *E. russatus* difere das demais espécies do gênero em relação ao tamanho do corpo, sendo maior do que *E. nitidus*, por exemplo. A análise minuciosa de características dos molares e da pelagem também são caracteres morfológicos diagnósticos entre essas duas espécies, uma vez que *E. russatus* apresenta crânio mais robusto e molares maiores, além de pelagem mais brilhante em relação a *E. russatus* (Tabela 1.2) (Musser *et al.*, 1998).

A distribuição de *E. russatus* é predominantemente descrita em regiões de Mata Atlântica, atingindo toda sua extensão, e tem como limites a região norte do estado da Paraíba e sul do estado do Rio Grande do Sul, coincidindo com os limites das florestas subtropicais, atingindo a região de Misiones, Argentina (Weksler, 1996; Musser *et al.*, 1998; Carleton e Musser, 2005). Já foram descritas capturas em Minas Gerais em altitudes variáveis, desde regiões de baixada até áreas montanhosas. Em geral, essas regiões apresentam mosaicos vegetacionais com tipos de Mata Atlântica e Cerrado (Figura 1.1).

Euryoryzomys nitidus

Euryoryzomys nitidus, então *Oryzomys nitidus*, foi descrito primeiramente como uma variedade de *Hesperomys laticeps* baseado em indivíduos coletados em Amable Maria e Junín, no Peru; contudo, Thomas não designou um holótipo na ocasião e, somente no ano de 1927, foi designado um lectótipo proveniente da mesma localidade, Amable Maria (Weksler, 1996;

Musser *et al.*, 1998). Em 1976, cerca de 50 anos mais tarde, Gardner e Patton descreveram para as espécies do Peru as características diagnósticas morfológicas e estabeleceram $2n=80$ e $NF=86$.

E. nitidus está distribuído a leste dos Andes no Peru, em regiões a oeste do Brasil e Bolívia, e áreas a sudoeste do Paraguai e noroeste da Argentina, regiões predominantemente ocupadas por Floresta Amazônica (Figura 1.1). Poucos representantes foram encontrados nas regiões centrais e sudeste do Brasil e parecem estar ausentes ao norte do Rio Amazonas, Venezuela e Guiana (Musser *et al.*, 1998). Não foi encontrada sobreposição com *E. emmonsae*, mas ocorre em simpatria com *E. macconnelli* (Zanchin, 1988; Bonvicino *et al.*, 2008) na região da Amazônia peruana e brasileira (Figura 1.1).

Euryoryzomys emmonsae

O holótipo encontrado na margem oeste do Rio Xingu a 52 km da cidade de Altamira, situada no estado do Pará, Brasil, refere-se à espécie que parece estar restrita a regiões de floresta amazônica e se sobrepõe à distribuição de *E. macconnelli* e de duas espécies do gênero *Hylaeamys*: *H. megacephalus* e *H. yunganus*. Morfologicamente é a menor espécie do gênero e se assemelha a *E. nitidus*, contudo as áreas de distribuição de ambas são disjuntas e distantes uma da outra (Figura 1.1).

Musser *et al.* (1998) evidenciaram que *E. emmonsae* já foi confundida em outras ocasiões com exemplares de *E. macconnelli*. Esses mesmos autores afirmaram ainda que a área de ocorrência de *E. emmonsae* deve ser bem mais abrangente do que a descrita para o holótipo e que espécimes depositados em museus, provenientes de regiões do Rio Xingu, Tocantins ou Tapajós, devem ser examinados com cautela, devido às semelhanças fitofisionômicas entre esses lugares e a região na qual o holótipo foi encontrado. A composição cariotípica é semelhante a de *E. russatus* e *E. nitidus* ($2n= 80$, $NF= 86$).

Euryoryzomys macconnelli

Euryoryzomys macconnelli foi chamado por Thomas (1910) de *Oryzomys macconnelli* e descrito na região do Rio Supenaam, ao norte da Guiana. Posteriormente, foi chamado de *incertus* (Allen, 1913) e, em seguida, de *mureliae* (Allen, 1915).

Ocorre na região norte da América do Sul: seus limites a leste são Belém e Rio Tocantins, ocupando toda a área da bacia amazônica; a oeste, em regiões ao sul do Peru, Colômbia e sul do Equador; ao norte, atinge Venezuela, Suriname e Guianas; e ao sul é limitado pela área de ocorrência da Floresta Amazônica, no Brasil. Juntamente com *E. russatus*, *E. macconnelli* é a espécie de maior distribuição dentro do gênero (Figura 1.1) (Musser *et al.*, 1998; Bonvicino *et al.*, 2008).

Inicialmente, *E. macconnelli* havia sido comparada com *Oryzomys intermedius* (atual *Euryoryzomys russatus*), contudo, diferenças na pelagem distinguem as espécies (Tabela 1.2). Embora tenha sido sinonimizada a outros grupos ao longo do tempo, *E. macconnelli* sempre recebeu *status* de espécie válida e essa informação foi reforçada com a publicação de caracteres diagnósticos e de seu cariótipo por Gardner e Patton (1976). Exemplares de *E. macconnelli* coletadas no Brasil apresentam $2n=64$ e $NF=70$, o mesmo encontrado por Gardner e Patton (1976) para as espécies localizadas no Peru. Entretanto, apresentam variação no $2n$ e NF (Tabela 1.2), o que indica que pode se tratar de um complexo de espécies.

A filogenia publicada por Patton *et al.* (1996), utilizando 801 pb do marcador molecular *cyt-b* e quatro espécies do gênero, mostrou que havia uma relação entre *E. russatus* e *E. macconnelli*, todavia, o suporte para essa informação foi pouco expressivo. Pouco tempo depois, Patton *et al.* (2000) publicaram uma nova filogenia do gênero, dessa vez incluindo dados de outras espécies e localidades, evidenciando que essa relação não era estável e o resultado foi um clado politômico entre *E. macconnelli*, *E. emmonsae* e *E. russatus* (Figura 1.2).

Euryoryzomys lamia

Euryoryzomys lamia é a única espécie do gênero, cuja distribuição está restrita ao Cerrado (Bonvicino *et al.*, 2008). Tem como localidade tipo uma região do Rio Jordão em Araguari, no estado de Minas Gerais. Foi, inicialmente, comparada com espécies do grupo *subflavus* (atualmente, denominado gênero *Cerradomys*), entretanto sua semelhança morfológica externa e proximidade com a distribuição de *O. intermedius* (atual *E. russatus*) fez com que alguns autores a considerassem uma extensão da distribuição desse último. Posteriormente, diferenças sutis na coloração e no crânio evidenciaram que se tratavam de espécies distintas e *E. lamia* está mais relacionada a um grupo composto por *E. nitidus* e *E. legatus* (Weksler, 1996). Além disso, o cariótipo foi um importante caráter diagnóstico entre elas: *E. russatus* apresenta $2n=80$ e $NF=86$, e para *E. lamia* foram descritos três números diplóides: $2n=58$, 60 e 64 e $NF=84$ (Bonvicino *et al.*, 1998; Andrades-Miranda *et al.*, 2000; Mattevi e Andrades-Miranda, 2006).

Dessa forma, as diferenças de números diplóides puderam caracterizar as espécies e, no caso de *E. lamia*, ainda pode indicar a existência de espécies crípticas, já que a variabilidade de cariótipos descrita pode representar mais de uma espécie válida (Mattevi e Andrades-Miranda, 2006). Morfologicamente, é a maior espécie do grupo, o que parece ser uma autapomorfia (Weksler, 1996).

As filogenias sugerem que esta espécie seja profundamente relacionada com *E. nitidus*, *E. legatus* e *Euryoryzomys* sp., sendo esta última encontrada na Serra de Ibiapaba, estado do Ceará (Weksler, 1996), porém poucos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de esclarecer essas relações e existem poucos exemplares de *E. lamia* coletados e depositados em museus, o que dificulta análises mais aprofundadas de seus limites de distribuição e relações com as outras espécies do gênero.

Euryoryzomys legatus

De acordo com Musser e Carleton (1993), *E. legatus* é a única espécie do grupo que não ocorre no Brasil, distribuindo-se apenas ao leste dos Andes,

em regiões centro e sul da Bolívia, chegando até o noroeste da Argentina (Figura 1.1), sendo seu cariótipo ainda desconhecido.

***Euryoryzomys* sp. SB**

Weksler (1996) descreveu os caracteres morfológicos e apresentou dados de distribuição geográfica para indivíduos da região da Serra de Ibiapaba, no estado do Ceará, região encontrada em um enclave florestal. Essas regiões, em geral, se encontram em serras e planaltos da região semi-árida, cercadas pela vegetação típica do bioma Caatinga e são conhecidas popularmente como *brejos de altitude* (Mori, 1989; Cardoso, 2011). Apresentam fitofisionomias de áreas de Mata Atlântica e Amazônia (Andrade-Lima, 1982; Cardoso, 2011) e encontram-se em altitudes mais elevadas em relação à vegetação típica da região.

Em 2000, Silva e colaboradores publicaram um artigo descrevendo o cariótipo de uma espécie pertencente ao grupo *nitidus*, com $2n=76$ e $NF=86$. Os animais foram capturados na Serra de Baturité, também no estado do Ceará, em uma região próxima à Serra de Ibiapaba, local onde os exemplares de Weksler (1996) foram capturados. Entretanto, embora a vegetação da Serra do Baturité seja semelhante à de Ibiapaba, ambas estão separadas por um extenso território de vegetação semi-árida e com condições climáticas bastante diferentes em relação às encontradas nas serras.

Considerando que os exemplares das duas localidades não foram comparados morfológicamente, não é possível confirmar que se tratam da mesma espécie e consideraremos neste trabalho somente os exemplares tratados em Silva *et al.* (2000), pois possuem cariótipo estabelecido, confirmando sua similaridade com as demais espécies do gênero *Euryoryzomys*. Neste trabalho, serão chamadas de *Euryoryzomys* sp. SB.

1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DE DNA

Estudos filogenéticos tratam das relações ancestrais entre espécies ou genes. Possuem uma grande importância em diversos campos, tais como sistemática e taxonomia, no estudo de famílias de genes, demografia, evolução de patógenos, entre outros. Esses estudos, em geral, são

representados por diagramas ou árvores filogenéticas que indicam as relações de ancestralidade e partem do pressuposto que todas as espécies possuíram um ancestral comum, mesmo que esse não possa ser representado diretamente ou por meio de fósseis. Esses diagramas são compostos por nós conectados a ramos, onde cada nó representa um evento de especiação e as ramificações representam a persistência de uma determinada linhagem ao longo do tempo (Swofford *et al.*, 1996; Graur e Li, 2000; Yang e Rannala, 2012). Diversos dados podem ser utilizados para a reconstrução de uma filogenia, inclusive fósseis, dados morfológicos binários (como de presença ou ausência) e, nas últimas duas décadas, dados moleculares.

As metodologias mais utilizadas para a reconstrução de filogenias moleculares estão divididas em duas categorias: métodos baseados em distâncias e métodos baseados em caracteres (Yang e Rannala, 2012). No primeiro grupo, a distância é calculada para cada par de sequências usando pares de táxons. Já o segundo inclui os métodos de Máxima Parcimônia [MP] (Swofford *et al.*, 1996; Miyaki *et al.*, 2012; Yang e Rannala, 2012), Máxima Verossimilhança [MV] (Felsenstein, 1981) e Inferência Bayesiana [IB] (Huelsenbeck e Ronquist, 2005). Esses últimos são conhecidos por compararem todas as sequências de um dado alinhamento, considerando cada sítio (nucleotídeo), como sendo um caráter.

O método de MP foi inicialmente desenvolvido para análises de caracteres morfológicos discretos e tem como principal característica identificar a topologia que requer o menor número de mudanças evolutivas, isto é, mudanças nucleotídicas. Além disso, é um método cuja base teórica é de fácil compreensão; entretanto seu viés evidencia-se por não possibilitar a inclusão de um modelo evolutivo que permita corrigir substituições múltiplas (Felsenstein, 1982; Swofford, 1982; Swofford *et al.*, 1996; Graur e Li, 2000).

O método de MV, por outro lado, permite a inclusão de um modelo, porém exige uma demanda computacional muito grande. O mesmo ocorre com IB, pois esses dois métodos são matematicamente relacionados (Pereira, 2012). MV estima a probabilidade de que os dados observados tenham sido gerados de acordo com uma hipótese, por outro lado, IB calcula a probabilidade de que uma hipótese esteja correta, partindo do princípio que os dados possuam valores de distribuição *a priori*, para isso, o método utiliza

simulações de cadeia de Markov, que geram uma amostragem a *posteriori*, sendo esta a responsável por apontar a probabilidade de existência dos agrupamentos (Yang e Rannala, 1997).

Devido à dificuldade na análise de marcadores que sofrem recombinação, a grande maioria desses trabalhos apresentam análises filogenéticas baseadas em marcadores que não sofrem recombinação, particularmente os encontrados em moléculas de DNA mitocondrial. Porém, em alguns casos, essas informações podem ser insuficientes para representar a história evolutiva de um grupo, de modo que o emprego de marcadores nucleares se faz necessário.

Dados moleculares têm sido amplamente utilizados em diversos grupos de roedores e muitos estudos estão contribuindo para a caracterização dos gêneros, revisão do número de espécies e estabelecimento das relações evolutivas entre eles, especialmente quando utilizados em caráter multidisciplinar.

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BASEADA EM SEQUÊNCIAS DO GENE CITOCROMO OXIDASE I - *DNA BARCODING*

A técnica de DNA *barcoding* tem como objetivo discriminar espécies e acelerar o processo de identificação da biodiversidade de forma auxiliar à taxonomia (Hebert *et al.*, 2003), sem, contudo, estabelecer suas relações filogenéticas - embora em alguns casos seja possível apontar para a taxonomia a existência de novas espécies (Hajibabaei *et al.*, 2007).

A sequência utilizada para o DNA *barcoding* em mamíferos (e também para alguns invertebrados, anfíbios e peixes) é a do gene que codifica para a proteína *coxI*, que possui cerca de 670 pb, iniciando seu sequenciamento na posição da base 58 na extremidade 5' e seguindo até cerca da base de número 705.

Inicialmente, o método propunha atribuir uma espécie aos espécimes desconhecidos e contribuir na identificação de espécies crípticas e de microorganismos, uma vez que a morfologia para esses organismos é de difícil compreensão (Hebert *et al.*, 2003; Frézal e Leblois, 2008). Posteriormente, surgiram outras aplicações e o método passou a contribuir nas áreas de ecologia, medicina, agronomia, epidemiologia, entre outras.

Tendo em vista que trabalhos empregando sequências de DNA para desenvolver estudos da biodiversidade não são novidades na literatura, o fator diferencial do DNA *barcoding* consiste na padronização da técnica com o objetivo de criar um banco de dados de sequências do gene *coxI* para todas as espécies existentes, facilitando a identificação rápida de qualquer exemplar em qualquer lugar do mundo, inclusive por não-taxonomistas (Frézal e Leblois, 2008).

O funcionamento do método dá-se por meio da estimativa de distância resultante da comparação de sequências ortólogas de um gene, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2p) (Kimura, 1980), que considera as transversões e transições com taxas diferentes, além de assumir a possibilidade de múltiplas substituições, sendo as transições mais frequentes. Além disso, o teste também incorpora o algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ) para a representação das distâncias obtidas.

Em geral, são aceitas amostras cuja similaridade seja de, pelo menos, 98% quando comparadas com o banco de dados *The Barcoding of Life Database* (BOLD) e os resultados são visualizados em gráficos de frequências em que as distâncias intraespecíficas (em geral mais baixas) não se sobrepõem às interespecíficas (distâncias maiores). Hebert *et al.* (2003) propuseram que o *barcode gap* entre essas duas medidas forneceria evidência de que as sequências de um único gene podem fornecer uma identificação confiável para a maioria das espécies e sugeriram que haja pelo menos 10% de diferença em relação a distância máxima intra-específica e a distância mínima interespecífica entre as espécies mais próximas (Hebert *et al.*, 2003).

Existem controvérsias em relação à utilização da metodologia e a crítica alega que os métodos empregados não refletem a determinação de caracteres diagnósticos e sim a distância numérica entre sequências nucleotídicas (Yassin *et al.*, 2010), logo, seriam métodos dependentes de amostragem (Frézal e Leblois, 2008).

Muitas propostas relativas às formas de análises já surgiram na literatura abordando métodos filogenéticos, estatísticos ou populacionais (DeSalle *et al.*, 2005; Elias *et al.*, 2007; van Velzen *et al.*, 2012). Em geral, a maior discussão está no conceito de espécie empregado (Gonçalves, 2009). Entretanto, o DNA *barcoding* é compatível com qualquer conceito quando o

objetivo final é a identificação de um espécime desconhecido em relação a uma espécie descrita ou ao seu holótipo.

Há, ainda, questionamentos sobre os genes empregados (Moritz e Cicero, 2004), sendo que muitos testes já foram feitos com centenas de potenciais marcadores para a diagnose das espécies, tanto de animais como de plantas (Hebert *et al.*, 2004).

Outros fatores foram apontados como restringindo a aplicação da técnica na delimitação de todas as espécies, por exemplo: (i) herança predominantemente materna; (ii) retenção de polimorfismo ancestral, que poderia subestimar o número de espécies; (iii) cópias do *coxI* na porção nuclear do genoma, que levariam a superestimativa do número de espécies; (iv) heteroplasma, entre outros (Moritz e Cicero, 2004; Gonçalves, 2009). Entretanto, conforme dito anteriormente, outros tipos de análises estão surgindo com o objetivo de serem incorporados ao DNA *barcoding* e resolver particularidades que não podem ser resolvidas com o método em si.

Esse método tem se mostrado particularmente importante para o grupo de roedores, pois, além das questões de sistemáticas pouco esclarecidas, existe também o fato de os roedores serem reservatório de zoonoses de relevante interesse para saúde pública (Muller *et al.*, 2013).

Embora alguns estudos multidisciplinares tenham sido desenvolvidos nas últimas décadas, ainda permanecem na literatura muitos problemas de sistemática para o gênero, por exemplo, incertezas em relação ao número de espécies, distribuições não definidas para todos os integrantes conhecidos até o momento, desconhecimento sobre preferências por habitats, padrões reprodutivos ou sobre o impacto que poderiam causar na conservação da biodiversidade (de Vivo *et al.*, 2011). Entretanto, para que essas relações sejam esclarecidas e o grupo seja mais bem compreendido, é importante que trabalhos com enfoques multidisciplinares (sistemática, ecologia, genética, etc.) sejam amplamente realizados.

1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE FILOGEOGRAFIA

Filogeografia é um termo empregado em estudos que visam entender os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas no tempo e no espaço, especialmente enfocando relações

dentro e entre espécies proximamente relacionadas (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2000).

O marcador molecular inicialmente utilizado para essas análises é o DNA mitocondrial. Entretanto, estudos filogeográficos podem ser realizados com fontes variadas de dados, desde que a análise seja baseada em uma perspectiva filogenética ao longo de uma distribuição geográfica (Avice, 2000). Sendo assim, com base em diferentes marcadores, a filogeografia permite investigar a evolução de diferentes linhagens, correlacionando-as aos eventos históricos que atuaram em sua diversificação, a partir de padrões geográficos e identificação de estruturação dessas linhagens. Avice *et al.* (1987) identificaram cinco padrões teóricos básicos, sendo eles: descontinuidades filogenéticas e separação espacial; descontinuidades filogenéticas e ausência de separação espacial, continuidade filogenética e separação espacial, continuidade filogenética e ausência de separação espacial e continuidade filogenética e separação espacial parcial. As premissas utilizadas para definir esses cinco padrões básicos estão baseadas em diferenciações genéticas entre populações geradas por eventos vicariantes e isolamento geográfico (Avice, 2000; Martins e Domingues, 2011, Dantas, 2013).

Mais recentemente, tem-se incorporado à filogeografia comparativa conceitos relativos à teoria da coalescência, que descreve basicamente uma probabilidade de alelos recentes encontrarem um ancestral em comum no passado (Felsenstein, 2004). Essa integração foi possível graças ao aumento da capacidade de análises dos computadores (Martins e Domingues, 2011) e possibilitou discriminar de forma estatística eventos históricos capazes de gerar a estrutura geográfica observada nos táxons.

Essas análises têm possibilitado testar modelos de especiação, identificar quebras filogeográficas (Pavan, 2008), testar relações de parentesco entre táxons de áreas diferentes (Bates *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 2000) ou ainda, testar as relações dos táxons dentro dos biomas (Costa *et al.*, 2003; Pellegrino *et al.*, 2005).

Carnaval (2002) detectou diferentes níveis de estruturação genética para quatro espécies de anfíbios que habitam remanescentes de mata em Alagoas e Pernambuco. Essa estruturação foi relacionada à história natural das espécies, sendo que, a espécie *Proceratophrys renalis*, que habita as

regiões mais altas, foi a que apresentou maior estruturação genética em relação às duas espécies encontradas em regiões de borda (*Hypsiboas albomarginatus* e *Scinax nebulosus*). Já a quarta espécie, *Dendropsophus branneri*, considerada generalista por habitar tanto regiões altas quanto as bordas, apresentou a menor estruturação genética.

Pellegrino *et al.* (2005), por sua vez, encontraram uma forte influência do Rio Doce e Jequitinhonha na diversificação de lagartos do complexo *Gymnodactylus darwini*, na Mata Atlântica, que apresentaram filogenias e números diplóides congruentes com essas barreiras.

Lara *et al.* (2005) realizaram um levantamento de hipóteses de diversificação, tanto em casos de alopatria, quanto parapatia e verificaram que na Mata Atlântica as influências agem de maneira distinta em diferentes grupos de mamíferos, sendo que algumas sequer podem ser comprovadas por falta de dados, como é o caso de diversificação por gradiente ecológico.

Martins *et al.* (2007) avaliaram a espécie *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae), cuja distribuição e variações morfológicas são igualmente amplas e, encontraram quatro áreas geográficas bem estruturadas: duas na Mata Atlântica, ao norte e ao sul; no Pantanal e outra na Amazônia, entretanto as relações filogenéticas entre elas permaneceram incertas. Sugeriram ainda, que esse padrão encontrado, inclusive em mamíferos terrestres, poderia ser efeito de processos vicariantes.

Ainda na Mata Atlântica, Cabanne *et al.* (2007) verificaram que para a *Xyphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae), a diversificação por barreira não era congruente com a diversificação da espécie e sugeriram que a principal influência estaria relacionada com isolamento por distância.

Mais recentemente, Amaro *et al.* (2012) detectaram grande estruturação genética para populações de *Proceratophrys boiei* ao norte e ao sul do rio Tietê. E, dentro do clado ao norte do rio Tietê, os autores verificaram a ocorrência de outros dois filogrupos corroborados por diferenças cariotípicas e tempo de divergência compatíveis com a atividade tectônica ocorrida na costa brasileira entre Plioceno e Mioceno.

Estruturação genética elevada relacionada à grande variedade de formas cariotípicas na Mata Atlântica também foram encontradas para a espécie de roedor *Blarinomys breviceps* (Ventura *et al.*, 2012). Neste estudo,

os autores descreveram oito formas cariotípicas distintas distribuídas ao longo de duas linhagens principais, uma ao norte e outra ao sul da Mata Atlântica e evidenciaram que a diversidade dessa espécie está subestimada.

Dessa forma, fica evidente a necessidade de desenvolver estudos filogeográficos, não só na Mata Atlântica, mas também em outros biomas que carecem de tais dados (Lara *et al.*, 2005; Martins e Domingues, 2011).

1.7 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo realizar estudos baseados em sistemática molecular e filogeografia em roedores do gênero *Euryoryzomys*. Para isso, foram utilizados os marcadores moleculares *cyt-b*, *coxI* e *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP), analisados sob três perspectivas, resultando em objetivos específicos da seguinte forma:

— Investigar as relações filogenéticas entre as espécies de roedores do gênero *Euryoryzomys* e inferir padrões de diversificação, utilizando sequências dos genes mitocondriais *cyt-b*, *coxI* e IRBP (Capítulo 2).

— Investigar o potencial das sequências parciais do gene *coxI* na identificação das espécies do gênero *Euryoryzomys*, por meio das estimativas de variabilidade intra e interespecíficas, incluindo a contribuição na identificação de possíveis espécies crípticas (Capítulo 3).

— Investigar a filogeografia da espécie *Euryoryzomys russatus* e descrever sua diversidade genética ao longo da Mata Atlântica (Capítulo 4).

Tabela 1.1 - Gêneros pertencentes à tribo Oryzomyini, número de espécies (Nº) e distribuição geográfica. O número de espécies pode variar de acordo com os autores. Dados de distribuição geográfica e o número de espécies foram extraídos de Musser e Carleton (2005), Weksler *et al.* (2006) e Bonvicino *et al.* (2008).

GÊNERO	Nº	DISTRIBUIÇÃO
<i>Aegialomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	2	Ilhas Galápagos, oeste do Equador e Peru.
<i>Amphinectomys</i> Malygin <i>et al.</i> , 1994	1	Peru.
<i>Cerradomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	6	Caatinga, Cerrado e Chaco brasileiro e leste da Bolívia.
<i>Drymoreomys</i> Percequillo <i>et al.</i> , 2011	1	Estados de São Paulo e Santa Catarina.
<i>Eremoryzomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	1	Norte do Peru.
<i>Euryoryzomys</i> Weksle <i>et al.</i> , 2006	6	América do Sul com limites ao sul até o Brasil, Paraguai e Argentina.
<i>Handleyomys</i> Voss <i>et al.</i> , 2002	2	Colômbia.
<i>Holochilus</i> Brandt, 1835	3	Ao longo da bacia Amazônica (Colômbia, Equador, Peru, Brasil, Venezuela e Guianas) e outras atingem o Uruguai e Argentina.
<i>Hylaeamys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	7	Amazônia, passando por Brasil, Venezuela e Guianas, e ao longo da Mata Atlântica indo até o Paraguai e Argentina.
<i>Lundomys</i> Voss e Carleton, 1993	1?	Centro oeste do Rio Grande do Sul.
<i>Megalomys</i> Trouessart, 1881	2	Ilhas Antilhas.
<i>Melanomys</i> Thomas, 1902	3	Planícies da América Central (de Honduras até o Panamá), Na América do Sul Colômbia, Equador, Venezuela e Peru.
<i>Microryzomys</i> Thomas, 1917	2	Ao longo dos Andes, na Colômbia, Bolívia, Equador e Peru e ao norte da Venezuela.
<i>Mindomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	1	Província Pinchincha, Equador.
<i>Neacomys</i> Thomas 1900	8	Sul da América Central (Panamá), e na América do Sul: Guianas, Suriname, sul da Venezuela, Norte do Brasil (Amazonas e Pará), Peru, Colômbia e Bolívia.
<i>Nectomys</i> Peters, 1861	5	Norte da América do Sul (Venezuela e Guianas), no Brasil ocorre na Amazônia e Mata Atlântica (de Pernambuco até Rio Grande do Sul) até o leste do Paraguai.
<i>Nephelomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	13	Florestas de 900 a 3500 metros acima do nível do mar na Bolívia (Andes), cordilheiras da América Central e Costa Rica e oeste da Venezuela.
<i>Nesoryzomys</i> Heller, 1904	4	Equador (Ilhas Galápagos).

Continuação Tabela 1.1

GÊNERO	Nº	DISTRIBUIÇÃO
<i>Noronhomys</i> Carleton e Olson, 1999	1	Ilha de Fernando de Noronha.
<i>Oecomys</i> Thomas, 1906	16	Desde a América Central (Trinidad e Tobago e Costa Rica) até o Norte da América do Sul (Equador, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guianas, Peru e Bolívia), no Brasil ocorre na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica.
<i>Oligoryzomys</i> Bangs, 1900	22	América do Sul.
<i>Oreoryzomys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	1	Equador e norte do Peru.
<i>Oryzomys</i> Baird, 1858	3?	Américas do norte, central e norte da América do Sul.
<i>Pseudoryzomys</i> Hershkovitz, 1992	1	Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil.
<i>Reigomys</i> Machado <i>et al.</i> , 2013	1	Sul da América do Sul
<i>Scolomys</i> Anthony, 1924	2	Equador, Peru, Colômbia e norte do Brasil (Acre e Amazonas).
<i>Sigmodontomys</i> J. A. Allen, 1897	2	América Central e norte da América do Sul (Equador, Colômbia e Venezuela).
<i>Sooretamys</i> Weksler <i>et al.</i> , 2006	1	Brasil, Argentina e Paraguai, ao longo de florestas tropicais e subtropicais.
<i>Tanyuromys</i> Pine <i>et al.</i> , 2012	1	Costa Rica e Equador.
<i>Zygodontomys</i> J. A. Allen, 1897	2	América Central (Costa Rica e Panamá) e América do Sul (Venezuela, Bolívia, Guianas e norte do Brasil).
Total: 30 gêneros	121	Espécies aproximadamente

Figura 1.1 - Mapa esquemático representando a distribuição do gênero *Euryoryzomys* ao longo dos biomas na América do Sul. Marrom: *Euryoryzomys macconnelli*; verde: *E. nitidus*; amarelo: *E. legatus*; azul: *E. russatus*; rosa: *E. lamia*; vermelho: *E. emmonsae*; e laranja: *Euryoryzomys* sp. Serra de Baturité (SB), Ceará. Extraído e modificado de Weksler, 1996; Silva *et al.*, 2000; e Bonvicino *et al.*, 2008. AM: Amazônia; CE: Cerrado; CA: Caatinga; PT: Pantanal; PA: Pampas; e MA: Mata Atlântica.

Figura 1.2 - Relações filogenéticas obtidas para o gênero *Euryoryzomys*, retiradas de Patton *et al.* (2000) com modificações, utilizando 801 pb do gene *cyt-b* através do método máxima parcimônia (MP). Os números em negrito correspondem ao *bootstrap*, e as porcentagens, aos valores de distância obtidos com o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2p).

Tabela 1. 2 - Espécies registradas até o momento para o gênero *Euryoryzomys*: nome da espécie, holótipo, número diplóide (2n), número fundamental (NF), variação cromossômica (quando houver), distribuição geográfica da espécie e referências disponíveis.

ESPÉCIE	HOLÓTIPO OU LECTÓTIPO	2N, NF E VARIAÇÃO CARIOTÍPICA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	DISTRIBUIÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>E. emmonsae</i>	MZUSP27150, leste do Rio Xingu, Altamira, Pará, Brasil (Musser <i>et al.</i> , 1998).	2n=80 NF=86	Menor espécie do gênero. Comprimento da cauda maior do que o corpo, pelos da cabeça mais escuros que os do corpo.	Leste do Rio Xingu, região de vegetação amazônica.	Musser <i>et al.</i> , 1998; Patton <i>et al.</i> , 2000; Bonvicino <i>et al.</i> , 2008.
<i>E. lamia</i>	Rio Jordão, Araguari, Minas Gerais.	2n=58, 60, 64; NF=84	Maior espécie do gênero. Pelagem do corpo marrom-alaranjado claro, com a cabeça ligeiramente mais clara, parecida com <i>E. macconnelli</i> , porém mais curto.	Florestas estacionais semidecíduas do cerrado brasileiro.	Weksler, 1996; Andrades-Miranda <i>et al.</i> , 2000; Musser e Carleton, 2005; Mattevi e Andrades-Miranda, 2006; Bonvicino <i>et al.</i> , 2008.
<i>E. legatus</i>	Bolívia, Tarija (Thomas, 1925).		Pelagem do dorso é curta e de coloração marrom-amarelada ou alaranjada com limite bem definido entre as laterais e o ventre branco acinzentado.	Leste dos Andes, centro-sul da Argentina e noroeste da Argentina.	Weksler, 1996; Musser e Carleton, 2005.

ESPÉCIE	HOLÓTIPO OU LECTÓTIPO	2N, NF E VARIAÇÃO CARIOTÍPICA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	DISTRIBUIÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>E. macconnelli</i>	Guiana, Demerara, Rio Supinaam.	2n=64 NF=70 (Brasil e Peru); 2n=76 NF=85	Pelagem do dorso é com aspecto marrom-alaranjado da ponta do focinho até a base da cauda. Lateral mais clara e limite bem definido entre o dorso e o ventre branco.	Norte da América do Sul.	Weksler, 1996; Musser <i>et al.</i> , 1998.
<i>E. nitidus</i>	Peru, Amable María, Vale do Tulumayo.	2n=80 NF=86	Pelagem semelhante a <i>E. legatus</i> .	Leste dos Andes no Peru, oeste do Brasil, Bolívia, sudoeste do Paraguai e noroeste da Argentina em áreas de Floresta Amazônica.	Weksler, 1996; Musser e Carleton, 2005.
<i>E. russatus</i>	Brasil, Rio Grande do Sul, Taquara do Novo Mundo, Rio dos Linos.	2n=80 NF=86; inversão pericêntrica em um par acrocêntrico NF=88.	Pelagem do dorso é curta, apresentando coloração marrom-amarelada ou alaranjada indo do final da cabeça até a cauda. Limite bem definido entre laterais e ventre branco acinzentado.	Predominantemente em área de Mata Atlântica; Norte do estado da Paraíba indo até o Sul, ao norte do estado do Rio Grande do Sul.	Weksler, 1996; Musser <i>et al.</i> , 1998; Carleton e Musser, 2005, Teta <i>et al.</i> , 2007.

ESPÉCIE	HOLÓTIPO OU LECTÓTIPO	2N, NF E VARIAÇÃO CARIOTÍPICA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	DISTRIBUIÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>Euryoryzomys</i> sp. SB ¹	Serra do Baturité, Pacoti, Ceará (Brasil).	2n=76 NF=86		Ceará (Serra de Baturité).	Silva <i>et al.</i> , 2000.

¹SB: Serra de Baturité, nome designado para identificar a espécie *Euryoryzomys* sp., encontrada no Ceará e que será utilizada no presente estudo.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.A. New South American Muridae. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 32, n. 1, p. 597-604, 1913.
- ALLEN, J.A. New South American Muridae. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 34, n. 1, p. 625-635, 1915.
- ALMEIDA, E.J.C. Variabilidade citogenética nos gêneros *Oryzomys* e *Thomasomys* (Cricetidae, Rodentia). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.
- AMARO, R. C; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T.; CARNAVAL, A. C. Demographic processes in the montane Atlantic Rainforest: molecular and cytogenetic evidence from endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p. 880-888, 2012.
- ANDRADE-LIMA, D. Present-day forest refuges in northeastern Brazil. In: PRANCE, G.T (ed). **Biological diversification in the tropics**. New York: Columbia University Press, 1982, 714p.
- ANDRADES-MIRANDA, J.; ZANCHIN, N.I.T.; OLIVEIRA, L.F.B.; LANGGUTH, A.R.; MATTEVI, M.S. Cytogenetic studies in nine taxa of the genus *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazil. **Mammalia**, v. 65, n. 4, p. 461-472, 2000.
- AVISE, J. C. **Molecular markers: Natural history and evolution**. London: Chapman e Hall, 1994.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000, 445p.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA between population genetics and systematics. **Annual Review Ecology and Evolution Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-452, 1987.
- BANGS, O. List of mammals collected in the Santa Marta region of Colombia by W. W. Brown Jr. **Proceedings of the New England Zoological Club**, v. 1, n. 1, p. 87-102, 1900.
- BATES, J. M.; HACKETT, S. J. Area relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distribution of passerine birds. **Journal of Biogeography**, v. 25, n. 1, p. 783-793, 1998.

- BLANGA-KANFI, S.; MIRANDA, H.; PENN, O.; PUPKO, T.; DEBRY, R.W.; HUCHON, D. Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 71, 2009.
- BONVICINO, C.R.; MOREIRA, M.A. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 282-292, 2001.
- BONVICINO, C.R.; OTAZU, I.; WEKSLER, M. *Oryzomys lamia* Thomas, 1901 (Rodentia, Cricetidae): from karyotype, geographic distribution and conservation status. **Mammalia**, v. 62, n. 2, p. 253-258, 1998.
- BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, O.S. **Guia dos roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, OPAS/OMS, 2008.
- BONVICINO, C.R.; GONÇALVES, P.R.; OLIVEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L. F. B.; MATTEVI, M.S. Divergence in *Zygodontomys* (Rodentia: Sigmodontinae) and Distribution of Amazonian Savannas. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 3, p. 322-328, 2009.
- BRADLEY, R.D.; BAKER, R.J. A test of genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 960-973, 2001.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. S.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recente demographic expansion in Southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, p. 73-84, 2007.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos da América del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia**, v. 4, n. 2, p. 309-732, 1961.
- CARDOSO, Z.Z. A ligação histórica entre os biomas Amazônia e Mata Atlântica através da Caatinga: brejos de altitude. Monografia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CARLETON, M.D.; MUSSER, G.G. Muroid rodents. In: ANDERSON, S. E JONES, J. K. (eds). **Orders and families of recent mammals of the world**. Nova York: John Wiley, 1984. p. 289-379.
- CARNAVAL, A. C. Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil: A preliminary study. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 1, p. 913-921, 2002.

- CHAVES, P.B.; GRAEFF, V.G.; LION, M.B.; OLIVEIRA, L.R.; EIZIRIK, E. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 18-35, 2012.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest os Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, n. 1, p. 71-86, 2003.
- DANTAS, G. P. M. **Introdução à filogeografia aplicada à conservação biológica de vertebrados Neotropicais**. Curitiba: Editora CRV, 2013, 194 p.
- DESALLE, R. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. **Conservation Biology**, v. 20, n. 5, p. 1545-1547, 2005.
- DESALLE, R.; EGAN, M.G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species, delimitation and DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1, p. 1905–1916, 2005
- D'ELÍA, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. **Cladistics**, v. 19, n.1, p. 307-323, 2003.
- D'ELÍA, G.; PARDIÑAS, U.F.J.; TETA, P.; PATTON, J.L. Definition and diagnosis of new tribe of sigmodontinae rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. **Gayana**, v. 71, n. 2, p. 187-194, 2007.
- ELIAS, M.; HILL, R.I.; WILLMOTT, K.R.; DASMAHAPATRA, K.K.; ANDREW, V.Z.; BROWER, A.V.Z.; MALLET, J.; CHRIS, D.; JIGGINS, C.D. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proceedings of Royal Society B**, v. 274, n. 1, p. 2881–2889, 2007.
- EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.M. **Mammals of the neotropics: the central neotropics**. Chicago: University of Chicago, 1999, 609 p.
- EMMONS, L.E.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals. A field guide**. 2 ed. Chicago: University of Chicago, 1997, 184 p.
- FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**. Sutherland: Sinauer Associates, 2004.
- FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 8, n. 1, p. 727-736, 2008.

- GARDNER, A.L.; PATTON, J.L. Karyotypic variation in Oryzomyini rodents (Cricetidae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetinae complex. **Occasional Pappers of the Lousiana State University Museum of Zoology**, v. 49, n.1, p. 1-48, 1976.
- GEISE, L. Os roedores Sigmodontinae do estado do Rio de Janeiro (Rodentia: Muridae): Sistemática, citogenética, distribuição e variação geográfica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.
- GONÇALVES, P.F.M. O potencial do DNA barcode na identificação de aves neotropicais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GRAUR, D; LI, W. H. **Fundamentals of molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. 481 p.
- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G.A.C.; HEBERT, P.D.N.; HICKEY, D.A. DNA barcoding: how it complements, molecular phylogenetics, and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2007.
- HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; de WAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, n. 1, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcode reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.
- HELLER, E. Mammals of the Galapagos Archipelago, eclusive of the Cetacea. **Proceedings of the California Academy Sciences**. v. 3, n. 3, p. 233-250, 1904.
- HERSHKOVITZ, P. Mammals of northern Colombia, preliminary report no 8: Arboreal rice rats, a systematic revision of the subgenus *Oecomys*, genus *Oryzomys*. **Proceedings of the United States National Museum, Smithsonian Institution**, v. 110, n. 3420, p. 513-568, 1960.
- HOLLINGSWORTH, P.M.; GRAHAM, S.W.; LITTLE, D.P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PLOS One**, v. 6, n. 5, p. 1-13, 2011.
- HOOPER, E.T.; MUSSER, G.G. The glans penis in Neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of Muroid rodents. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan**, v. 123, n. 1, p. 1-56, 1964.

- KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n.1, p. 111-120, 1980.
- MARTINS, F. M., DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 15, n. 1, p. 372-378, 2007.
- MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. **Revista da Biologia**, v. especial, n. 1, p. 26-30, 2011.
- MATTEVI, M. S.; ANDRADES-MIRANDA, J. Estudos genéticos nos roedores da tribo Oryzomyine. In: THALES, R.O.; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A (eds). **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**. 1. ed. São Carlos: Suprema, 2006, 170 p.
- MEYER, C.P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLOS Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2005.
- MIRANDA, G.B. de. Relações Filogenéticas entre roedores sul-americanos da tribo Oryzomyini analisadas pelos genes citocromo-*b* e IRPB. Tese de Doutorado. Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: Introdução e método de máxima parcimônia. In. MATIOLI, S.; FERNANDES, F.M.C (eds). **Biologia Molecular e Evolução**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012, 256 p.
- MONAGHAN, M.T.; BALKE, M.; GREGORY, T.R.; VOGLER, A.P. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1, p. 1925–1933, 2005.
- MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding: promise and pitfalls. **PLOS Biology**, v. 2, n. 1, p. 1529-1531, 2004.
- MÜLLER, L.; GONÇALVES, G. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; MARINHO, J. R.; ALTHOFF, S. L.; TESTONI, A. F.; GONZÁLEZ, E. M.; FREITAS, T. R. DNA barcoding of Sigmodontinae rodents: identifying wildlife reservoirs of zoonoses. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p., 2013.
- MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D. Family Muridae. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993, p. 501-755.

- MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D. Superfamily Muroidea. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (eds). **Mammals species of the world**. 3 ed. The Johns Hopkins University Press, 2005, p. 955-1186.
- MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D.; BROTHERS, E.M.; GARDNER, A.L. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): diagnoses and distributions of species formerly assigned to *Oryzomys capito*. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 236, p. 1-376, 1998.
- NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 5 ed. Baltimore e London: John Hopkins University Press, 1991, 1629 p.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 1, p. 229-238, 1996.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 244, n. 1, p. 1-306, 2000.
- PEGG, G.G.; SINCLAIR, B.; BRISKEY, L.; ASPDEN, W.J. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. **Scientia Marina**, v. 70, n. 1, p. 7-12, 2006.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, T. M.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y. Y.; SITES, J. K. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13-26, 2005.
- PERCEQUILLO, A.R.; WEKSLER, M.; COSTA, L.P. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 1, p. 357-390, 2011.
- PEREIRA, S. Reconstrução filogenética: Inferência Bayesiana. In: MATIOLI, S.; FERNANDES, F.M.C (eds). **Biologia Molecular e Evolução**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012, 256 p.
- PEREIRA, S.; MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. In: MATIOLI, S.; FERNANDES, F.M.C (eds). **Biologia Molecular e Evolução**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012, 256 p.
- PINE, R.H.; TIMM, R.M.; WEKSLER, M. A newly recognized clade of trans-Andean Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. **Journal of Mammalogy**, v. 93, n. 3, p.851-870, 2012.

- RACH, J.; DESSALE, R.; SARKAR, I.N.; SCHIERWATER, B.; HANDRYS, H. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and population in Odonata. **Proceedings of Royal Society B**, v. 275, n. 1, p. 237–247, 2008.
- REIG, O. A. A proposed unified nomenclature for the enamelled components of the molar teeth of the Cricetidae (Rodentia). **Journal of Zoology**, v. 181, n. 1, p.227-241, 1977.
- REIG, O. A. A new fossil genus of South America cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. **Journal of Zoology**, v. 192, n. 1, p. 257-281, 1980.
- REIG, O. A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideossulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, n. 2, p. 333-365. 1984.
- REIG, O. A. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. In: VUILLEUMIER, F; MONASTERIO, M. (eds). **High Altitude Tropical Biogeography**. New York: Oxford University Press, 1986. p. 404-439.
- ROCHA, R.G.; FONSECA, C.; ZHOU, Z.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P. Taxonomic and conservation status of the elusive *Oecomys cleberi* (Rodentia, Sigmodontinae) from central Brazil. **Mammalian Biology**, v. 77, n. 1, p. 414-419, 2012.
- SBALQUEIRO, I.J.; CORDEIRO, C.T.; QUELUZ, G.F.; BORGES, C.; ZOTZ, C.; LOS, M.M.; MATSUMOTO, J.Y. Análises cariotípicas em roedores cricetídeos de duas localidades do Paraná. **Ciência e Tecnologia**, v. 39, p. 735, 1987.
- SILVA, M.J.J.; PERCEQUILLO, A.R.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Cytogenetics with systematic approach on a new *Oryzomys* species of *nitidus* group (Sigmodontinae, Rodentia) from Northeastern Brazil. **Caryologia**, v. 53, n. 3-4, p. 219-226, 2000.
- SMITH, M.F.; PATTON, J.L. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome-*b*. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 6, n. 1, p. 89-128, 1999.
- SMITH, M.A.; FISHER, B.L.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyper diverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophy Transaction R. Society B**, v. 360, n. 1, p. 1825–1834, 2005.
- STEPPAN, S.J. Revision of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae) with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. **Feldiana: Zoology, New Series**, n. 80, p. 1-112, 1995.

- STEWART, J.E.; GOERLICH, W.L. On the value of hair scale patterns as a taxonomic character in Cricetidae. **Paper for Biology Yale University**, v. 36, n. 1, p. 1-18, 1972.
- SUÁREZ-VILLOTA E.; DI-NIZO C.; NEVES C.; SILVA, M.J.J. First cytogenetic information for *Drymoreomys albimaculatus* (Rodentia, Cricetidae), a recently described genus from Brazilian Atlantic Forest. **ZooKeys**, v. 303, n. 0, p. 65-76, 2013.
- THOMAS, O. The Spedan Lewis South American exploration. I. On mammals from southern Bolivia. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 9, n. 25, p. 575-582, 1925.
- TRINCA, C.S.; THOISY, B. de.; ROSAS, F.C.W.; WALDEMARIN, H.F., KOEPFLI, K.P.; VIANA, J.A.; EIZIRIK, E. Phylogeography and demographic history of the neotropical otter (*Lontralongicaudis*). **Journal of Heredity**, v. 113, n. 4, p. 479-492, 2012.
- VAN VELZEN, R.; WEITSCHKE, E.; FELICI, G.; BAKKER, F.T. DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. **PLOS One**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2012.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; BONETT, R. M.; VIEITES D. R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions B**, v. 360, n. 1, p. 1859–1868, 2005.
- VENTURA, K.; SATO-KUWABARA, Y.; FAGUNDES, V.; GEISE, L.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SILVA, M. J. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Phylogeographic structure and karyotypic diversity of the brazilian shrew mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 138, n. 1, p. 19-30, 2012.
- DE VIVO, M.; CARMIGNOTTO, A. P.; GREGORIN, R.; HINGST-ZAHER, E.; IACK-XIMENES, G. E.; MIRETZKI, M.; PERCEQUILLO, A. R.; ROLLO, M. M.; ROSSI, R. V.; TADDEI, V. A. Checklist dos mamíferos do estado de São Paulo. **Biota Neotropical**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2011.
- VORONTZOV, N.N. The system of hamster (Cricetinae) in the sphere of the world fauna and their phylogenetic relations. **Biuletén Moskovskogo Obshtchestvospitateley Prirody, Otdel Biologicheskii**, v. 64, p. 134-137, 1959.
- VORONTZOV, N.N. Evoluitzia pishtchevaritelnoi sistemy gryzunov (mysheobraznye) (Evolution of the alimentary system of myomorph rodents). Novosibirsk: Izdatel'stvo "Nauka" Sib. Otd. Akad. **NaukSSSR**, p. 1-234, 1967.

- VOSS, R.S.; CARLETON, M.D. A new genus for *Hesperomys molitor* Winge and *Holochilus magnus* Hershkovitz (Mammalia, Muridae) with an analysis of its phylogenetic relationships. **American Museum Novitates**, v. 3085, p. 1-39, 1993.
- VOSS, R.S.; LINZEY, A.V. Comparative gross morphology of male accessory glands among Neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with comments on systematic implications. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan**, v. 159, n.1, p. 1-41, 1981.
- WARD, R.D.; HOLMES, B.H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n.1, p. 899-907, 2007.
- WEKSLER, M. Revisão sistemática do grupo de espécies *nitidus* do gênero *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.
- WEKSLER, M. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 331-349, 2003.
- WEKSLER, M.; PERCEQUILLO, A.R.; VOSS, R.S. Ten new genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). **American Museum Novitates**, v. 3537, p. 1-29, 2006.
- YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Genetics**, v. 13, n. 1, p. 303-314, 2012.
- YASSIN, A.; MARCOW, T.A.; NARECHANIA, A.; O'GRADY, P.M. The genus *Drosophila* as a model for testing three and character-based methods of species identification using DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ZANCHIN, N.I.T. Estudos cromossômicos em orizomídeos e equimídeos da Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.

*CAPÍTULO II – SISTEMÁTICA MOLECULAR EM
ROEDORES DO GÊNERO EURYORYZOMYS*

Abstract: *Euryoryzomys* is distributed throughout South America. The genus is composed of seven currently recognized species, although their phylogenetic relationships are still unclear. In this chapter, 215 samples of seven species from 71 localities distributed over six countries were used. Phylogenetic analyses were performed using partial sequences of *cyt-b*, *coxI*, *IRBP*, and distances were calculated for the samples that had only the *cyt-b* sequences. The matrix of 2217 bp was used for Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) analyses and Bayesian Inference (BI). Four monophyletic clades were recovered: clade B, composed of specimens of *E. lamia* (MV=100, IB=99); clade E: *Euryoryzomys* sp. SB. (MV=94, IB = 10); clade F: *E. legatus*, from Argentina (MP=87, MV=94, IB= 99), and clade K= *E. russatus* (MP=51, MV=90, IB = 99). Samples of *E. macconnelli*, *E. nitidus*, and *E. emmonsae* appear subdivided, suggesting the presence of more species than previously described.

Resumo: *Euryoryzomys* é um gênero distribuído por toda a América do Sul, atualmente composto por sete espécies reconhecidas, cujas relações entre elas não estão esclarecidas. No presente capítulo, foram utilizadas 215 amostras das sete espécies provenientes de 71 localidades distribuídas ao longo de seis países. As análises filogenéticas foram realizadas com sequências parciais do *cyt-b*, *coxI*, *IRBP*; as distâncias genéticas foram calculadas para as amostras que possuíam somente sequências do *cyt-b*. Uma matriz de 2217 pb foi utilizada nas análises de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). Quatro clados monofiléticos foram recuperados: clado B, composto por exemplares de *E. lamia* (MV=100, IB=99); clado E: *Euryoryzomys* sp. SB (MV=94, IB=10); clado F: *E. legatus*, formado por exemplares provenientes da Argentina (MP=87, MV=94, IB=99); e clado K composto por *E. russatus* (MP=51, MV=90, IB=99). As amostras de *E. macconnelli*, *E. nitidus* e *E. emmonsae* aparecem subdivididas, sugerindo a ocorrência de, pelo menos, mais duas ou três? espécies do que previamente descrito na literatura.

2. INTRODUÇÃO

Euryoryzomys é um gênero pertencente à família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae, e está distribuído desde os Andes até planícies subtropicais (Eisenberg e Redford, 1999), ocupando vários biomas ao longo da América do Sul.

Atualmente, o gênero possui seis espécies formalmente descritas e uma aguardando descrição: *Euryoryzomys* sp. (SB), procedente da Serra de Baturité, Pacoti, Ceará (Silva *et al.*, 2000). As características morfológicas externas das espécies são semelhantes, o que dificulta a identificação interespecífica (Mattevi e Andrades-Miranda, 2006).

Poucos trabalhos com o intuito de investigar suas relações têm sido desenvolvidos. Patton *et al.* (2000) utilizando cinco espécies do gênero recuperaram dois clados principais, porém as relações entre eles estavam incertas. No mesmo estudo e com base em dados de distâncias genéticas do marcador molecular *cyt-b*, sugeriu-se a ocorrência de mais de uma espécie para *E. macconnelli*, uma vez que essa espécie apresentou elevados valores de distâncias genéticas intraespecíficas.

Marcadores moleculares de DNA têm sido amplamente empregados em análises de sistemática molecular de roedores (D'Elía e Pardiñas, 2004; Avise, 2009) e vertebrados em geral, as quais têm contribuído para a investigação de relações filogenéticas, proporcionando um maior aprofundamento na compreensão dos processos evolutivos, relações de parentesco e na identificação de espécies (Hillis *et al.*, 1996).

Marcadores mitocondriais apresentam taxas evolutivas maiores do que as encontradas em marcadores nucleares, o que pode proporcionar uma maior resolução em diferentes níveis das topologias (Hillis *et al.*, 1996). Entretanto, os marcadores nucleares apresentam, em geral, sinal de saturação menor do que o encontrado em DNA mitocondrial e têm também sido frequentemente empregados em análises filogenéticas de diversos grupos de vertebrados, principalmente mamíferos (Stanhope *et al.*, 1992). Análises concatenadas empregando genes mitocondriais e nucleares têm sido cada vez mais utilizadas devido às diferentes informações que tais marcadores podem proporcionar. O *Interphotoreceptor Retinoid Binding*

Protein (IRBP), por exemplo, é um gene nuclear de cópia única responsável pela codificação de uma glicoproteína encontrada na matriz fotorreceptora da retina e foi primeiramente utilizado em análises de níveis taxonômicos mais elevados, como ordem e, tem sido empregado com sucesso em estudos em níveis taxonômicos supragenéricos (Stanhope *et al.*, 1992; Weksler, 2003).

Filogenias moleculares associadas às informações geográficas possibilitam a identificação de processos de diversificação e permitem que hipóteses sejam levantadas em relação ao padrão de distribuição atual dos táxons e fatores que influenciaram a diversificação ao longo dos biomas, principalmente na região Neotropical (Smith e Patton, 1993; Patton *et al.*, 1994; Moritz *et al.*, 2000; D'Elía e Pardiñas, 2004).

A distribuição de roedores, assim como toda a biota, é afetada por mudanças climáticas e a alteração de habitats acelera o processo de mudança nas populações, pois provocam simultaneamente mudanças em importantes padrões biológicos, simultaneamente (de Vivo, 2008), que, por sua vez, deixam registros nas filogenias.

Euryoryzomys, embora seja um gênero de dimensões continentais, está basicamente distribuído ao longo de dois biomas principais na América do Sul: Amazônia (AM) e Mata Atlântica (MA).

Amazônia e Mata Atlântica são os domínios morfoclimáticos mais diversos encontrados na América do Sul (Ab'Saber, 1977) e estão separadas por uma diagonal seca, formado pelos biomas Caatinga, Cerrado e Chaco. Acredita-se que durante o Pleistoceno, esse corredor possuía regiões de matas de galerias que possibilitaram a conexão desses dois domínios e, conseqüentemente, intercâmbio entre a sua biodiversidade (Behling *et al.*, 2000; Costa, 2003), pois grande parte da fauna e flora presentes no Cerrado podem ser encontradas na Amazônia e Mata Atlântica (de Vivo, 1997).

Outra evidência importante dessa conexão são os brejos de altitude, enclaves de mata presentes em montanhas na região nordeste (Mori, 1989) e que compartilham fauna e registros fósseis semelhantes, encontrados tanto a oeste da AM quanto na MA (de Vivo, 1997).

Patton *et al.* (1997) sugerem que esses biomas estão separados por um longo período devido às elevadas distâncias genéticas encontradas entre clados de roedores e marsupiais, entretanto, precisar os momentos em que essa comunicação ocorreu é uma tarefa difícil, uma vez que são muitos os fatores que influenciaram na dinâmica dos biomas e na diversificação dos variados grupos.

A hipótese de refúgios, por exemplo, amplamente empregada na MA para explicar a maioria dos padrões observados, parece não ser o principal fator que operou na AM (Bush e Oliveira, 2006), tendo em vista que, enquanto a MA se fragmentava nos períodos glaciais ocorridos ao longo do Pleistoceno, a AM apresentava grandes “blocos” de florestas que permitiam a conexão entre si. Por outro lado, fatores como o soerguimento dos Andes, incursões marinhas, surgimento e mudança dos leitos dos rios na AM foram fatores cruciais que interferiram na distribuição e diversificação de sua fauna (Marroig e Cerqueira, 1997; Ribas *et al.*, 2012).

Este capítulo tem como objetivos determinar as relações filogenéticas das espécies de *Euryoryzomys* e inferir seus possíveis padrões de diversificação, por meio das sequências concatenadas dos marcadores *cyt-b*, *coxI* e IRPB.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

Foram utilizadas 215 amostras de fígado e músculo de sete espécies de *Euryoryzomys* pertencentes a 71 localidades distribuídas por seis países, conforme descrito na Tabela 2.1 e Figura 2.1. O grupo-externo é composto por *Drymoreomys albimaculatus*, *Oecomys paricola*, *O. catherinae*, *Hylaeamys megacephalus*, *H. yunganus*, *Oligoryzomys nigripes*.

As amostras de fígado e músculo foram submetidas ao método de extração utilizando *Chelex* (Bio-Rad - código 143-2832), de acordo com Walsh *et al.* (1991) (Apêndice A). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com volume de 15 µl a 25 µl, variando de acordo com o marcador de interesse.

No total, três marcadores foram utilizados: dois mitocondriais, *cyt-b* e *coxI*; e um nuclear: IRBP. Os protocolos e perfis de cada marcador estão descritos nos quadros abaixo:

Quadro 2.1 – Protocolos utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para os fragmentos dos marcadores moleculares *cyt-b*, *coxI* e IRBP.

REAGENTES	CYT-B	COXI	IRBP
H ₂ O _d (Milli-Q)	4,2	11,46	4,2
Tampão	1,5	1,5	1,5
MgCl ₂ 50 mM	0,3	0,6	0,3
dNTP 10 mM	0,24	0,3	0,24
Primer Foward 10µM*	0,48	0,18	0,48
Primer Reverse 10µM*	0,48	0,18	0,48
Platinum Taq DNA Polimerase	0,3	0,18	0,3
Amostra	7,5	0,6	7,5

Quadro 2.2 - Perfis das PCR para os marcadores *cyt-b*, *coxI* e IRBP.

ETAPAS DA PCR	CYT-B	COXI	IRBP
DESNATURAÇÃO INICIAL	94°C/ 5 min	94°C/5 min	94°C/5 min
DESNATURAÇÃO	94°C/30 seg	94°C/30 seg	94°C/30 seg
HIBRIDAÇÃO	48 °C/45seg	48 °C/45 seg	63 °C/ 45 seg
EXTENSÃO	72 °C/45seg	72 °C/45 seg	72 °C/45 seg
Nº DE CICLOS	30	35	30
EXTENSÃO FINAL	72 °C/5 min.	72 °C/5 min	72 °C/5 min

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e purificados com uma solução 0,5 µL ExoI (20U/µL, Ref. EN0581 - Fermentas) e 1 µL SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, 1U/µL, Ref. EN0511- Fermentas).

Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzes (AppliedBiosystems) que utiliza o kit DNA Big-Dye Terminator Cycle-Sequencing Standart (Applied Biosystems) e sequenciadas

2.1.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DISTÂNCIAS GENÉTICAS

As sequências de boa qualidade foram submetidas a uma pesquisa comparativa de similaridade no *GenBank*, utilizando a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) para verificar a ocorrência de contaminação e se os fragmentos correspondiam ao fragmento do gene de interesse.

Posteriormente, as sequências foram visualizadas e manualmente editadas. Os sítios heterozigotos encontrados para as sequências do IRBP foram codificados de acordo com o código IUPAC.

Uma matriz² foi montada com as sequências de *cyt-b*, *coxI*, IRBP concatenadas no programa Sequence Matrix 1.7.8 (Vaidya *et al.*, 2010). A matriz foi submetida ao alinhamento utilizando o algoritmo MUSCLE (CodonCode Aligner v.3.7). Ao final do procedimento, o alinhamento foi visualmente inspecionado e sua composição final foi de 2217 pares de bases (pb). As sequências indisponíveis na análise concatenada foram tratadas como dados ausentes.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos de Máxima Parcimônia (MP) no programa TNT (Goloboff *et al.*, 2003), Máxima Verossimilhança (MV) no programa Treefinder (Jobb, 2004) e Inferência Bayesiana (IB) no programa MrBayes 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003).

² Foram realizadas análises com os marcadores separados e concatenados. Para o presente estudo, são mostrados e discutidos somente os dados correspondentes às análises concatenadas, em decorrência da ausência de sequências de todos os marcadores para todas as amostras.

A árvore de MP foi obtida por meio de uma busca heurística com adição randômica de sequências e o rearranjo de ramos bipartição e reconexão (TBR – *Treebisection and reconnection*); os valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foram calculados a partir de 1.000 pseudo-réplicas. E foram apresentados somente os valores acima de 50%.

O particionamento por gene foi realizado de acordo com os valores de AICc obtidos. Em MV, os modelos evolutivos foram calculados no programa Treefinder e os mais adequados aos dados foram o J2+G, TN+G e HKY+G. Somente os suportes acima de 70% foram considerados para a análise de MV.

Para IB foram realizadas duas corridas simultâneas com quatro cadeias de Markov cada uma. Para o *burnin*, foi considerado um corte de 25% das gerações iniciais e somente os valores de suporte acima de 95% foram considerados.

As distâncias genéticas foram obtidas no MEGA 5.0 e foram calculadas somente para as amostras com *cyt-b* com a informação do modelo corrigido J2+G.

Adicionalmente, os dados citogenéticos que aparecem na Figura 2.2 foram obtidos por membros do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan.

Tabela 2.1 - Amostras de *Euryoryzomys* utilizadas nas análises. Espécie; Nº de campo, 1 – retiradas do *GenBank*; 2 - cedidas por James L. Patton; 3 - Retirados de Muller *et al.*, 2013; Procedência; País; Latitude e Longitude; fragmentos sequenciados (A-cyt-b, B-coxI e C-IRBP).

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. emmonsae</i>	LPC504 ²	Reserva Ecológica Cristalino, Alta Floresta, MT	27	Brasil	-9,59	-55,93	X		
	LPC507 ²						X		
	LPC530 ²						X		
	M968591	Claudia, MT	28	Brasil	-11,52	-54,88	X	X	
	M968595						X	X	
	M97000						X	X	
	M97007						X	X	
	M97011						X	X	
	M97014						X	X	
	M97018						X	X	X
	M97120						X	X	X
	M97157						X	X	
	LHE536 ²	Oeste do Rio Xingu, 52 km SSW Altamira, PA	29	Brasil	-3.65	-52.36	X		
	LHE559 ²						X		
	CS37 ²	Floresta Nacional Tapirapé-Aquiri, Marabá, PA	31	Brasil	-5.8	-50.5	X		
	CJ9 ²	Fazenda São Luís, Paraupabas, PA	32	Brasil	-6.37	-49.99	X		
	APC000277	Vila Rica, MT	33	Brasil	-10	-51,1	X	X	
	APC000312						X	X	
	APC000316						X	X	
	APC000318						X	X	
	APC000328						X	X	
	CRB968	Fazenda Fiandeira, Cavalcante, GO	35	Brasil	-13,78	-47,45	X		
	CRB983	Chapada dos Veadeiros, GO	36	Brasil	-14,48	-47	X		
<i>E. legatus</i>	JPJ1542	Campo Largo Campo Largo	20	Argentina	-22,03	-63,93	X	X	X

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E.legatus</i>	JPJ1831	Finca Río Seco, 40 km al N de Embarcación	21	Argentina	-22,85	-64,08	X	X	
	JPJ2050	Planta Caimancito, Bateria, Jujuy	22	Argentina	-23,64	-64,6	X	X	X
	JPJ1109	Finca El Piquete, Jujuy	23	Argentina	-24,19	-64,56	X	X	X
<i>E.macconnelli</i>	RSV1271 ²	San Ignacio de Yurani, Bolívar	1	Venezuela	5,03	-61,1	X		
	TK11324 ²	1.5 km W Rudi, Kappel Vliegfeld, Brokopondo	2	Suriname	3,78	-56,16	X		
	¹ ROM:MAM120668/ JQ601259	Sipaliwini River Camp Suriname	3	Suriname	2,29	-56,607		X	
	¹ ROM:MAM120687/ JQ601275							X	
	¹ ROM:MAM120688/ JQ601276							X	
	¹ ROM:MAM120671/ JQ601262							X	
	¹ ROM:MAM120658/ JQ601249							X	
	¹ ROM:MAM120620/ JQ601215							X	
	¹ ROM:MAM120526/ JQ601148							X	
	¹ ROM:MAM120559/ JQ601173							X	
	¹ ROM:MAM120669/ JQ601260							X	
	¹ ROM:MAM120670/ JQ601261							X	
	¹ ROM:MAM120675/ JQ601266							X	
	¹ ROM:MAM120386/ JQ601274							X	
	LLW447 ²	Tangoshiari, Cusco	4	Peru	-1,17	-73,34	X		
	LLW462 ²						X		
	LHE1462 ²						X		

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. macconnelli</i>	JLP16727 ²	Macaco (esquerdo) Rio Jaú, AM	5	Brasil	-2,08	-62,12	X		
	MNFS2078 ²						X		
	PDBFF82 ²	Manaus, AM (6)	6		-2,4	-59,86	X		
	JUR355 ²	Colocação Vira-Volta Rio Juruá, AM	7	Brasil	-3,28	-66,23	X		
	JUR386 ²						X		
	MV970049 ²	San Pedro, lado direito do Río Blanco, Loreto	8	Peru	-4,33	-73,19	X		
	RSV2025 ²	Nuevo San Juan, Río Gálvez, Loreto	9	Peru	-5,25	-73,16	X		
	RSV2030 ²						X		
	RSV2032 ²						X		
	RSV2084 ²						X		
	MNFS85 ²	alto Rio Urucu, AM	10	Brasil	-4,85	-65,26	X		
	MNFS156 ²						X		
	MNFS94 ²	Barro Vermelho (esquerda) Rio Juruá, AM	11	Brasil	-6,46	-68,76	X		
	MNFS747 ²						X		
	JLP15563 ²	Seringal Condor, Rio Juruá, AM	12	Brasil	-6,75	-70,85	X		
	MNFS529 ²						X		
	MNFS530 ²						X		
	PEU960004	Arupuanã, MT	24	Brasil	-10,16	-59,15	X	X	
	M000146	Juruena, MT	25	Brasil	-10,32	-58,35	X	X	X
	M000147						X	X	
	APC000152						X	X	X
	APC000174						X	X	
	APC000181						X	X	X
	APC000182						X	X	X
	CS32 ²	Floresta Nacional Tapirapé-Aquiri, Marabá, PA	30	Brasil	-5,80	-50,51	X		

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. nitidus</i>	MNFS1419 ²	Igarapé-Porongaba, lado direito do Rio Juruá, AC	13	Brasil	-8,66	-72,78	X		
	MNFS1420 ²						X		
	NK14136 ²	Palmira, Pando	14	Bolívia	-1,17	-67,0	X		
	NK14137 ²						X		
	CR97 ²	Reserva Cusco Amazónico,Cusco	15	Peru	-1,55	-69,05	X		
	RMW498 ²						X		
	NK13378 ²	45 km ao Norte de Yacuma, Beni	16	Bolívia	-1,47	-67,0	X		
	NK13342 ²						X		
	NK25602 ²	La Reserva, La Paz	17	Bolívia	-1,57	-67,51	X		
	NK21165 ²	Las Cruces, Santa Cruz	18	Bolívia	-1,77	-63,33	X		
	NK21210 ²						X		
	NK22795 ²	Estância Cuevaas, Santa Cruz	19	Bolívia	-1,81	-63,73	X		
	APC000153	Juruena, MT	25	Brasil	-10,32	-58,35	X	X	
	APC000168						X	X	X
	968409	Apiacás, MT	26	Brasil	-9,53	-57,45	X	X	X
	968432						X	X	X
<i>E. russatus</i>	CIT414						X	X	
	M968409						X	X	
	M97008	Claudia, MT	28	Brasil	-11,52	-54,88	X	X	
	AL3466	Fazenda Aldeia, Valença, BA	37	Brasil	-13,36	-39,08	X		
	ST231	Serra do Teimoso, Jussari, BA	38	Brasil	-15,2	-39,53	X	X	X
	RM57 ²	Fazenda Jueirana, Una, BA	39	Brasil	-15,20	-39,16	X		
	RM58 ²						X		
	RM84 ²						X		

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. russatus</i>	LC27 ²	Fazenda Santa Terezinha, 33 km Linhares, ES	40	Brasil	-19,13	-39,95	X		
	LC30 ²						X		
	LC31 ²								
	UFPB372	Monte Verde, ES	41	Brasil	-19,88	-41,95	X		
	ML94 ²	PED Santa Maria Madalena, RJ	42	Brasil	-21,95	-42,01	X		
	EDH40 ²						X		
	EDH42 ²						X		
	ML95 ²						X		
	LG101 ²	Centro de Primatologia, Magé, RJ	43	Brasil	-22,58	-42,83	X		
	ORG41 ²	Garrafão, Magé, RJ	44	Brasil	-22	-43	X		
	ORG67 ²	Guapimirim, RJ	45	Brasil	-22	-43	X		
	EBB3 ²	Vila Dois Rios, Angra dos Reis, RJ	46	Brasil			X		
	LP32 ²						X		
	LG153 ²						X		
	AC 191	Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, SP	47	Brasil	-23.36	-44.83	X	X	X
	AC 194						X	X	
	AC 206						X	X	
	NSV1	PESM, Santa Virgínia, SP	48	Brasil	-23,26	-45,14	X		
	NSV16						X		
	VGB1/ ROD 05						X	X	X
	ROD 12						X	X	
	RUSVGB5/ ROD 30						X	X	X
	RUSSVF18/ ROD 40						X	X	X

Continuação
Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. russatus</i>	ROD 104						X	X	X
	ROD105						X	X	X
	ROD 106						X	X	X
	ROD 107						X	X	X
	ROD 108						X	X	X
	ML48 ²	Fazenda da Toca, São Sebastião, SP	49	Brasil	-23,83	-45,30	X		
	MAM61 ²						X		
	MAM62 ²						X		
	MAM105 ²	Estação Biológica de Boracéia, Biritiba-Mirim, SP	50	Brasil	-23,65	-45,9	X		
	MAM458 ²						X		
	UNIBAN2022	Biritiba-Mirim, SP	51	Brasil	-23,58	-46,03	X	X	X
	CIT1755						X		X
	M224	Bertioga, SP	52	Brasil	-23,85	-46,15	X	X	X
	ROD139	São Paulo, SP	54	Brasil	-23,46	-46,63	X	X	X
	ITM0008	São Bernardo do Campo, SP	55	Brasil	-23,7	-46,55	X	X	X
	ITM0011						X	X	X
	ITM0016						X	X	X
	ITM0019						X	X	X
	ITM0034						X	X	X
	ITM0073						X	X	X
	ITM0089						X	X	X
	ITM0090						X	X	
	ITM0154						X	X	X
	BS499	Caucaia do Alto, SP	56	Brasil	-23,68	-47,03	X	X	X
	IT-M0357	Juquitiba, SP	57	Brasil	-23,92	-47,07	X	X	X

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. russatus</i>	IT-M0360	Juquitiba, SP	57	Brasil	-23,92	-47,07	X	X	X
	IT-M0359						X	X	X
	M08	Piedade, SP	58	Brasil	-23,71	-47	X	X	X
	ITM0256						X	X	
	CRS 082	Pilar do Sul, SP	59	Brasil	-23.81	-47.7	X	X	X
	CRS 151						X	X	X
	CRS 179						X	X	X
	ROD198	Parque Estadual Carlos Botelho, Sete Barras, SP	60	Brasil	-23,13	-47,94	X	X	
	ROD261						X	X	X
	ROD262						X	X	X
	ROD263						X	X	
	ROD279						X	X	
	CIT9	Fazenda Intervalas, Sete Barras, SP	61	Brasil	-24.22	-48.08	X	X	X
	G 034						X	X	X
	CIT77						X	X	X
	CIT78						X		X
	CIT126						X		X
	CIT128						X		X
	MAM3						X		
	MAM9						X		
	MAM12						X		
	RUSIC008/ ROD 129	Ilha do Cardoso, SP	62	Brasil	-25,14	-48,01	X	X	
	ROD130						X		X
	ROD132							X	
	RUSIC015/ ROD 133						X		X

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. russatus</i>	RUSIC014/ ROD 134	Ilha do Cardoso, SP	62	Brasil	-25,14	-48,01	X	X	X
	ROD146		62				X	X	X
	ROD147						X	X	X
	ROD148						X	X	
	ROD149						X	X	
	ROD151						X	X	X
	ROD159						X	X	X
	ROD306						X	X	
	ROD307						X	X	
	II-M156	Ortigueira, PR	63				X	X	X
	II-M076						X	X	X
	II-M130						X	X	X
	II-M131						X	X	
	II-M134						X	X	X
	II-M137						X	X	
	II-M138						X	X	
	II-M142						X	X	X
	II-M161						X	X	X
	IIM336	Wenceslau Brás, PR	64	Brasil	-23,85	-49,80	X	X	X
	IIM300						X	X	X
	IIM303						X	X	X
	IIM298						X	X	X
	YL228 ²	Itapoá, SC	65		-26,11	-48,61	X		
	YL229 ²						X		
	³ 9409/ GU938955	Blumenal, SC	66	Brasil	-26,91	-49,06		X	

Continuação Tabela 2.1

ESPÉCIE	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE	A	B	C
<i>E. russatus</i>	³ FURP9773/ GU938958	Blumenal, SC	66	Brasil	-26,91	-49,06		X	
	³ 9695/ GU938960							X	
	³ 9954/ GU938947							X	
	³ 9994/ GU938950							X	
	MN37798	Florianópolis, SC (67)	67	Brasil	-27,55	-48,56	X		
	MN37802	Tainhas, RS (68)	68	Brasil	-29,26	-50,30	X		
	MN37803						X		
	³ JR194/ GU938959	Terra de Areia, RS	69	Brasil	-29,59	-50,12		X	
	³ JR205/ GU938954							X	
	³ JR208/ GU938957							X	
	³ JR281/ GU938956							X	
	³ JR297/ GU938896							X	
	³ JR298/ GU938897							X	
	³ JR299/ GU938995							X	
	LF484	Sapiranga, RS	70	Brasil	-29,63	-51	X		
	MN37799						X		
	MN37810	Osório, RS	71	Brasil	-29,90	-50,26	X		
	MN37808						X		
<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	MTR015	Serra do Baturité, Pacoti, CE	34	Brasil	-4,21	-38,91	X	X	X
	MTR027						X	X	X
	MTR046						X	X	X
	MTR048						X	X	
	MTR130						X	X	X
Total	215 amostras	71 localidades		6 países

Figura 2.1 - Mapa parcial da América do Sul com a distribuição dos 71 pontos amostrados. As localidades correspondentes aos pontos encontram-se na se na Tabela 2.1.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 FILOGENIA

As topologias obtidas por MP, MV, IB foram semelhantes, somente a melhor topologia, concatenada e obtida através de particionamento por gene está apresentada na Figura 2.2.

As sete espécies atualmente reconhecidas (seis espécies formalmente descritas e uma aguardando descrição) foram destacadas na topologia, que recuperou o gênero *Euryoryzomys* como monofilético com os seguintes suportes: MP=100; MV=99; IB= 100. A distribuição geográfica dos clados está representada na Figura 2.3.

O exemplar APC000181, identificado inicialmente como *E. macconnelli* e proveniente de Juruena, MT, foi recuperado no grupo-externo.

Foram obtidos quatro clados monofiléticos representados pelo clado B, composto por dois exemplares de *E. lamia*, que apresentaram suporte significativo para MV e IB (100 e 99, respectivamente); clado E: *Euryoryzomys* sp. SB, cujos suportes também foram significativos para MV e IB (94 e 100, respectivamente); clado F: *E. legatus*, formado exclusivamente por exemplares provenientes da Argentina, com suportes MP=87, MV=94 e IB=99; e clado K composto apenas por exemplares de *E. russatus* (MP=51, MV=90 e IB=99).

As amostras de *E. macconnelli*, *E. nitidus* e *E. emmonsae* aparecem subdivididas.

E. macconnelli foi recuperada como parafilética, dividida nos clados A e C e com um exemplar, APC000182, proveniente de Juruena, MT, recuperado em um clado composto somente por exemplares de *E. nitidus* (clado G). O clado A é composto por amostras do Peru, Venezuela e Suriname, e no Brasil por amostras do Amazonas e Pará e aparece como o clado irmão dos demais *Euryoryzomys* (Figura 2.2). Além disso, aparece subdividido em três subclados bem definidos ao longo de sua distribuição geográfica, no sentido leste para oeste (Figura 2.4).

O clado C, formado por duas amostras provenientes do Suriname, cujas informações são provenientes do *GenBank*, aparece como grupo-

irmão de *E. lamia*. Entretanto, essas amostras possuem somente sequências de um marcador molecular (*cox1*) e não apresentaram suporte significativo.

E. nitidus apareceu como espécie parafilética e os exemplares foram recuperados em três clados bem suportados, conforme descrito a seguir: clado D (MP=84; MV=98; IB=97) composto por amostras provenientes do Peru, Bolívia e Acre, próximos a localidade-tipo de *E. nitidus* (Amable María, Junín, Peru); clado G (MP=82, MV=97; IB=99): composto somente por amostras da Bolívia e uma amostra de *E. macconnelli* (APC000181) mencionada no parágrafo anterior; clado H (MP=99; MV=100; IB=100): representado somente pelos exemplares coletados no Brasil (Figura 2.5). Não houve sobreposição nos pontos amostrados desses três subclados de *E. nitidus*.

As amostras de *E. emmonsae* apareceram divididas em dois subclados que apareceram como clados irmãos (MV= 96, IB= 99) e com suportes elevados: clado I com MV=99, IB=100 e clado J com MP=53, MV=100, IB=99 (Figuras 2.2 e 2.6). O holótipo (LHE536), proveniente de Altamira, PA, aparece no clado J, junto com exemplares coletados em outras localidades do Pará e Mato Grosso. Por outro lado, o clado I apresenta somente exemplares coletados em Cláudia e Alta Floresta, MT, não havendo sobreposição de localidades para esses dois clados de *E. emmonsae*.

O clado composto pelas amostras de *E. emmonsae* (distribuídos ao longo do bioma amazônico) apareceram como clado irmão de *E. russatus*, espécie endêmica de MA, sendo essa a única relação interna com suporte significativo para MV e IB (MV= 90, IB= 99).

Euryoryzomys sp. SB aparece no clado E (MV=94 e IB=100) como espécie-irmã do clado composto por *E. legatus* e *E. nitidus*.

2.2.2 DISTÂNCIAS GENÉTICAS

As distâncias genéticas foram calculadas para cada um dos onze clados encontrados e estão representadas abaixo dos ramos na Figura 2.2. A maioria dos clados apresentaram distâncias internas menores do que 2%. Entre *E. lamia* (clado B), *Euryoryzomys* sp. SB e *E. legatus* (clado F) não apresentaram variação intra-específica. *E. russatus* (clado K) apresentou 1,7% de distância genética.

Os dois clados encontrados para *E. emmonsae* apresentaram distâncias genéticas internas baixas (0,5% para o clado J e 0,8% para o clado I), entretando, quando comparados entre si, apresentaram distância de 12,3%, sendo essa a maior distância encontrada entre clado irmãos nessa análise.

E. macconnelli (clado A) foi o segundo clado com distâncias genéticas elevadas, apresentando 7,6%.

Figura 2.2 - Topologia obtida pelo programa Treefinder com três marcadores moleculares concatenados (cyt-b, coxI e IRBP). Os suportes obtidos para as análises de MP, MV e IB estão acima dos ramos, respectivamente. Abaixo estão os valores de distâncias genéticas obtidas pelo programa MEGA 5.0. As letras maiúsculas representam os clados obtidos. A primeira barra vertical (à esquerda) representa os números diplóide (2n) e fundamental (NF) descritos para a espécie (quando disponíveis), e a segunda barra vertical (à direita) representa o bioma em que espécie ocorre. A seta vermelha indica o suporte para o gênero.

Figura 2.3 - Distribuição geográfica dos clados obtidos na Figura 2.2. Clado A: *Euryoryzomys. macconnelli*; Clado B: *E. lamia*; Clado D, G, H: *E. nitidus*; Clado F: *E. legatus*; Clado I e J: *E. emmonsae*; Clado E: *Euryoryzomys* sp. SB; e Clado K: *E. russatus*.

Figura 2.4 - Distribuição dos subclados obtidos para *E. macconnelli* (clado A). Os números referem-se às localidades descritas na Tabela 2.1.

Figura **2.5** - Mapa parcial da América do Sul mostrando a região centro-oeste do Brasil, Peru e Bolívia e Argentina, destacando os clados F, G, H e D, referentes às amostras de *E. nitidus*, cujas localidades (representadas pelos números) estão apresentadas na Tabela 2.1.

Figura 2.6 - Mapa parcial do Brasil representando a região norte do Pará, destacando os clados I e J, referentes às amostras de *E. emmonsae*, cujas localidades (representadas pelos números) estão apresentadas na Tabela 2.1. As duas linhagens estão separadas, principalmente, pelo Rio Xingu, PA (barra azul).

2.3 DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a hipótese filogenética mais abrangente para o gênero *Euryoryzomys* baseada em dados moleculares, pois inclui todas as espécies atualmente reconhecidas para o grupo.

A espécie *E. macconnelli*, recuperada como irmã das demais espécies do gênero, corrobora o que já havia sido evidenciado por filogenias baseadas em informações de morfologia externa (Weksler, 1996; Patton *et al.*, 2000). Entretanto, as demais relações não foram encontradas.

Weksler (1996) demonstrou que existe uma hierarquia entre as espécies do grupo e que esta estaria bem delimitada por caracteres morfológicos da seguinte maneira: (*E. macconnelli* (³*E. intermedius* (*E. legatus* (*E. nitidus* (*E. lamia*; ⁴*Euryoryzomys* sp. n))))).

A incongruência observada quando comparadas às informações obtidas no presente trabalho, provavelmente decorrem da natureza dos dados e das metodologias de análises.

Disparidades entre arranjos moleculares e morfológicos não são exclusividades de grupos de pequenos mamíferos não-voadores, sendo comuns em outros táxons, como anuros, répteis e anfíbios (Machado *et al.*, 2014). No entanto, são consideravelmente importantes, dada a plasticidade ecológica que esses animais podem assumir nos diversos ambientes que ocupam em decorrência do tipo de seleção a que estão submetidos, o que poderia ocasionar mudanças morfológicas e o surgimento de espécies crípticas (Bickford *et al.*, 2007; de Vivo, 2008).

Os três subclados obtidos dentro de *E. macconnelli* (clado A), associados a elevadas distâncias genéticas, sugerem uma diversificação condizente com a hipótese de lagos amazônicos, pois estão divididos em áreas semelhantes àsquelas estimadas por Marroig e Cerqueira (1997). Um subclado é composto por exemplares de regiões ao norte da Amazônia,

³ *Oryzomys intermedius* foi sinonimizado a *E. russatus* (Tabela 1.2).

⁴ *Euryoryzomys* sp. n. coletado na Serra Grande de Ibiapaba, Ceará, descrito por Weksler (1996). Não se sabe se há relação com *Euryoryzomys* sp. SB analisado no presente estudo.

outro por amostras provenientes principalmente do Peru e próximas ao Rio Juruá, e o terceiro subclado, composto por amostras do Mato Grosso e outras localidades próximas ao Rio Juruá, mas que não se sobrepõem entre os clados.

É possível que as amostras APC000181 e APC000182 não pertençam ao gênero *Euryoryzomys*, pois a primeira foi recuperada no grupo-externo, fato que tem sido constantemente observado, principalmente quando as análises são baseadas apenas em dados de marcadores mitocondriais (dado não mostrado). No caso de APC000182, recuperada dentro de um clado composto por exemplares de *E. nitidus* (clado G), pode se tratar de um viés da análise devido a presença da sequência de IRBP somente para esse exemplar. Esses animais não foram revistos sob o ponto de vista morfológico, mas apresentam $2n=64$ (dados obtidos pelos membros do Laboratório de Ecologia e Evolução). Diferem, portanto, dos números diploides encontrados para *E. nitidus* ($2n=80$).

E. russatus e *E. emmonsae* foram recuperadas como espécies-irmãs corroborando a teoria de que exemplares encontrados na Amazônia (*E. emmonsae*) podem apresentar um clado irmão na Mata Atlântica (*E. russatus*). Essa estrutura já foi observada em outros gêneros de roedores, por exemplo, *Hylaeamys*, marsupiais do gênero *Marmosa* (Costa, 2003) e morcegos do gênero *Desmodus* (Martins *et al.*, 2007). Uma hipótese para essa separação de grupos irmãos aparecendo em diferentes biomas, seria a fragmentação das florestas e consequente formação de áreas abertas durante os períodos glaciais (Behling e Lichte, 1997; Wüster *et al.*, 2005). Nesse caso, seria a expansão e retração do Cerrado, separando MA da AM.

E. russatus (clado K), com ampla distribuição na MA (explorado sob aspectos filogeográficos no capítulo 4), apareceu dividido em dois clados principais: o primeiro está restrito às amostras que abrangem desde o estado da Bahia até São Paulo e o segundo, de São Paulo até o estado do Rio Grande do Sul. Embora possua ampla distribuição, as distâncias genéticas encontradas entre esses subclados são baixas quando comparadas a outros subclados do mesmo gênero, além disso, o $2n=80$ e $NF=86$ permanecem constantes ao longo de sua distribuição.

A divisão encontrada no clado de *E. emmonsae* reforça observações anteriores de que a oeste do rio Xingu é provável a ocorrência de uma espécie críptica e irmã de *E. emmonsae* (Costa *et al.*, 2003). Weksler (1996), ao analisar caracteres morfológicos, sugeriu que mais estudos deveriam ser realizados nessa área ocidental da Amazônia, pois havia analisado um indivíduo, inicialmente identificado como *E. nitidus*, mas que diferia em muitos caracteres e estava muito distante da área de distribuição de *E. nitidus*. Posteriormente, Costa *et al.* (2003), também relataram a presença de espécimes semelhantes a *E. emmonsae*, em região semelhante à proposta por Weksler (1996), embora o complemento cromossômico ($2n=80$, $NF=86$) seja o mesmo para os clado I e J.

É provável que esses clados sejam resultantes da dinâmica de formação dos rios na região amazônica, sendo este o principal fator para especiação na região. Nessa perspectiva, pode-se aventar que *E. emmonsae* teria sofrido um evento vicariante, no qual uma barreira, nesse caso o rio Xingu, facilitaria a especiação alopátrica dessas duas linhagens, mas não em tempo suficiente para que o $2n$ sofresse alterações observáveis ao nível cromossômico. O padrão de especiação leste-oeste na Amazônia, já foi apontado na literatura para outros grupos de animais, como por exemplo, lagartos (Kronauer *et al.*, 2005; Gamble *et al.*, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011).

Sendo assim, *E. emmonsae* do clado J poderia ser apontada como uma espécie diferente da encontrada no clado I. Dessa forma, *E. emmonsae* do clado J poderia ser designada *Euryoryzomys* sp. 1 indicando a necessidade de que uma revisão taxonômica acurada seja realizada posteriormente.

Eventos vicariantes são frequentemente utilizados para explicar a grande diversidade encontrada na Amazônia e, na maioria dos casos, os táxons encontrados ocupam margens opostas dos rios e o nível de diferenciação genética entre eles tende a se elevar conforme as distâncias entre as margens aumentam (Ayres e Clutton-Brock, 1992). Entretanto, as conclusões sobre a importância dos rios na diversificação da Amazônia são variadas (Lougheed *et al.*, 1999), de modo que alguns autores concordam que a dinâmica dos rios amazônicos foi crucial para a diversificação das

espécies na região (Caparella, 1992; Peres *et al.*, 1996), enquanto outros acreditam que eventos orogênicos foram mais significativos para alguns grupos de animais (Gascon *et al.*, 2000). Patton *et al.* (2000), por exemplo, apontam que haveria mais diferenças entre roedores distribuídos a montante e jusante do rio Juruá do que entre as suas margens opostas.

E. nitidus representou uma amostragem bastante controversa no presente estudo. A parafilia, encontrada entre os exemplares, aponta para a hipótese de espécies crípticas, ou seja, os três clados recuperados são diferentes entre si, o que é evidenciado com os suportes elevados e as distâncias genéticas obtidas, além da maneira como estão relacionados na topologia da árvore.

Uma crítica a esses arranjos seria o fato de os exemplares do clado D e G apresentarem somente sequências de *cyt-b*, enquanto que as amostras do clado H, coletadas no Brasil, apresentam sequências dos demais marcadores, o que de certa forma enviesaria a análise e faria com que essas amostras tendessem a serem recuperadas juntas. Entretanto, outros fatores devem ser considerados. As distâncias genéticas obtidas foram realizadas com base no *cyt-b* e todas as amostras de *E. nitidus* apresentam esse fragmento na matriz.

Embora tenha sido inicialmente identificado como *E. nitidus* e recuperado com alto suporte, apresentado-se como monofilético, o clado G, composto por exemplares de Santa Cruz e La Paz, pode ser uma linhagem de *E. legatus*, que ocupa uma área mais ao norte do que descrito na literatura, pois, além de apresentarem distâncias genéticas baixas entre si, os exemplares proveniente de La Paz, Bolívia e Santa Cruz, são os mesmos utilizados por Patton *et al.* (2000) [ver Figura 1.2], os quais foram recuperados como pertencentes ao clado de *E. legatus*.

Sendo assim, G e F poderiam ser consideradas linhagens diferentes da mesma espécie (*E. legatus*), o que a tornaria clado irmão do *E. nitidus* (clado H), do Brasil, que, por sua vez, apresenta distância de 4,3% em relação ao *E. nitidus* do clado D. Outros trabalhos envolvendo a espécie realizaram amostragens em diversas áreas de coleta e corroboram *E. nitidus* como uma espécie restrita à sudoeste da América do Sul e pouco invade a região central do continente, sendo raríssimas as coletas na

regiões centro-oeste do Brasil (Musser *et al.*, 1998). As amostras encontradas no Brasil (Mato Grosso) aparecem relacionadas a *E. legatus* e apresentam $2n=80$ e $NF=86$, igual a *E. nitidus* no Peru.

Apesar da descontinuidade da distribuição geográfica associada à estrutura encontrada na topologia, bem como as distâncias genéticas, é provável que os exemplares encontrados no Brasil (clado H), não pertençam à mesma espécie dos exemplares encontrados no clado D, apesar do mesmo $2n$ e NF , de modo que os espécimes do clado D têm prioridade pelo nome, pois o lectótipo de *E. nitidus* foi localizado em Junín; Peru, e os exemplares do Brasil necessitam de uma avaliação taxonômica e serão, neste trabalho, provisoriamente indicados como *Euryoryzomys* sp. 2.

O clado B, composto *E. lamia*, apareceu mais relacionado a espécies que habitam o bioma amazônico. Weksler (1996) já havia evidenciado que embora *E. lamia* estivesse mais próxima geograficamente de *E. russatus*, estaria na verdade mais próxima filogeneticamente de *E. nitidus* e *E. legatus* e seria espécie irmã de *Euryoryzomys* sp. da Serra de Ibiapaba.

Essa diversificação pode ter ocorrido em épocas mais áridas, a partir da qual há evidências de que o Cerrado teria se estendido até áreas mais ao norte da América do Sul (Haffer, 1969) sendo possível que espécies do Cerrado possam ser mais relacionadas àquelas do bioma amazônico. Este padrão já foi observado inclusive em outros grupos, tais como anfíbios (Maciel *et al.*, 2010) e répteis (Vargas-Ramirez *et al.*, 2010).

Entretanto, *E. lamia* é uma espécie pouco amostrada em boa parte das coleções mastozoológicas, o que dificulta uma melhor compreensão sobre o seu padrão de diversificação. Além disso, habita um dos biomas que mais sofrem interferência humana, o Cerrado, de forma que esforços de coleta devem ser direcionados para sua área de ocorrência com o intuito de esclarecer sua atual condição taxonômica e de conservação, já que apresenta três cariótipos disitintos ($2n=58$, 60, 64), e, portanto sua diversidade deve estar subestimada e ameaçada.

Euryoryzomys sp. SB (clado E), encontrada em brejos de altitude, apareceu mais relacionado a um clado também do bioma amazônico. A

maioria dos autores concorda que táxons presentes em brejos de altitude estão, em geral, relacionados a outros táxons na MA e AM (de Vivo, 1997).

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade que esforços de coleta sejam maiores nessas áreas onde se verificam as lacunas amostrais para o gênero. Essas informações, associadas a dados morfológicos, cariotípicos e moleculares contribuirão para uma caracterização mais efetiva da sua biodiversidade. Além disso, torna-se necessário que os exemplares existentes em coleções biológicas sejam reavaliados sob a perspectiva dessas novas informações.

2.4 CONCLUSÕES

- *Euryoryzomys* é um gênero que possui uma diversificação complexa devido à extensão geográfica que ocupa. O gênero está com sua diversidade subestimada, principalmente no bioma amazônico, tendo em vista que, originalmente são descritas três espécies para a Amazônia e neste trabalho temos a indicação de que duas prováveis entidades taxonômicas permanecem sem identificação.
- Outras candidatas a novas espécies são as amostras encontradas no clado H, chamadas no momento de *Euryoryzomys* sp. 2, que correspondem aos exemplares identificados inicialmente como *E. nitidus*.
- As distâncias obtidas para *E. macconnelli* reiteram que se trata de um complexo de espécies, o que reforça a complexidade de diversificação do gênero na região amazônica, mas ainda não é possível sugerir um número de espécies em decorrência de lacunas amostrais.
- Até o momento, somente *E. russatus* parece ocupar a Mata Atlântica e o clado recuperado apresentou-se dividido em dois subclados. Entretanto, os suportes internos e as baixas distâncias genéticas apontam para a ocorrência de diferentes linhagens da mesma espécie ao longo do bioma (ver Capítulo 4).
- É possível que a área de distribuição de *E. legatus* seja maior do que a descrita na literatura e que esta espécie seja irmã daquelas encontradas no clado H, no Brasil.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul: Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 53, n. 1, p. 1-23, 1977.
- AVISE, J. C. Phylogeography: Restrospect and Prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- AYRES, J. M.; CLUTTON-BROCK, T. H. River boundaries and species range size in Amazonian primates. **American Naturalist**, v. 140, n. 1, p. 531-537, 1992.
- BEHLING, H.; LITCHE, M. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. **Quaternary Research**, v. 48, n. 3, p. 348-358, 1997.
- BEHLING, H.; ARZ, H. W.; PATZOLD, J.; WEFER, G. Late quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GEOB3104-1. **Quaternary Science Reviews**, v. 19, n. 10, p. 981-994, 2000.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trend in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.
- BUSH, M. B.; OLIVEIRA, P. E. The rise and fall of the refugial hypothesis of amazonian speciation: a paleoecological perspective. **Biota Neotropical**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2006.
- CARDOSO, Z. Z. A ligação histórica entre os biomas Amazônia e Mata Atlântica através da Caatinga: brejos de altitude. Monografia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CAPARELLA, A. P. Neotropical avian diversity and riverine barriers. **Acta Congressus Internationalis Ornithologici**. v. 20, n. 1, p. 307-316, 1992.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, n. 1, p. 71-86, 2003.
- D'ELIA, G.; PARDIÑAS, U. F. J. Systematics of Argentinian, Paraguayan and Uruguayan swamp rats of the genus *Scapteromys* (Rodentia: Cricetidae, Sigmodontinae). **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 5, p. 897-910, 2004.
- EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.M. **Mammals of the neotropics: the central neotropics**. Chicago: University of Chicago, 1999, 609 p.

- FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.
- GAMBLE, T.; SIMONS, A. M.; COLLI, G. R.; VITT, L. J. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 1, p. 269-277, 2008.
- GASCON, C.; MALCOLM, J. R.; PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F.; BOGART, J. P.; LOUGHREED, S. R.; PERES, C.; NECKEL, S.; BOAG, P. Riverine barriers and geographic distribution of amazonian species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America USA**, v. 97, n. 1, p. 13672-13677, 2000.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. T.N.T.: Tree analysis using new technology. Program and documentation, available from the authors, and at www.zmuc.dk/public/phylogeny, 2003.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131-137, 1969.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular Systematics**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 655 p.
- JOB, G.; von Haeseler, A.; Strimmer, K. Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 1, p. 18, 2004.
- KRONAUER, D. J. C.; BERGMANN, P. J.; MERCERA, J. M.; RUSSEL, A. P. A phylogeographically distinct and deep divergence in the widespread Neotropical turnip-tailed gecko, *Thecadactylus rapicauda*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 431-437, 2005.
- LOUGHREED, S. C.; GASCON, C.; JONES, D. A.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T. Ridges and rivers, a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, n. 1, p. 1829-1835, 1999.
- MACIEL, N. M.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R.; SCHWARTZ, E. F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the rugose toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 1, p. 787-797, 2010.
- MACHADO, T.; SILVA, V.; SILVA, M. J. J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/ Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 1-14, 2014.

- MARTINS, F. M.; DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 15, n. 1, p. 372-378, 2007.
- MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon hypothesis: A piece of the puzzle of Amazonian diversification. **Journal Compilation of Biology**, v. 2, n. 2, p. 103-119, 1997.
- MATTEVI, M. S.; ANDRADES-MIRANDA, J. Estudos genéticos nos roedores da tribo Oryzomyini. In: THALES, R.O.; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A (eds). **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**. 1. ed. São Carlos: Suprema, 2006, 170 p.
- MORITZ, C.; PATTON, J. L.; SCHNEIDER, C. J.; SMITH, T. B. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. **Annual Review of ecological Systems**, v. 31, n. 1, p. 533- 563, 2000.
- MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D.; BROTHERS, E.M.; GARDNER, A.L. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): diagnoses and distributions of species formerly assigned to *Oryzomys* "capito". **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 236, p. 1-376, 1998.
- PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazonian Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. **Evolution**, v. 48, n. 1, p. 1314-1323, 1994.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 244, n. 1, p. 1-306, 2000.
- PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F.; LARA, M. C.; MISTRANGI, M. A. Diversity, differentiation, and the historical biogeography of non-volant small mammals of the Neotropical forests. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGA, R. O. Jr. (eds.) **Tropical rainforest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented community**. 1 ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997, p. 455-465.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; HARRIS, D. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; Jr. SITES, J, K. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 1, p. 446-459, 2011.

- PERES, C. A.; PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F. Riverine barriers and gene flow in Amazonian saddle-back tamarins. **Folia Primatologica**, v. 67, n. 1, p. 174-183, 1996.
- RIBAS, C. C.; ALEIXO, A.; NOGEUIRA, A. C. R.; MIYAKI, C. Y.; CRACRAFT, J. A palaeobiogeographic model for biotic diversification with Amazonia over the past three million years. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, n. 1, p. 681-689, 2012.
- RONQUIST, E.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1572-1574, 2003.
- SALO, J.; KALLIOLA, R.; HAKKINEN, I.; MAKINEN, Y.; NIEMELA, M.; PUBAKKA, M.; COLEY, P. D. River dynamics and the diversity of Amazon lowland forest. **Nature**, v. 322, n. 1, p. 254-258, 1986.
- SILVA, M.J.J.; PERCEQUILLO, A.R.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Cytogenetics with systematic approach on a new *Oryzomys* species of nitidus group (Sigmodontinae, Rodentia) from Northeastern Brazil. **Caryologia**, v. 53, n. 3-4, p. 219-226, 2000.
- SMITH, M. F.; PATTON, J. L. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of Linnean Society**, v. 50, n. 1, p. 149-177, 1993.
- STANHOPE, M. J.; CZELUSNIAK, J.; SI, J. S.; NICKERSON, J.; GOODMAN, M. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein, with convincing evidence for bat monophyly. **Molecular Phylogeny and Evolution**, v. 6, n. 2, p.148-160, 1992.
- VAIDYA, G.; LOHMAN, D. J.; MEIER, R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 1, p. 171-180, 2010.
- VARGAS-RAMIREZ, M.; MARAN, J.; FRITZ, U. Red-and-yellow footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulate* (Reptilia: Testudines: Testudinidae), in south American savannahs and forests: to their phylogeographies reflect distinct habitats? **Organisms, Diversity and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 161-172, 2010.
- DE VIVO, M. Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. **Journal Compilation Biology**, v. 2, v. 1, p. 65-73, 1997.
- DE VIVO, M.; CARMIGNOTTO, A. P. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. **Journal of Biogeography**, v. 31, n. 1, p. 943-957, 2004.

- DE VIVO, M. Mamíferos e mudanças climáticas. In: BUCKERIDGE, M. S (ed.) **Biologia e mudanças climáticas no Brasil**. 1 ed. São Carlos: Rima Editora, 2008, p. 207-223.
- WALSH, P. S.; METZGER, D.A; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 1, p. 506-513, 1991.
- WEKSLER, M. Revisão sistemática do grupo de espécies *nitidus* do gênero *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.
- WEKSLER, M. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 331-349, 2003.
- WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing and invasion: landbridges, refugia and phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 1095-1108, 2005.

*CAPÍTULO III – O POTENCIAL DO DNA
BARCODING NA IDENTIFICAÇÃO DE ROEDORES DO
GÊNERO EURYORYZOMYS (CRICETIDAE:
SIGMODONTINAE: ORYZOMYINI)*

Abstract: *Euryoryzomys* is a genus distributed throughout South America. Currently, there are seven recognized species. In this chapter, samples from 29 localities were used, including four from Argentina, one from Suriname and 24 from Brazil. Analyses were performed with 124 partial sequences of the molecular marker *coxI*, including an outgroup composed of *Hylaeamys megacephalus*, *Oecomys concolor*, and *Oligoryzomys fulvescens* with the aim of evaluating the DNA barcoding as a tool for identification of the species of the genus. The sequences obtained were compared to BOLD sequences and subsequently used for calculating genetic distances and Kimura-2- parameter (K2p) as a molecular model, and also for obtaining a tree using Neighbor-Joining (NJ). Additionally, analysis of species delimitation with the MrBayes was also performed. The topology recovered *Euryoryzomys* as a monophyletic genus (bootstrap=56) and eight groups of likely species. The smallest genetic distances were found between *Euryoryzomys* sp. SB (Serra de Baturité, Ceará) and *Euryoryzomys* sp. 2 ($4.8\% \pm 0.8\%$), and between *E. emmonsae* and *Euryoryzomys* sp. 1 ($8.6\% \pm 0.2$). The intraspecific distances of *E. macconnelli* was $1.3\% \pm 0.8\%$ and *Euryoryzomys* sp. 3 was $0.5\% \pm 0.4\%$. The topology of IB was similar to NJ and recovered the same eight groups with high supports. The analyses also revealed that the diversity of the genus is indeed underestimated, being possible to observe the occurrence of at least eight species: *Euryoryzomys* sp. 1, *E. emmonsae*, *Euryoryzomys* sp. 2, *E. legatus*, *Euryoryzomys* sp. SB, *E. russatus*, *Euryoryzomys* sp. 3, *E. macconnelli*, and *E. lamia* which is not represented in this study. These analyses are contributing to separate these species.

RESUMO: *Euryoryzomys* é um gênero distribuído por toda a América do Sul. Atualmente, é composto por sete espécies reconhecidas. No presente capítulo, foram utilizadas amostras de 29 localidades, sendo quatro na Argentina, uma no Suriname e 24 no Brasil. As análises foram realizadas com 124 sequências parciais do marcador molecular *coxI*, incluindo o grupo externo formado por *Hylaeamys megacephalus*, *Oecomys concolor* e *Oligoryzomys fulvescens*, com o objetivo de avaliar a contribuição do DNA *barcoding* para a caracterização das espécies do gênero. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do BOLD e, posteriormente, usadas na construção de uma matriz utilizada para o cálculo de distâncias genéticas, utilizando o modelo molecular Kimura-2-parâmetros (K2p), e na obtenção de uma árvore, empregando Neighbor-Joining (NJ). Adicionalmente, foram incorporadas análises de delimitação de espécies com o programa MrBayes. A topologia obtida em NJ recuperou o gênero como monofilético (*bootstrap*=56) e oito grupos de prováveis espécies. As menores distâncias encontradas foram entre *Euryoryzomys* sp. SB (Serra de Baturité, Ceará) e *Euryoryzomys* sp. 2 ($4,8\% \pm 0,8\%$) e entre *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1 ($8,6\% \pm 0,2$). As distâncias intraespecíficas para *E. macconnelli* foram de $1,3\% \pm 0,8\%$ e para *Euryoryzomys* sp. 3 foi de $0,5\% \pm 0,4\%$. A topologia da IB foi semelhante à de NJ e recuperou os mesmos oito grupos com suportes elevados. As análises revelaram, ainda, que o gênero está com sua diversidade subestimada, sendo possível observar a ocorrência de pelo menos oito espécies: *Euryoryzomys* sp. 1, *E. emmonsae*, *Euryoryzomys* sp. 2, *E. legatus*, *Euryoryzomys* sp. SB, *E. russatus*, *Euryoryzomys* sp. 3, *E. macconnelli*, além de *E. lamia* que não foi representada no presente estudo. A análise contribuiu para as espécies do gênero.

3. INTRODUÇÃO

Euryoryzomys é um gênero de pequenos roedores distribuídos por toda a América do Sul, ocorrendo desde zonas tropicais andinas até as planícies subtropicais (Musser e Carleton, 2005). As características morfológicas externas das sete espécies (*E. emmonsae*, *E. lamia*, *E. legatus*, *E. macconnelli*, *E. nitidus*, *E. russatus* e *Euryoryzomys* sp. SB) são extremamente semelhantes, dificultando a identificação específica (Mattevi e Andrades-Miranda, 2006).

Outro fator que dificulta a identificação precisa dos membros desse gênero é o fato de algumas espécies possuírem número diplóide ($2n$), número fundamental (NF) e padrões de bandamento iguais, como o caso de *E. nitidus*, *E. russatus* e *E. emmonsae*, que apresentam $2n=80$ e $NF=86$ e cariótipo idênticos. Em contraposição, *E. macconnelli* apresenta diferentes números diplóides ($2n=64, 76$), o que indica a ocorrência de espécies crípticas (Patton *et al.*, 2000). Adicionalmente, Patton *et al.* (2000), utilizando cinco espécies do gênero (*E. nitidus*, *E. legatus*, *E. emmonsae*, *E. macconnelli* e *E. russatus*) e 801 pares de bases (pb) do gene citocromo-*b* (*cyt-b*) sugeriram ocorrência de mais de uma espécie no clado composto por *E. macconnelli*, já que representantes foram encontrados em dois subclados (*bootstrap*=73) e um valor de diferenças genéticas intraespecífica estimado em 11,10%. Em geral, o valor para diferenças intraespecíficas de mamíferos é estimado em cerca de 2%, valores entre 2 e 11% podem ou não ser da mesma espécie e valores acima de 11% tendem a ser atribuídos a espécies diferentes, provavelmente crípticas (Bradley e Baker, 2001).

A técnica do DNA *barcoding* tem sido testada e validada em vários grupos de espécies (Clare *et al.*, 2011). Inicialmente, a proposta do DNA *barcoding* era atribuir uma espécie a amostras desconhecidas e contribuir para a identificação de linhagens crípticas e na identificação de microorganismos, já que a morfologia nesses casos é de difícil compreensão (Hebert *et al.*, 2003; Frézal e Leblois, 2008). Posteriormente, outras aplicações foram surgindo e o DNA *barcoding* passou a contribuir nas áreas de ecologia, medicina, ciências forenses, agronomia, epidemiologia, entre outros (Armstrong e Ball, 2005; Rubínoff, 2005; Gonçalves, 2009).

Esse método tem se mostrado particularmente importante para o grupo de roedores (Muller *et al.*, 2013), pois, além das questões de taxonomia e sistemática pouco esclarecidas, existe também uma questão importante de saúde pública envolvida na identificação de espécies reservatórios de zoonoses. Sendo assim, representa uma ferramenta que garante identificação rápida e eficiente para os setores de vigilância sanitária.

Diante das dificuldades na delimitação de espécies para *Euryoryzomys*, esse capítulo tem como objetivo avaliar a aplicabilidade do marcador molecular *coxI* como ferramenta para a identificação das espécies do gênero, por meio das análises das sequências parciais, estimando seus níveis de variabilidade intra e interespecíficas.

Pretende-se responder as seguintes perguntas: (i) As sequências parciais de *coxI* são úteis para a identificação das espécies do gênero *Euryoryzomys*?; (ii) O DNA *barcoding* pode contribuir para a caracterização de espécies que ainda não foram descritas para o gênero e, dessa forma, ajudar na caracterização da biodiversidade?

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

Para o presente trabalho, foram amostradas 29 localidades (Figura 3.1), sendo quatro pontos na Argentina, um no Suriname e 24 no Brasil. Um total de 124 sequências do gene *coxI* estão distribuídas da seguinte forma: três como grupo-externo, extraídas do BOLD (*The Barcode of Life Database*) e pertencentes às espécies *Hylaeamys megacephalus* (JQ601149), *Oecomys concolor* (JF491662) e *Oligoryzomys fulvescens* (JF491797). As 121 sequências restantes representam as espécies do gênero *Euryoryzomys*: *E. emmonsae*, *E. legatus*, *E. macconnelli*, *E. russatus*, *Euryoryzomys* sp. SB e as possíveis espécies encontradas no capítulo 2: *Euryoryzomys* sp. 1⁵ e *Euryoryzomys* sp. 2. Do total de amostras, 15 foram extraídas do *GenBank* e

⁵ As espécies *Euryoryzomys* sp. 1 e *Euryoryzomys* sp. 2 foram analisadas nesse capítulo sob o ponto de vista de espécies válidas conforme os resultados do capítulo 2, entretanto, as análises do presente capítulo foram realizadas antes do capítulo 2, de forma que essa nomenclatura foi adotada apenas com a finalidade de facilitar a interpretação entre os dois capítulos.

12 do BOLD (Tabela 3.1). Das sete espécies reconhecidas para o gênero, somente *E. lamia* e *E. nitidus* não foram representadas neste estudo.

O DNA foi extraído de amostras de fígado e músculo utilizando Chelex 5% (Walsh *et al.*, 1991).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos universais LCO1490 (5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G – 3') e HCO2198 (5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3') (Folmer *et al.*, 1994), amplificando 670 pb. As reações, o perfil da PCR, purificação e sequenciamento foram realizados conforme descrito no Capítulo 2.

3.1.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram visualizados no programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, Massachussets). As sequências foram submetidas a uma pesquisa comparativa de similaridade no BLASTn, *GenBank* (Basic Local Alignment Tool) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>] e, posteriormente, editadas, utilizando a ferramenta Phred/ Phrap para verificar a qualidade do sequenciamento. Uma checagem manual também foi conduzida para verificar as ambiguidades e possíveis códons de parada.

3.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES NO BOLD E O TESTE DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

Cada sequência obtida foi submetida à comparação com as sequências depositadas no banco de dados do BOLD usando a ferramenta IDS (*Identification System*). Essa ferramenta consiste na comparação da sequência de interesse com 100 sequências mais próximas a ela. O programa também permite a construção de uma árvore de Neighbor-Joining (NJ) e o cálculo de distância genética baseado no modelo molecular Kimura-2-parâmetros (K2p). Somente as sequências com mais de 98% de similaridade com as sequências do BOLD foram consideradas para esse estudo.

No BOLD, existem sequências disponíveis para comparação somente para *E. russatus* e *E. macconnelli*, sendo assim, sequências para as demais

espécies foram validadas com base em análises filogenéticas anteriores e dados cariotípicos, quando informativos, disponíveis na literatura e no banco de dados do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan.

As análises, incluindo todas as sequências em uma única árvore de NJ, foram realizadas a partir de uma matriz construída no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) com 124 táxons, contendo 667 pb. O mesmo programa foi utilizado na análise de DNA *barcoding*, que consistiu no cálculo das distâncias genéticas intra e interespecíficas, utilizando também o modelo de evolução molecular K2p representado por uma árvore de NJ calculada para 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os valores de distância foram organizados no programa *Microsoft Office Excel* para a construção de gráficos de distribuição das variações intra e interespecíficas de todos os conjuntos de dados.

Adicionalmente ao teste, foram incorporadas análises de delimitação de espécies (DE), utilizando um *plugin* do programa *Geneious* (www.geneious.com), que atua como ferramenta para busca de evidências de barreiras de espécies em árvores de genes. Para isso, foram realizadas análises estatísticas relacionadas à probabilidade do monofiletismo recíproco e capacidade de identificar com sucesso amostras indeterminadas dentro ou próximo de suas espécies prováveis (Masters *et al.*, 2011). Para essa análise, foi necessária a obtenção de uma topologia por meio de inferência bayesiana, uma vez que o método DE emprega modelos de coalescência. Essa topologia foi obtida no programa MrBayes 3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2011) com o emprego do modelo evolutivo GTR+I+G, sendo este último obtido no programa Treefinder. A árvore foi obtida por meio de duas corridas simultâneas, cada uma com quatro cadeias de Markov com dez milhões de gerações. O *burnin* utilizado foi de 25% de corte das gerações iniciais.

3.2 RESULTADOS

A composição média de bases nitrogenadas para as 124 amostras foram de: 29% de A, 29% de T, 26% de C e 16% de G.

Um total de 119 amostras foram utilizadas na construção dos gráficos de distâncias intraespecíficos, pois três delas pertenciam ao grupo-externo e duas apresentaram distâncias intraespecíficas superiores a 18% e apareceram

mais relacionadas *Oligoryzomys fulvescens* (JF491797) na reconstrução de NJ.

3.2.1 TOPOLOGIA NEIGHBOR-JOINING

A topologia obtida em NJ recuperou o gênero como monofilético (*bootstrap*=56) e oito grupos de prováveis espécies foram encontrados (Figura 3.2).

As amostras previamente identificadas como *E. russatus* apareceram no grupo I (Figura 3.2). Os grupos II e III correspondem às amostras identificadas como *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1, respectivamente, e apareceram divididas em dois grupos com *bootstrap*=91%. Cada grupo apareceu na topologia de NJ com suporte de 100% na topologia de NJ.

O grupo IV corresponde exclusivamente às amostras de *Euryoryzomys* sp. SB, provenientes da Serra de Baturité no Ceará. Já os grupos V e VI correspondem a *E. legatus* e *Euryoryzomys* sp. 2, respectivamente.

As amostras de *E. macconnelli* foram inicialmente consideradas como sendo pertencentes a mesma espécie (*bootstrap*=87%), todavia apareceram divididas na topologia obtida por NJ (Figura 3.2) em dois grupos, VII e VIII, com altos valores de suporte. O grupo VII é representado pelos exemplares de Juruena e Aripuanã, MT, provisoriamente denominados *Euryoryzomys* sp. 3, grupo VIII está restrito ao Suriname, que dista cerca de 1400 km de Aripuanã e Juruena, MT (norte do estado de Mato Grosso, MT) onde o grupo VII foi encontrado (Figura 3.1).

Dos oito grupos encontrados, cinco são congruentes com áreas de distribuição geográficas e não há simpatria: Grupo I. *E. russatus* ficou restrito à região sudeste do Brasil, exclusivamente distribuído em áreas de Mata Atlântica; Grupo II. *E. emmonsae* ficou restrito à margem leste do rio Xingu, região compatível com a área de distribuição de seu holótipo (Musser *et al.*, 1998) e predominantemente ocupado pelo bioma amazônico; Grupo IV. *Euryoryzomys* sp. SB ficou restrito aos brejos de altitude da Serra do Baturité, no estado do Ceará; Grupo V. *E. legatus* permaneceu restrito à área compatível com seu holótipo; e grupo VIII representado por *E. macconnelli* que permaneceu restrita ao norte do rio Amazonas.

Os demais grupos apresentaram sobreposição em suas áreas de ocorrência: Grupo III. *Euryoryzomys* sp. 1, mais similar a *E. emmonsae* e distribuído a oeste do rio Xingu; Grupo VI. *Euryoryzomys* sp. 1, ficou restrito ao norte do estado do Mato Grosso, nos municípios de Apiacás e Cláudia, que por sua vez é simpátrica a *Euryoryzomys* sp. 3 (Grupo VII) no município de Juruena, também ao norte do estado de Mato Grosso.

3.2.2 DISTÂNCIAS INTRA E INTERESPECÍFICAS

As distâncias intraespecíficas variaram de 0 (zero) a 1,7% sendo a média de $0,38 \pm 0,4\%$. O maior valor intraespecífico ($1,7\% \pm 1,2\%$) foi encontrado para o grupo que recuperou a espécie *E. russatus* (Tabela 3.2), entretanto, não se sobrepôs (Figura 3.4C). A distância interespecífica média e seu respectivo desvio padrão foram de $13,6\% \pm 0,31\%$, respectivamente.

As menores distâncias encontradas foram entre *Euryoryzomys* sp. SB e *Euryoryzomys* sp. 3 ($4,8\% \pm 0,08\%$), *Euryoryzomys* sp. SB e *E. legatus* ($4,9\% \pm 0,01$) e entre *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1 ($8,6\% \pm 0,2$).

As amostras consideradas inicialmente como *E. macconnelli* na Tabela 3.1, correspondem a 15,32% das amostras e os dados das distâncias confirmaram a topologia obtida em NJ. As distâncias intraespecíficas para *E. macconnelli* (Suriname – Grupo VIII) foram de $1,3\% \pm 0,8$ e para *Euryoryzomys* sp. 3 (MT – Grupo VII) foi de $0,5\% \pm 0,4\%$, contudo a distância interespecífica obtida entre os dois grupos foi de $11,8\% \pm 0,4\%$. As distâncias intra e interespecíficas estão representadas no gráfico de distribuição de frequência (Figura 3.4A).

Os grupos II e III, representados por *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1 apresentaram distâncias intraespecíficas respectivamente de 0 (zero) e $0,3\%$ e distância interespecífica de $8,6\% \pm 0,2\%$ (Figura 3.4B).

Euryoryzomys sp. SB, que corresponde a 3,22% da amostra, está representada no grupo IV (Figura 3.2) que não apresentou distância intraespecífica. A distância e DP médios entre *E. legatus* (Grupo V) e *Euryoryzomys* sp. 2 (Grupo VI) foram de $4,9\% \pm 0,01$ e $4,8 \pm 0,08$. (Tabela 3.2).

E. legatus e *Euryoryzomys* sp. 2 apresentaram respectivamente 0 (zero) e $1\% \pm 0,8\%$ de distância intra e a interespecífica foi de $5,1\% \pm 0,04\%$ (Figura 3.4D).

Foi possível identificar 98,35% das amostras. Somente as amostras APC000181 e APC000182, inicialmente identificadas como *E. macconnelli* e provenientes de Juruena, MT (Tabela 3.1), não puderam ser identificadas pelo método. Um problema com essas amostras já havia sido identificado no Capítulo 2.

3.2.3 DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES APLICADA AO DNA BARCODING

A topologia da IB foi semelhante à de NJ e recuperou os mesmos oito grupos com suportes elevados (dado não mostrado). A divisão em duas unidades distintas para *E. macconnelli* (Suriname) e *Euryoryzomys* sp. 3 (Mato Grosso) foi novamente observada e a propabilidade a *posteriori* (pp) para esse grupo foi de 87%. *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1 também apareceram divididas (pp= 100%). *Euryoryzomys* sp. SB, *Euryoryzomys* sp. 3, *E. legatus* e *E. russatus* foram igualmente recuperados em ambas.

A análise de DE (Tabela 3.3) apresenta *E. macconnelli* como a espécie mais próxima de *Euryoryzomys* sp. 3, porém aponta distâncias intraespecíficas elevadas (4,41%). Para *Euryoryzomys* sp. 3, a distância intra também foi elevada (2,6%) em relação à obtida em K2p (0,5%). O valor obtido para a delimitação interespecífica foi de 6,47% e a relação intra/inter foi de 0,68 para *E. macconnelli* e 0,4 para *Euryoryzomys* sp. 3. O valor de Av(MRCA) que representa a distância média em que o grupo provável está de seu ancestral comum mais próximo também, foi maior para *E. macconnelli*, de 3,07% (Tabela 3.3).

E. emmonsae e *Euryoryzomys* sp. 1 também foram recuperadas como espécies próximas, sendo de 2 e 2,9%, respectivamente e interespecíficas de 4,22%, sendo essa interespecífica menor do que a interespecífica obtida entre *E. macconnelli* e *Euryoryzomys* sp. 3. A razão intra/interespecífica foi de 0,47 para *E. emmonsae* e 0,57 para *Euryoryzomys* sp. 1. (Tabela 3.3).

E. russatus e *Euryoryzomys* sp. 3 também apresentaram elevadas distâncias intraespecíficas, 4,44% e 3,2%, respectivamente e interespecífica igual ou diminuída em relação a espécie apontada como mais próxima. No caso de *E. russatus*, a espécie apontada como mais próxima foi *E. emmonsae*, e a distância interespecífica foi de 6,919%, por outro lado, para *Euryoryzomys*

sp. 3, a espécie mais próxima foi *E. legatus* com distância interespecífica de 5% e relação intra/inter de 0,64.

3.3 DISCUSSÃO

O *barcoding gap* (Figura 3.5) observado entre *E. macconnelli* e *Euryoryzomys* sp. 3, *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1, e *Euryoryzomys* sp. 3 e *E. legatus* mostra que é possível identificar a maioria das espécies do gênero quando comparações são feitas com a literatura e a filogenia apresentada no capítulo 2.

Barbosa (2012) constatou que as análises de distância para roedores da subfamília Sigmodontinae apontaram que o *barcoding gap* foi suficiente para delimitar a grande maioria das espécies, porém ressaltou que procedimentos adicionais de sistemática e taxonomia são indispensáveis.

Observando as distâncias genéticas obtidas entre o grupo formado por *E. macconnelli* e *Euryoryzomys* sp. 3 e *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1, a sugestão de que se trata de espécies novas se deve aos valores de distâncias entre elas. Altos valores de distâncias intraespecíficas podem revelar complexos de espécies crípticas, conforme observado em um estudo realizado com lepidópteros, no qual amostras consideradas pertencentes a uma espécie formavam um complexo de dez novas espécies (Hebert *et al.*, 2004). Além disso, resultados obtidos no capítulo 2 do presente trabalho corroboram essas informações.

Sendo assim, como todas as amostras inicialmente identificadas como *E. macconnelli* apareceram divididas em dois clados com distâncias esperadas para espécies diferentes, é possível sugerir que se tratam de espécies distintas, corroborando inclusive inferências realizadas em estudos de filogenia, que sugeriram *E. macconnelli* como um complexo de espécies (presente trabalho, Capítulo 2).

De acordo com as regras de nomenclatura zoológica e considerando a proximidade com a localidade-tipo, o nome *E. macconnelli* deve ser restrito às amostras encontradas no Suriname. As amostras do Brasil, provisoriamente nomeadas *Euryoryzomys* sp. 3, devem ser analisadas sob a perspectiva de uma nova espécie para o gênero com distribuição restrita ao sul do rio Amazonas, cujos dados citogenéticos indicam $2n=64$ e $NF=70$. Os espécimes

do Peru, descritos por Gardner e Patton (1976), possuem a mesma composição cariotípica de *Euryoryzomys* sp. 3 e devem ser comparados morfológica e molecularmente tanto com as amostras do Suriname quanto com as amostras do Brasil para verificar se fazem parte do grupo VII ou VIII ou se representa outra espécie para o complexo.

A distância de 11,8% observada entre duas espécies é elevada até mesmo para espécies consideradas irmãs. De acordo com Barbosa (2012), quando duas espécies-irmãs apresentam altas distâncias genéticas entre elas, pode significar uma provável ausência de táxons intermediários e talvez seja isso que ocorreu entre *E. macconnelli* e *Euryoryzomys* sp. 3.

Além disso, extensão geográfica que separa os grupos (VII e VIII) é também muito grande (cerca de 1400 km) e a presença de um táxon intermediário no sentido norte/sul da Amazônia é provável, sendo assim, *E. macconnelli* pode ser considerado até o momento como sendo um complexo de espécies com no mínimo três espécies representantes: *E. macconnelli* (Suriname), *Euryoryzomys* sp. 3 (Mato Grosso) e um intermediário entre elas, dada a lacuna amostral

O mesmo ocorre com as amostras de *E. emmonsae*, porém no sentido leste-oeste da Amazônia. Os exemplares de *E. emmonsae*, a princípio (capítulo 2) identificados como uma única entidade, foram recuperados também neste estudo como duas entidades distintas devido às distâncias obtidas entre elas: *E. emmonsae* na região de Vila Rica (MT) e *Euryoryzomys* sp. 1 em Cláudia (MT), separados pelo Rio Xingu.

A partir dos dados obtidos com base no DNA *barcode*, a diversidade do gênero na região amazônica parece estar subestimada indicando que os esforços de coleta devem ser mais significativos nessas áreas. Dentro desse contexto, além de identificar espécimes desconhecidos e indicar potenciais novas espécies, o DNA *barcoding* também ajudaria a direcionar áreas prioritárias para estudos de conservação.

Casos de distâncias genéticas elevadas foram reportados em outros estudos e revelaram que as espécies constituíam complexos de espécies (Hebert *et al.*, 2004; Clare *et al.*, 2007; Bonvicino *et al.*, 2009) e que, posteriormente, quando estudadas sob a perspectiva ecológica apresentaram diferenças significativas (Herbert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2006).

Euryoryzomys sp. SB está distribuída em regiões chamadas de brejos de altitude. Essa espécie, além de não apresentar variação em suas distâncias, possui um número diplóide característico ($2n=76$) que a diferencia das demais e pode favorecer a identificação de uma amostra indeterminada para o grupo, conforme inicialmente proposto por Silva *et al.* (2000).

Outro aspecto observado foi que *Euryoryzomys* sp. SB apresenta distâncias menores em relação *Euryoryzomys* sp. 2 e *E. legatus* ($4,85\% \pm 0,04\%$), que ocupam regiões amazônicas e sopé dos Andes, respectivamente, do que com *E. russatus* ($11,9\% \pm 0,6\%$), espécie endêmica de Mata Atlântica, sugerindo que pode ter havido um contato mais recente entre Amazônia e a região da atual Caatinga do que o contato entre Amazônia e Mata Atlântica, devendo esse aspecto ser investigado sob perspectivas biogeográficas.

E. legatus, *Euryoryzomys* sp. 2 e *E. russatus* mostraram que podem ser identificadas pelo método, pois as distâncias intraespecíficas também não ultrapassaram 2% de diferenças (Bradley e Baker, 2001; Hebert *et al.*, 2004). As distâncias interespecíficas entre *E. legatus* e *Euryoryzomys* sp. 2 ($5,1\% \pm 0,4\%$) respeitaram o valor mínimo de dez vezes maior do que a variação intraespecífica média das espécies (Hebert *et al.*, 2003).

Segundo DeSalle *et al.* (2005), no caso de espécies proximamente relacionadas, um valor universal de distâncias para delimitar táxons não deve ser considerado como objetivo para estabelecer limites entre as espécies. Em geral, os métodos baseados em árvores de distâncias utilizam o monofiletismo recíproco dos grupos para realizar essa delimitação, entretanto, mesmo na presença de suportes elevados, ainda assim há limitações, pois os agrupamentos de haplótipos não são garantia para que uma amostra indeterminada pertença a uma espécie conhecida, caso essa amostra pertença a uma população panmítica sob influência de um processo de coalescência aleatória, que poderia também gerar um padrão de espécies crípticas mesmo sendo resultado apenas de uma variação presente em uma grande população (Rosenberg, 2007; Masters *et al.*, 2011).

Além de o método apontar novas espécies para o gênero, também foi possível sugerir algumas prováveis abordagens que podem trazer mais respostas sobre os padrões de evolução do gênero, assim como já foi feito em grupos mais complexos e categorias acima de gêneros e que possuem

padrões evolutivos muito mais complexos do que *Euryoryzomys*, por exemplo, aves neotropicais (Vilaça *et al.*, 2006).

A técnica de DNA *barcoding* utiliza metodologias muito semelhantes às de filogenias, contudo não é um método adequado para isso. As críticas à técnica se concentram principalmente em afirmar que uma sequência de DNA muito curta é insuficiente para descrever toda a biodiversidade e tampouco inferir as relações filogenéticas (Moritz e Cicero, 2004; Ebach e Holdrege, 2005) e essa afirmação está correta, no entanto a técnica é muito eficiente para identificar amostras indeterminadas, o que pode representar maior rapidez na identificação em processos de levantamento de fauna para grandes empreendimentos, como na construção de hidrelétricas, na identificação de espécies no tráfico ilegal de animais silvestres, ou, ainda, na identificação de vetores de doenças de relevante interesse para a saúde pública.

Barbosa (2012) verificou que a técnica é promissora para a identificação de roedores da subfamília Sigmodontinae e no mesmo estudo apresentou dados de *Euryoryzomys*, entretanto com amostragens muito pequenas. Dessa forma, o presente trabalho além de incluir as amostras desse estudo, contribui com novas sequências e, conseqüentemente, para o aumento de sequências-referência no BOLD, elevando o número de espécies amostradas para comparação.

No presente trabalho, as distâncias intraespecíficas obtidas por DE através da topologia IB foram próximas às obtidas por NJ para cinco grupos de espécies prováveis. Desses cinco, dois apresentaram variação acima de 2% (Tabela 3.3). As demais espécies prováveis que *Euryoryzomys* sp. 2 e *E. russatus* com valores de 4,41; 3,2 e 4,44, respectivamente.

Na análise DE foi considerada uma árvore de IB com distâncias corrigidas para o modelo GTR+I+G. Os valores de confiança também mudam e a razão intra/inter torna-se mais informativa do que o *barcoding gap*, pois ao comparar os valores intra com os interespecíficos é possível quantificar a espécie provável em relação às demais.

No caso de *E. macconnelli*, por exemplo, essa razão foi de 0,68 e para *Euryoryzomys* sp. 1, de 0,4, indicando que no primeiro caso há elevada variação interna, muito semelhante à interespecífica, todavia, no segundo caso, a variação interna encontrada é menor do que a interespecífica. O

mesmo pode ser dito para *Euryoryzomys* sp. 1, *Euryoryzomys* sp SB, *E. legatus* e *E. emmonsae*.

E. russatus e *Euryoryzomys* sp. 2 apresentam a razão intra/inter semelhante a encontrada em *E. macconnelli* e isso pode ser atribuído ao modelo empregado pelo método DE, que parece estar superestimando a diversidade dessas espécies.

Os valores de P ID (Strict) e P ID (Liberal) referem-se à probabilidade de uma amostra desconhecida ser identificada corretamente (Masters *et al.*, 2011). O primeiro considera somente a probabilidade de identificação dentro da espécie provável, entretanto esse valor está intimamente relacionado com o número de sequências-referência, cuja amostra desconhecida será comparada, e o segundo admite a probabilidade de identificação dentro da espécie provável ou nas espécies mais próximas à provável. Esse viés de amostragem parece refletir principalmente na identificação de *Euryoryzomys* sp. 1 e *E. emmosae*, pois estes apresentam as menores amostragens da análise.

Os valores de Av(MRCA) que representam a distância média entre o ancestral comum mais próximo da espécie provável foi elevado somente para *E. macconnelli* e *E. russatus* e os valores de P de Rosenberg não foram significativos. Assim, todas as espécies prováveis consideradas podem ser tratadas como entidades taxonômicas distintas.

Essa aparente contradição entre P de Rosenberg, razão intra/inter e suportes de IB reforçam a sensibilidade e dependência do método DE em relação à amostragem das sequências-referência e sugere que, nesse caso, onde as espécies são mais próximas, as distâncias genéticas obtidas no NJ e K2p parecem ser suficientes para ajudar na identificação de amostras indeterminadas.

O mesmo já foi observado na identificação de psitacídeos, na qual espécies muito próximas puderam ser identificadas devido à presença de uma sequência de referência da espécie-irmã depositada no BOLD (Gonçalves, 2009). Sendo assim, as estatísticas e modelos evolutivos mais robustos devem ser reservadas para amostragens mais complexas que incluam outros níveis taxonômicos.

A partir dos dados obtidos com base no DNA *barcoding*, a diversidade do gênero na região amazônica está subestimada, indicando que os esforços de coleta devem ser mais significativos nessas áreas. Dentro desse contexto, além de identificar espécimes desconhecidos e indicar potenciais novas espécies, o DNA *barcoding* também ajudaria a direcionar áreas prioritárias para estudos de conservação.

A abordagem DE parece muito dependente da amostragem da sequência-referência, muito mais do que o método DNA *barcoding* convencional. As diferenças nos resultados estão na maneira como os dados são tratados, no caso do método tradicional, por exemplo, a identificação somente procede se a sequência indeterminada obtiver pelo menos 98% de similaridade com uma sequência do BOLD, caso contrário dificilmente a amostra poderá ser identificada. A DE, ao contrário, incorpora modelos evolutivos robustos demais para um conjunto de dados muito simples, o que superestima a diversidade do gênero. Entretanto, os valores de P de Rosenberg (probabilidade de monofiletismo recíproco) foram esperados para espécies que não são resultado de um processo de coalescência aleatória, sendo assim, todas as espécies prováveis propostas pelo teste puderam ser consideradas como válidas.

3.4 CONCLUSÕES

Ambas as formas de análise (DNA *barcoding* e Delimitação de Espécies) resgataram oito espécies prováveis para o gênero *Euryoryzomys*.

As análises revelaram que o gênero está com sua diversidade subestimada (reforçando o que foi encontrado no Capítulo 2) sendo possível observar a ocorrência de pelo menos oito espécies: *Euryoryzomys* sp. 3, *E. macconnelli*, *Euryoryzomys* sp. 1, *E. emmonsae*, *Euryoryzomys* sp. 2, *E. legatus*, *Euryoryzomys* sp. SB e *E. russatus*. Além dessas oito espécies, ainda existem *E. lamia* e *E. nitidus* que não foram representadas na amostragem. Logo, o número atual de seis espécies descritas para o gênero é insuficiente para representar sua diversidade e, pelo menos, 10 espécies podem ser consideradas.

Embora as espécies *Euryoryzomys* sp. 1 e *Euryoryzomys* sp. 2 estejam em simpatria e apresentem o mesmo número diplóide, o método de DNA *barcoding* apontou distâncias genéticas elevadas que podem futuramente ajudar na identificação de amostras desconhecidas provenientes dessas áreas.

Figura 3.1 - Mapa parcial da América do Sul, destacando a distribuição dos pontos amostrados. 1 – Sipaliwini River Camp, Suriname; 2 – Aripuanã, MT; 3 –Juruena, MT; 4 – Apiacás, MT; 5 – Cláudia, MT; 6 – Vila Rica, MT; 7 – Pacoti, CE; 8 – Campo Largo, Salta, Argentina; 9 - Finca Rio Seco Embarcacion, Salta, Argentina; 10 – Planta Caimancito Bateria, Jujuy, Argentina; 11 - Finca El Piquete, Jujuy, Argentina; 12 – Ortigueira, PR; 13 - Wenceslau Brás, PR; 14 – Terra de Areia, RS; 15 – Blumenau, SC; 16 – Fazenda Intervalos, SP; 17 – Parque Estadual da Serra do Mar, Carlos Botelho, SP; 18 – Pilar do Sul, SP; 19 – Ilha do Cardoso, SP; 20 – Iguape, SP; 21 – Juquitiba, SP; 22 – Piedade, SP; 23 – Caucaia do Alto, SP; 24 – Parque Estadual Loefgreen, Horto Florestal, SP; 25 – São Bernardo do Campo, SP; 26 – Biritiba-Mirim, SP; 27 – Bertiooga, SP; 28 – Parque Estadual da Serra do Mar, núcleo Vargem Grande, SP; 29 – Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, SP.

Tabela 3.1 - Amostras de *Euryoryzomys* utilizadas nas análises. Espécie provável: refere-se à identificação inicial; Nº de campo, *GenBank*/ BOLD; Procedência; Ponto no mapa (P); País; Latitude e Longitude. As demais sequências foram geradas para o presente estudo.

ESPÉCIE PROVÁVEL	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE
<i>E. emmonsae</i>	APC000312	Vila Rica, MT	6	Brasil	-10	-51,1
	APC000316					
	APC000318					
	APC000328					
<i>Euryoryzomys</i> sp. 1	M97000	Apiacás, MT	4	Brasil	-9,53	-57,45
	M968591	Claudia, MT	5	Brasil	-11,52	-54,88
	M968595					
	M97007					
	M97011					
	M97014					
	M97018					
	M97120					
	M97150					
<i>E. legatus</i>	JPJ1109	Finca El Piquete, margem esquerda do rio Volcan, Jujuy	11	Argentina	-24,19	-64,56
	JPJ2050	Planta Caimancito, Bateria, Jujuy	10	Argentina	-23,64	-64,6
	JPJ1542	Campo Largo, km 74.5 de laruta entre Acambuco y Campo Largo	8	Argentina	-22,03	-63,93
	JPJ1831	Finca Río Seco, 40 km al N de Embarcación	9	Argentina	-22,85	-64,08
<i>E. macconnelli</i>	APC000152	Juruena, MT	3	Brasil	-10,32	-58,35
	APC000174					
	APC000181					
	APC000182					
	M000146					
	M000147					

Continuação Tabela 3.1

ESPÉCIE PROVÁVEL	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE
<i>E. macconnelli</i>	¹ ROM:MAM120668/ JQ601259*	Sipaliwini River Camp Suriname	1	Suriname	2,29	-56,607
	¹ ROM:MAM120687/ JQ601275*					
	¹ ROM:MAM120688/ JQ601276*					
	¹ ROM:MAM120671/ JQ601262*					
	¹ ROM:MAM120658/ JQ601249*					
	¹ ROM:MAM120620/ JQ601215*					
	¹ ROM:MAM120526/ JQ601148*					
	¹ ROM:MAM120559/ JQ601173*					
	¹ ROM:MAM120669/ JQ601260*					
	¹ ROM:MAM120656/ JQ601247*					
	¹ ROM:MAM120670/ JQ601271*					
	¹ ROM:MAM120675/ JQ601266*					
	¹ ROM:MAM120652/ JQ601243*					
	¹ ROM:MAM120386/ JQ601274*					
	PEU960004	Arupuanã, MT	2	Brasil	-10,16	-59,15
<i>Euryoryzomys</i> sp. 2	APC000153	Juruena, MT	3	Brasil	-10,32	-58,35
	APC000168					
	M97008	Cláudia, MT	5	Brasil	-11,52	-54,88
	968432	Apiacás, MT	4	Brasil	-9,53	-57,45
	968432					
<i>E. russatus</i>	CIT9	Fazenda Intervalles, Base Saibadela, Sete Barras, SP	16	Brasil	-24.22	-48.08

Continuação Tabela 3.1

ESPÉCIE PROVÁVEL	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE
<i>E. russatus</i>	G 034	Fazenda Intervalles, Base Saibadela, Sete Barras, SP	16 Brasil	-24.22	-48.08
	CIT77				
	CIT78				
	CIT126				
	CIT128				
	AC 191	Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, SP	29 Brasil	-23.36	-44.83
	AC 194				
	AC 206	Iguape, SP	20 Brasil	-24,68	-47,55
	CRS128	Pilar do Sul, SP	Brasil	-23.81	-47.7
	CRS 151				
	CRS 179				
	BS499	Caucaia do Alto, SP	23 Brasil	-23,68	-47,03
	UNIBAN2022	Biritiba-Mirim, SP	26 Brasil	-23,58	-46,03
	IT-M0360	Juquitiba, SP	21 Brasil	-23,92	-47,07
	IT-M0359				
	IT-M0357				
	VGB1/ ROD 05	Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Vargem Grande, Santa Virgínia, SP	28 Brasil	-23,26	-45,14
	RUSVGB5/ ROD 30				
	RUSSVF18/ ROD 40				
	ROD 104				
	ROD 105				
	ROD 107				
	ROD 108				
	RUSIC008/ ROD 129	Ilha do Cardoso, SP	19 Brasil	-25,14	-48,01
	RUSIC011/ROD 130				

Continuação Tabela 3.1

ESPÉCIE PROVÁVEL	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE
<i>E. russatus</i>	RUSIC007/ ROD 132	Ilha do Cardoso, SP	19	Brasil	-25,14	-48,01
	RUSIC015/ ROD 133					
	RUSIC014/ ROD 134					
	IC044/ ROD 146					
	IC049/ ROD147					
	RUSIC050/ROD148					
	RUSIC051/ROD149					
	CB007/ROD159					
	ROD139	Parque Estadual Loefgreen, Horto Florestal, SP (24)	24	Brasil	-23,46	-46,63
	CB87RUSS/ROD198	Parque Estadual da Serra do Mar, Carlos Botelho, SP (17)	17	Brasil	-24,13	-47,94
	CB61/ROD261					
	CB141/ROD263					
	CB178/ROD279					
	M-08	Piedade, SP	22	Brasil	-23,71	-47
	M-224	Bertioga, SP	27	Brasil	-23,85	-46,15
	ITM 0011	São Bernardo do Campo, SP	25	Brasil	-23,7	-46,55
	ITM 0016					
	ITM 0019					
	ITM 0034					
	ITM 0073					
	ITM 0089					
	ITM 0090					
	ITM 0008					
	ITM 0154					
	II-M298					
	II-M300	WenceslauBrás, PR	13	Brasil	-23,85	-49,8

Continuação Tabela 3.1

ESPÉCIE PROVÁVEL	Nº DE CAMPO/ CÓD LABORATÓRIO	PROCEDÊNCIA	P	PAÍS	LATITUDE	LONGITUDE
<i>E. russatus</i>	II-M303	WenceslauBrás, PR	13	Brasil	-23,85	-49,8
	II-M336					
	II-M076	Ortigueira, PR	12	Brasil	-24,2	-50,91
	II-M161					
	II-M142					
	II-M156					
	II-M130					
	II-M131					
	II-M134					
	II-M137					
	9409/GU938955*	Blumenal, SC	15	Brasil	-26,91	-49,06
	9695/ GU938960*					
	9773/ GU938958*					
	9954/ GU938947*					
	9994/ GU938950*					
	JR194/ GU938959*	Terra de Areia, RS	14	Brasil	-29,59	-50,12
	JR205/ GU938954*					
	JR208/ GU938957*					
	JR281/ GU938956*					
	JR297/ GU938896*					
	JR298/ GU938897*					
	JR299/ GU938895*					
<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	MTR027	Serra de Baturité, Pacoti, CE	7	Brasil	-4,21	-38,91
	MTR046					
	MTR048					
	MTR137					

Continuação Tabela 3.1

Total: Seis espécies

121 amostras

29 localidades

Três países

Grupo-externo***

Hylaeamys megacephalus JQ601149

Oecomys concolor JF491662

Oligoryzomys fulvescens JF491797

¹BOLD: Barcoding of Life Database

*extraído do *GenBank*

Figura 3.2 - Árvore de NJ obtida com o modelo K2p, com 1.000 réplicas de *bootstrap*. O 2n ao lado da barra, à direita, refere-se ao número diplóide encontrado para cada grupo. *APC000181 e APC000182 foram recuperados fora do gênero *Euryoryzomys*, entretanto apresentam 2n=64, com morfologia, cromossômica igual ao encontrado no grupo VII. A interrogação indica que o número diplóide é desconhecido; #: 2n variável, já foram descritos 2n=64 e 76 e NF=70 e 85. Valores acima dos ramos representam os suportes de *bootstrap* e, abaixo, representam as distâncias genéticas. As distâncias obtidas estão distribuídas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Distância média (%) e desvio padrão (%) obtidos para 119 amostras de *Euryoryzomys* utilizando o modelo evolutivo K2p. Diagonal amarela representa as distâncias intraespecíficas. As distâncias em vermelho estão discutidas nas seções 3.2.2 e 3.2.3.

	<i>E. macconnelli</i>	<i>Euryorzyomys</i> sp. 3	<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	<i>E. legatus</i>	<i>Euryoryzomys</i> sp. 2	<i>E. emmonsae</i>	<i>Euryoryzomys</i> sp. 1	<i>E. russatus</i>
<i>E. macconnelli</i>	1,3 ± 0,8							
<i>Euryorzyomys</i> sp. 3	11,8 ± 0,4	0,05 ± 0,0						
<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	16,1 ± 1,2	15,4 ± 0,0	0					
<i>E. legatus</i>	15,7 ± 0,3	15,9 ± 0,1	4,9 ± 0,0	0				
<i>Euryoryzomys</i> sp. 2	16,1 ± 0,5	15,2 ± 0,0	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,0	1,0 ± 0,8			
<i>E. emmonsae</i>	16,8 ± 0,01	14,1 ± 0,0	11,5 ± 0,0	13,7 ± 0,0	12,2 ± 0,1	0		
<i>Euryoryzomys</i> sp. 1	17,9 ± 0,0	16,2 ± 0,0	12,3 ± 0,1	13,8 ± 0,0	13,0 ± 0,1	8,6 ± 0,2	0,3 ± 0,40	
<i>E. russatus</i>	16,6 ± 0,0	15,5 ± 0,0	11,9 ± 0,1	14,0 ± 0,5	12,9 ± 0,6	10,9 ± 0,3	13,3 ± 0,3	1,7 ± 1,2

Figura 3.3 - Histograma mostrando a distribuição das distâncias intra e interespecíficas obtidas empregando o modelo K2p. A: Distâncias intra e interespecíficas de amostras de *E. macconnelli*, posteriormente dividido em *E. macconnelli* e *Euryoryzomys* sp. 3; B: *E. emmonsae*, também dividido em *E. emmonsae* e *Euryoryzomys* sp. 1. C: *E. russatus*; D: *Euryoryzomys* sp. 2. e *E. legatus*.

Tabela 3.3 - Estatísticas obtidas pelo Species Delimitation (DE - Geneious) para cada espécie provável. Distribuição. intra: distância média entre membros de uma espécie provável; Dist. inter: Distância média entre os membros de uma espécie em relação a espécie mais próxima; Intra/Inter: razão entre as distâncias intra e interespecífica; P ID(Strict): Probabilidade média de identificar corretamente um espécime desconhecido pertencente a uma espécie provável; P ID (Liberal): Probabilidade de identificar um espécime desconhecido em uma espécie provável e em sua espécie mais próxima; Av(MRCA): Distância média entre o ancestral comum mais recente da espécie provável; P de Rosenberg: probabilidade do monofiletismo recíproco ser decorrente de um processo de coalescência.

Espécie provável	Espécie próxima	Dist. Intra	Dist. Inter	Intra/Inter	P ID (strict)	P ID(Liberal)	Av (MRCA)	P de Rosenberg
<i>E. macconnelli</i>	<i>Euryoryzomys</i> sp. 3	4,41	6,47	0,68	0,73 (0,66 - 0,80)	0,92 (0,88 - 0,96)	3,07	9,50E-06
<i>Euryoryzomys</i> sp. 3	<i>E. macconnelli</i>	2,6	6,47	0,4	0,66 (0,54 - 0,79)	0,90 (0,80 - 1,0)	1,4	9,50E-06
<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	<i>E. legatus</i>	2	5	0,4	0,60 (0,45 - 0,74)	0,86 (0,75 - 0,97)	1	2,30E-04
<i>E. legatus</i>	<i>Euryoryzomys</i> sp. SB	2	5	0,4	0,60 (0,45 - 0,74)	0,86 (0,75 - 0,97)	1	1,98E-03
<i>Euryoryzomys</i> sp. 2	<i>E. legatus</i>	3,2	5	0,64	0,50 (0,38 - 0,63)	0,80 (0,70 - 0,94)	2	1,98E-03
<i>E. emmonsae</i>	<i>Euryoryzomys</i> sp.1	2	4,22	0,47	0,55 (0,40 - 0,69)	0,83 (0,72 - 0,94)	1	2,30E-04
<i>Euryoryzomys</i> sp. 1	<i>E. emmonsae</i>	2,39	4,22	0,57	0,70 (0,62 - 0,79)	0,91 (0,85 - 0,96)	1,22	2,30E-04
<i>E. russatus</i>	<i>E. emmonsae</i>	4,44	6,99	0,64	0,80 (0,74 - 0,85)	0,95 (0,92 - 0,98)	2,99	2,80E-26

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, K.F.; BALL, S.L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. **Philosophical Transaction R Society B**, v. 360, n. 1, p. 1813–1823, 2005.
- BARBOSA, L.M. Filogenia e identificação de roedores Sigmodontinae através de marcadores moleculares: avaliação do código de barras de DNA. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- BONVICINO, C. R.; GONÇALVES, P. R.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. F. B.; MATTEVI, M. S. Divergence in *Zygodontomys* (Rodentia: Sigmodontinae) and distribution of amazonian savanas. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 3, p.322-328, 2009.
- BRADLEY, R.D.; BAKER, R.J. A test of genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 960-973, 2001.
- CLARE, E. L.; LIM, B. K; ENGSTROM, M. D; EGER, J. L; HEBERT, P. D. N. Barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 184-190, 2007.
- DESALLE, R.; EGAN, M.G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species, delimitation and DNA barcoding. **Philosophy Transaction R. Society B**, v. 360, n. 1, p. 1905–1916, 2005
- EBACH, M. C.; HOLDREGE, C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. **Nature**, v. 434, n. 1, p. 697, 2005
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 8, n. 1, p. 727-736, 2008.
- GARDNER, A.L.; PATTON, J.L. Karyotypic variation in Oryzomyini rodents (Cricetidae) with comments on chromosomal evolution in the neotropicalcricetinae complex. **Occasional Pappers of the Lousiana State University Museum of Zoology**, v. 49, n.1, p. 1-48, 1976.
- GONÇALVES, P.F.M. O potencial do DNA barcode na identificação de aves neotropicais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G.A.C.; HEBERT, P.D.N.; HICKEY, D.A. DNA barcoding: how it complements, molecular phylogenetics, and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2007.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; deWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, n. 1, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcode reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.
- MATTEVI, M. S.; ANDRADES-MIRANDA, J. Estudos genéticos nos roedores da tribo Oryzomyine. In: THALES, R.O.; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A (eds). **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**. 1 ed. São Carlos: Suprema, 2006, 170 p.
- MASTERS, B. C.; FAN, V.; ROSS, H. A. Species delimitation – a geneious plugin for the exploration of species boundaries. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 154-157, 2011.
- MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding: promise and pitfalls. **PLOS Biology**, v. 2, n. 1, p. 1529-1531, 2004.
- MULLER, L.; GONÇALVES, G. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; MARINHO, J. R.; ALTHOFF, S. L.; TESTONI, A. F.; GONZÁLEZ, E. M.; FREITAS, T. R. DNA barcoding of Sigmodontinae rodents: identifying wildlife reservoirs of zoonoses. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p., 2013.
- MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D. Superfamily Muroidea. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (eds). **Mammals species of the world**. 3 ed. The Johns Hopkins University Press, 2005, p. 955-1186.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 244, n. 1, p. 1-306, 2000.
- QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; , VAN DER MARK, P.; , AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. O. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3 p. 539–542, 2012.
- ROSENBERG, N. A. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. **Evolution**, v. 61, n. 1, p. 317-323, 2007.

- RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 4, n. 1, p. 1026-1033, 2006.
- SILVA, M.J.J.; PERCEQUILLO, A.R.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Cytogenetics with systematic approach on a new *Oryzomys* species of *nitidus* group (Sigmodontinae, Rodentia) from Northeastern Brazil. **Caryologia**, v. 53, n. 3-4, p. 219-226, 2000
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 2731-2739, 2011.
- VILAÇA S. T.; LACERDA D. R.; SARI, E. H. R.; SANTOS F. R. Identificação baseada em DNA aplicada a espécies de *Thamnophilidae* (Passeriformes): primeiro barcodes de pássaros Neotropicais. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 1, p. 7-13, 2006.
- WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 1, p. 506-513, 1991.

*CAPÍTULO IV – FILOGEOGRAFIA DE
EURYORYZOMYS RUSSATUS (SIGMODONTINAE:
ORYZOMYINI): ESTRUTURA GENÉTICA E HISTÓRIA
DEMOGRÁFICA*

Abstract: *Euryoryzomys russatus* is a terrestrial rodent predominantly found in the Atlantic Forest (AF). Phylogeographic studies involving this species usually are performed using small samples which are restricted to a few localities. The evolutionary history of AF is extremely complex and it is difficult to access the processes involved in the diversification of its fauna and flora. This chapter aims to describe the genetic structure of *E. russatus* and investigated the likely processes involved in the pattern of diversification of the species. One hundred and twenty samples from 34 locations were used to reach the goals. The sequences obtained were aligned and used to phylogenetic reconstructions: Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference. The diversity measures were performed using 801 bp of cytochrome *b* (cyt-*b*). The analysis of molecular variance (AMOVA) was estimated in Arlequin version 3.5.1.2. *E. russatus* was recovered as a monophyletic species in all analyses (MP, MV, and IB). The seven lineages obtained were divided into four groups. For each group, diversity measures were calculated and all of them showed high haplotype diversity (H_d) and low nucleotide diversity (π). Haplotype 2 (H2) was shared by the groups A and D, and haplotype 19 (H19), was shared by B and D groups. Only group C did not show shared haplotypes. Tajima's D , Fu and Li, R_2 , and *raggedness* r values were significant for the total sample set, group A and group D showed low values that have been undergone some demographic disturbance and/or recent expansion. The graphs obtained for the distributions of nucleotide differences between pairs corroborated this information, and they also presented bimodal curves. The AMOVA results exhibited source of variation within groups (51 %) higher than that found between groups (2.9%) and among populations within groups (45%).

RESUMO: *Euryoryzomys russatus* é um roedor terrestre, encontrado em áreas de Mata Atlântica (MA). Estudos filogeográficos envolvendo a espécie, em geral, apresentam amostragem restrita a poucas localidades, muito distantes entre si. Esse capítulo tem como objetivo descrever a estrutura genética de *E. russatus* e investigar os prováveis processos envolvidos na diversificação da espécie. Foram utilizadas 120 amostras de 34 localidades. As sequências obtidas foram submetidas a análises filogenéticas de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. As medidas de diversidade foram realizadas somente para as amostras que possuíam sequências do *cyt-b*. A análise de variância molecular (AMOVA) foi estimada no programa Arlequin versão 3.5.1.2. *E. russatus* apareceu monofilética em todas as análises (MP, MV e IB). As sete linhagens obtidas foram divididas em quatro grupos. Para cada grupo, foram calculadas as medidas de diversidade e todos apresentaram elevada diversidade haplotípica (H_d) e baixa diversidade nucleotídica (π). Entre os grupos, o haplótipo 2 (H2) foi compartilhado pelos grupos A e D, e o H19, compartilhado entre os grupos B e D. Somente o Grupo C não compartilhou haplótipos com os demais. Os valores obtidos nos testes D de Tajima, índices de Fu e Li, R^2 de Rozas e r de *raggedness* foram significativos para o conjunto amostral total. Os grupo A e D apresentaram valores baixos para as medidas acima citadas, sendo esses dados compatíveis com populações que sofreram alguma perturbação demográfica e/ou expansão recente. Os gráficos obtidos para as distribuições de diferenças nucleotídicas entre os pares corroboraram essa informação e apresentaram curvas bimodais. Os resultados do AMOVA mostraram que a fonte de variação dentro dos grupos (51%) foi superior à encontrada entre os grupos (2,9%) e entre as populações dentro dos grupos (45%).

4.1 INTRODUÇÃO

Euryoryzomys russatus é um roedor terrestre, encontrado predominantemente em áreas de Mata Atlântica (MA), ao longo de planaltos, baixadas da costa desde o sul o Rio Grande do Norte chegando até o norte do Rio Grande do Sul, estendendo-se a sudeste do Paraguai (Weksler, 1996). Em geral, seus representantes apresentam corpo de tamanho médio com cerca de 60 gramas (Marinho 2004; Gonçalves *et al.*, 2009) e se alimentam principalmente de insetos, frutas e sementes (Emmons e Feer, 1990).

Estudos filogeográficos envolvendo a espécie apresentam, frequentemente, amostragem restrita a poucas localidades e, muitas vezes, com distâncias geográficas muito extensas, o que pode favorecer o reconhecimento de alguns padrões inexistentes. Miranda *et al.* (2007), por exemplo, com uma amostragem pequena e distâncias geográficas muito extensas sugerem a existência de estruturação genética ao longo da distribuição de *E. russatus* e recuperam três clados bem definidos, um ao norte, um no sudeste e outro ao sul da Mata Atlântica (MA).

Gonçalves *et al.* (2009), ao contrário, não encontraram a estruturação genética proposta anteriormente para a espécie, que apresentou diversidade haplotípica elevada e nucleotídica baixa. Os haplótipos apareceram, em sua maioria, compartilhados por espécimes de habitats diferentes, provenientes tanto de regiões mais altas quanto de regiões de baixas altitudes. Em geral, esse padrão tende a revelar hábitos de dispersão das espécies (Avise, 1989) e devem estar relacionados a eventos geográficos.

A MA é um bioma com relevo extremamente acidentado, cuja extensão original ocupava mais de 1.300.000 km² ao longo de toda a costa brasileira e hoje está reduzida a pouco mais de 10% da sua cobertura original (Ribeiro *et al.*, 2009).

Ao longo do Pleistoceno, principalmente, a MA sofreu intensa pressão nos períodos de mudanças climática (Carnaval *et al.*, 2009; Porto *et al.*, 2012) e, devido a essas mudanças, resultou em um bioma com histórico evolutivo complexo. Muitos autores concordam que foi nesse período que os principais eventos de especiação ocorreram, dando origem à diversidade que conhecemos atualmente (Patton *et al.*, 1999), entretanto um único

mecanismo é insuficiente para explicar a dimensão observada e é provável que nem todos operem da mesma forma para todos os taxóns.

Há muitas hipóteses que auxiliam na explicação dos padrões filogeográficos encontrados nas florestas tropicais e que podem ser divididas em modelos de evolução alopátricos e não alopátricos (Avice, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2005).

Os modelos alopátricos podem ser divididos em: barreiras de rios; isolamento por montanhas (Moreau, 1966) ou refúgios pleistocênicos (Haffer, 1969; Vanzolini e Willians, 1970). O primeiro sugere que a diversificação na MA teria ocorrido pelo efeito dos rios. Pellegrino *et al.* (2005), por exemplo, explicam a diversificação cariotípica de espécies de lagarto (*Gymnodactylus darwini*) como resultado da presença do Rio Doce, atuando como barreira para as duas espécies, que apresentam cariótipos distintos: uma ao norte e outra ao sul da MA.

Outros autores acreditam que processos orogênicos, ou seja, isolamento por montanhas teriam sido mais relevantes para a formação da biodiversidade do bioma e explicariam melhor a complexidade filogeográfica observada ao longo da extensão da MA (Silva e Straube, 1996; Cabanne *et al.*, 2007), entretanto os principais rios encontrados ao longo da MA coincidem com a formação de montanhas, sendo que isolamento por rios e montanhas podem ser equivalentes para alguns táxons na MA.

A hipótese dos refúgios, por outro lado, é amplamente invocada para explicar a ocorrência de áreas aparentemente mais estáveis e que apresentam variações genéticas elevadas, sendo chamadas de refúgios pleistocênicos. Essas áreas teriam abrigado as espécies em períodos de retrações e expansões sucessivas da MA durante o Pleistoceno, dessa forma teriam dado origem a diferenças genéticas acentuadas. Quando houve expansão florestal, as espécies sobreviventes já teriam acumulado diferenças o suficiente para serem chamadas de novas espécies, sendo esse um importante mecanismo proposto para explicar o elevado endemismo encontrado na MA. As áreas menos instáveis nos refúgios, por sua vez, corresponderiam às áreas que apresentam menor variação genética, sendo que essas teriam sofrido maiores fragmentações nos períodos de mudanças climáticas (Carnaval *et al.*, 2009).

A região sudeste corresponderia a um dos três principais centros de evolução da MA (Por *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2007) e, mais recentemente, foi apontada como um importante refúgio devido a sua alta riqueza de espécies e endemismo acentuado (Porto *et al.*, 2012).

Em todos esses modelos, a especiação ocorreria tanto por deriva genética, pois as linhagens estariam isoladas em populações de tamanhos variáveis, quanto por seleção natural (Lara *et al.*, 2005).

Modelos não-alopátricos explicariam as divergências em populações contínuas, como o modelo de gradiente ecológico que postula que a seleção atua ao longo de gradientes ambientais sem necessariamente isolar as linhagens de fluxo gênico (Lara *et al.*, 2005).

Todos esses fatores podem estar representados nas filogenias obtidas empregando marcadores moleculares. Casos que espécies que possuem gradientes ecológicos como principal fator de diversificação tendem a apresentar clados concordantes, mesmo que estes ocorram em biomas diferentes, além disso, pode ocorrer a presença de zonas de contato secundário (Moritz *et al.*, 2000). Em casos de refúgios, comumente encontrados em táxons endêmicos de MA, podem ocorrer linhagens parafiléticas, resultado de momentos vicariantes seguidos, também, de contato secundário (Avice, 2000; Moritz *et al.*, 2000).

O conhecimento sobre a estruturação genética populacional das espécies é uma ferramenta importante para a compreensão da história evolutiva e de perspectivas para a conservação (Patton *et al.*, 1996; Mittermeyer, 1999), entretanto, poucos estudos genéticos envolvendo espécies de roedores têm sido desenvolvidos.

O presente trabalho tem o objetivo de: (i) descrever a estrutura genética de *Euryoryzomys russatus*; (ii) investigar a ocorrência ou não de flutuações populacionais entre as possíveis populações; (iii) se forem detectadas flutuações, verificar o período em que ocorreram e de que forma influenciaram no padrão de dispersão da espécie; e (iv) discutir as suas implicações na conservação da fauna da MA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DE DNA, PCR, OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E ALINHAMENTO

Para o presente estudo, foram utilizados 120 amostras de 34 localidades e fragmentos de dois marcadores moleculares mitocondriais (cyt-*b* e coxI). Para o cyt-*b*, foram utilizadas 108 amostras, das quais 66 foram obtidas no presente estudo. Para o marcador coxI foram empregadas 78 amostras, das quais 68 foram obtidas neste trabalho (Tabela 4.1). O grupo externo foi composto por *E. emmonsae*, *E. lamia*, *E. legatus*, *E. macconnelli*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oecomys catherinae*, *Oecomys paricola*, *Hylaeamys megacephalus* e *Drymoreomys albimaculatus*.

A extração de DNA, reações de amplificação, purificação e sequenciamento foram executadas conforme subitem 2.1.1 do Capítulo 2

4.2.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências dos marcadores genéticos foram concatenadas no programa Sequence Matrix 1.7.8 (Vaidya *et al.*, 2010) com o objetivo de obter uma matriz final de 1423 pb. Essa matriz foi utilizada na construção de árvores.

Filogenéticas utilizando os métodos de Máxima Parcimônia (MP), no programa TNT (Goloboff *et al.*, 2003), Máxima Verossimilhança (MV), no programa Treefinder (Jobb, 2004) e Inferência Bayesiana (IB), no programa MrBayes 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). As amostras que não possuíam sequências para os dois genes foram tratadas como *missing-data*.

A árvore MP foi obtida por meio de uma busca heurística com adição randômica de sequências e o rearranjo de ramos bipartição e reconexão (TBR – *Treebisection and reconnection*) e os valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foram calculados a partir de 1.000 pseudo-réplicas e foram considerados somente os suportes acima de 50%. Em MV, o modelo evolutivo mais adequado aos dados foi o GTR+I+G obtido por meio do programa Treefinder e foram considerados somente os suportes acima de 70%. Para IB foram realizadas duas corridas simultâneas com quatro cadeias de Markov

cada uma. Para o *burnin* foi considerado um corte de 25% das gerações iniciais e somente os valores de suporte acima de 95% foram considerados.

4.2.3 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E ANÁLISES DEMOGRÁFICAS

As medidas de diversidade e os haplótipos foram realizados somente para as amostras que possuíam sequências do *cyt-b* (Tabela 4.2) e foram obtidos no programa DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009). Além das medidas para o conjunto total de amostras, também foram realizadas medidas para quatro conjuntos de subpopulações prováveis. A significância de cada índice foi calculada por meio de análises de coalescência com 10.000 réplicas.

A relação hierárquica dos haplótipos para a amostragem total foi obtida no programa Network 4.6.1.1 (www.fluxus-engineering.com), utilizando o algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) e a análise de variância molecular (AMOVA) foi estimada no programa Arlequin versão 3.5.1.2 (Excofier *et al.*, 2005) com o objetivo de investigar se as populações inferidas nas filogenias estavam estruturadas ou não.

As distribuições *mismatch* foram calculadas no programa DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A espécie *E. russatus* apareceu monofilética em todas as análises (MP, MV e IB), entretanto somente em MV foi possível observar a divisão em linhagens bem distintas e com suportes robustos, as demais apresentaram politomias ou baixos suportes para os agrupamentos. Para esse estudo, serão consideradas sete linhagens conforme observado na melhor árvore de MV representada na Figura 4.1.

A linhagem I (*bootstrap*=100; PP: 0.99) refere-se a indivíduos distribuídos desde a Bahia até São Paulo; linhagem II (*bootstrap*=83) refere-se aos indivíduos encontrados desde o sul de São Paulo (Ilha do Cardoso) até o norte do Rio Grande do Sul (Terra de Areia); linhagem III (*bootstrap*=100) está exclusivamente localizada no Rio Grande do Sul (nas cidades de Sapiranga e Osório); linhagem IV (*bootstrap*=60) ocorre nas regiões sudeste e sul de São

Paulo, atingindo o norte do Paraná; linhagem V (MP=96; *bootstrap*=100; PP=100), aparece situada exclusivamente no Paraná (cidade de Ortigueira) e as linhagens VI e VII referem-se a indivíduos presentes no Rio de Janeiro. Embora VI e VII (*bootstrap*= 88 e 100, respectivamente) estejam na mesma região, foram tratados na topologia como linhagens diferentes, em decorrência dos suportes obtidos em MV.

4.3.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E ANÁLISES DEMOGRÁFICAS

As sete linhagens obtidas foram divididas em quatro grupos (subpopulações), de acordo com a sua distribuição geográfica (Figuras 4.1 e 4.2): **Grupo A**: representado pelas amostras provenientes dos pontos um ao nove; **Grupo B**: representando desde o ponto 28 ao 32; **Grupo C**: 33 e 34 e **Grupo D**: representado pelos pontos 10 ao 27. Para cada grupo também foram calculadas as medidas de diversidade e todos apresentaram elevada diversidade haplotípica (H_d) e baixa diversidade nucleotídica (π) (Tabela 4.2).

Os haplótipos (H) das 103 amostras com sequência de *cyt-b* disponíveis apresentaram alta diversidade haplotípica ($H_d=0,921$) e diversidade nucleotídica baixa (0,01832) (Tabela 4.2). Dos 40 haplótipos obtidos, 33 são exclusivos e sete são amplamente compartilhados e pouco divergentes entre si, dando origem a uma estrutura em formato de “haltere” (Figura 4.3), compatível com a divisão do grupos, onde Grupo A (norte) está mais relacionado com os haplótipos encontrados no Grupo D, e grupos B e C estão mais relacionados ao Grupo D.

Entre os grupos, o haplótipo 2 (H2) é compartilhado pelo Grupo A e Grupo D, e o H19 é compartilhado entre os Grupos B e Grupo D. Somente o Grupo C não compartilhou haplótipos com os demais. Cerca de 90% dos haplótipos do Grupo A e C e 80% do Grupo B são exclusivos.

Em relação ao Grupo D, H2 e H18 são os haplótipos mais compartilhados internamente. Embora o H18 seja um haplótipo exclusivo do Grupo D, ele está presente em metade de suas localidades.

Os valores obtidos nos testes D de Tajima (D), índices de Fu e Li (D* e F*), R2 de Rozas e *r* de raggedness foram significativos para o conjunto amostral total, Grupo A e Grupo D, sendo D -1,01758, -1,29415 e -0,52202, respectivamente (Tabela 4.2). Embora os Grupos B e C apresentem valores

negativos para D, cabe ressaltar que o conjunto amostral é muito baixo. Já para D*, os valores obtidos foram de -2,25433, -1,51104 e -1,39460 (para os valores de p ver Tabela 4.2) e para F*, foram de -2,10114, -1,67648, -1,26982, respectivamente.

R² e r de *raggedness* apresentaram valores baixos para os três grupos acima citados, sendo esses dados compatíveis com populações que sofreram alguma perturbação demográfica e/ou expansão recente. Os gráficos obtidos para as distribuições de diferenças nucleotídicas entre os pares corroboraram essa informação e apresentaram curvas bimodais (Total e grupo C) e multimodais (Grupo A, B e D) (Figura 4.4).

Os resultados do AMOVA mostraram que a fonte de variação dentro dos grupos (51%) foi superior à encontrada entre os grupos (2,9%) e entre as populações dentro dos grupos (45%) e o índice de F_{sc} (0,47011) superou o de F_{ct} (0,02939), semelhante ao encontrado em populações não estruturadas (Tabela 4.3).

4.4 DISCUSSÃO

De acordo com a filogenia obtida, *E. russatus* ocuparia inicialmente a região sudeste da MA, possivelmente em regiões mais próximas ao litoral, e em decorrência de processos orogênicos (que teriam modificado a fisiogeografia principalmente nas regiões onde atualmente se encontram a Serra do Mar e a Serra dos Órgãos) e mudanças nas condições climáticas da região, teriam migrado para áreas mais centrais, em direção ao interior do Paraná e, posteriormente, chegando ao sul. Esse grupo teria se diversificado novamente, e uma população teria permanecido mais ao sul (Clado C) e outras teriam atingido o norte, em direção ao sul da Bahia.

Essa relação observada entre as linhagens I, II (Grupo B) e III (Grupo C) [Figura 4.1], na qual, teoricamente, não haveria uma barreira geográfica impedindo o fluxo gênico entre as populações, corresponde a um clado muito semelhante encontrado em Miranda *et al.* (2007) para *E. russatus*, e pode ser decorrente de processos de flutuações no nível dos oceanos que teriam ocorrido nos períodos interglaciais, no Pleistoceno, fazendo com que as

populações migrassem para o interior do continente e posteriormente sofressem expansão para outras áreas (Miranda *et al.* 2007).

Esses sucessivos eventos de retração e expansão das populações resultaram nos valores obtidos na Tabela 4.2, onde as curvas multimodais e os baixos valores de r , R^2 e D , indicam ter havido uma perturbação populacional seguida de expansão recente.

Em geral, baixos valores de r associados a gráficos de *mismatch* com curvas unimodais tendem a descrever populações em expansão, e altos valores de r com gráficos de curvas bimodais ou multimodais tendem a descrever populações estáveis. Entretanto, curvas multimodais podem ocorrer em casos de expansão populacional, pois essas populações estariam sujeitas a altas taxas de mutações ou teriam sofrido redução populacional histórica (Castoe *et al.*, 2007; Nunez *et al.*, 2011).

Os haplótipos encontrados ao norte (Grupo A) não estão associados aos encontrados ao Sul (Grupo C, linhagem III) e aparecem, em sua maioria, isolados dos haplótipos dos Grupos B e C; entretanto, esses haplótipos aparecem em alguns indivíduos da população D. A mesma situação acontece com os haplótipos do Grupo B, que estão associados aos haplótipos do grupo D.

O modelo de refúgios proposto por Porto *et al.* (2012), que incorpora três cenários climáticos diferentes, é compatível com esses dados e explica o isolamento do Grupo A ao norte da Mata Atlântica, pois mostra a mesma região ocupada pelo grupo A na Figura 4.2 como o local de sobreposição dos modelos climáticos, corroborando que essa região foi uma área de refúgio importante para a espécie. O modelo explica também a ocorrência de haplótipos exclusivos encontrados para o Grupo C, no norte do Rio Grande do Sul, podendo essas populações terem sido isoladas em períodos de glaciações pleistocênicas.

A diversidade de haplótipos encontrada no grupo D pode ter sido mantida principalmente pela formação de cadeias montanhosas, localizadas ao sul do Rio Paraíba, compostas pela Serra do Mar e pela Serra dos Órgãos, que criaram um ambiente favorável à diversificação (Por *et al.*, 2005). Além disso, essa área é compatível com a proposta em Porto *et al.* (2012) como um importante refúgio para a espécie *E. russatus*.

O padrão encontrado para a rede de haplótipos é compatível com populações em expansão. A alta H_d e baixa π sugerem que a população seja composta por muitos haplótipos relacionados (Gonçalves *et al.*, 2009) e teriam surgido por um evento de divergência muito rápido decorrente de fatores demográficos/ históricos. Isso também pode ser corroborado pela estrutura das filogenias que, em geral, apresentam suportes baixos associados a politomias e ramos curtos, conforme demonstrado na Figura 4.1. O mesmo foi observado para *Oligoryzomys nigripes*, espécie para a qual amostras ao longo da MA foram estudadas e não foi observada estruturação populacional.

Foi possível observar que as populações de *E. russatus* não estão estruturadas, pois a variação encontrada dentro dos grupos é muito maior do que entre os grupos e a diferenciação encontrada entre os grupos A e C em relação aos demais deve ser decorrente de um processo de distanciamento geográfico (Gonçalves *et al.*, 2009), no qual populações mais próximas tendem a ser geneticamente similares do que as que estão mais distantes (Paresque, 2010). Esses resultados auxiliam na compreensão da dinâmica da distribuição das espécies e são ferramentas importantes na área de gestão ambiental (Patton *et al.*, 1996; Moritz, *et al.*, 2000).

Provavelmente, *E. russatus* não responde a modelos de diversificação baseados em rios ou montanhas, como ocorre para outros grupos de animais (Pellegrino *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2012), e parece estar mais associada a eventos vicariantes recentes e isolamento por distância relacionados à dinâmica da MA (Ditchfield, 2000). Isso já havia sido evidenciado por Gonçalves *et al.* (2009), que não encontraram estruturação populacional ao longo de um gradiente altitudinal para *Euryoryzomys russatus*. Entretanto, não deve ser um fenômeno generalizado para todos os roedores, uma vez que pode ocorrer em alguns casos, por exemplo, *Delomys collinus* (Bonvicino e Geise, 1995) e *Blarinomys* (Ventura *et al.*, 2012).

Refúgios pleistocênicos podem ter sido fatores importantes que isolaram as populações nos períodos de retração da MA, mas quando esses fragmentos voltaram a ter contato, as populações não estavam totalmente isoladas e se expadiram, diversificando sob influência principalmente de gradientes ecológicos.

O intenso desmatamento na região compromete o entendimento da dinâmica do bioma em relação aos processos de diversificação das espécies, uma vez que a destruição de habitats pode apagar assinaturas desses processos históricos e, exatamente em decorrência da perda de biodiversidade ocasionada pela ação antrópica, medidas enérgicas de conservação são fundamentais para preservação do que resta da Mata Atlântica e sua composição de fauna e flora.

4.5 CONCLUSÃO

A presença dos rios parece não exercer influência significativa no processo de diversificação de *E. russatus*. Efeitos orogênicos, por outro lado, parecem ter influenciado significativamente. Os ciclos de expansão e retração do nível dos oceanos, bem como eventos que alteraram a composição vegetal no pleistoceno, podem ser responsáveis pelo complexo padrão observado para esse grupo. É possível observar, entretanto, que o principal processo responsável pela diversificação da espécie no bioma tenha sido o isolamento por distância, pois não há diferenciação genética entre as linhagens mais próximas, enquanto que os extremos da distribuição são as responsáveis pelas maiores distâncias genéticas observadas.

A área ocupada pelo grupo D deve ter sido colonizada várias vezes e por mais de uma linhagem, o que justificaria o compartilhamento de haplótipos observado.

Devido à diversidade genética encontrada nessa área e ao fato de ser uma área semelhante às encontradas em análises de outras espécies, pode-se concluir que é uma área cujos esforços de conservação devem ser mais intensos.

Tabela 4.1 - Amostras de *Euryoryzomys russatus* utilizadas nas análises. *Voucher* da amostra; nº *GenBank* (quando houver), localidade, nº da localidade no mapa da Figura 4.2 (P), latitude, longitude, *cyt-b* e *coxI* quando disponíveis.

AMOSTRA	LOCALIDADES	P	LATITUDE	LONGITUDE	CYT-B	COX I
AL3466/ AF181271 ^A	Fazenda Aldeia, Valença, BA	1	-13.36	-39.08	X	
CIT1594 (ST231)	Serra do Teimoso Jussari BA	2	-15,2	-39,53	X	
RM 57 ^A	Fazenda Jueirana, 28 km de Una, BA	3	- 21.95	-42.01	X	
RM 58 ^A					X	
RM 84 ^A					X	
LC 27 ^A	Fazenda Santa Terezinha, Linhares, ES	4	-19.13	-39.95	X	
LC 30 ^A					X	
LC 31 ^A					X	
UFPB 372/ EF455024 ^{**}	Monte Verde, ES	5	-19.88	-41.95	X	
UFPB 381/ EF455025 ^{**}					X	
LG 101 ^A	Centro de Primatologia, Magé, RJ	7	-22.58	-42.83	X	
ORG 41 ^A	Garrafão Magé, RJ	9	-22.65	-43.03	X	
EDH 40 ^A	Parque Estadual do Desengano, Santa Maria Madalena, RJ	6	-21.95	-42.01	X	
EDH 42 ^A					X	
ML 94 ^A					X	
ML 95 ^A					X	
ORG67 ^A	Guapimirim, RJ	8			X	
LP32 ^A	Vila Dois Rios, Angra dos Reis, RJ	10	-23.15	-44.23	X	
EBB 3 ^A					X	
LG153 ^A					X	
M224	Bertioga, SP	16	-23.85	-46.15	X	X
UNIBAN 2022/ CIT1748	Biritiba-Mirim, SP	15	-23.58	-46.03	X	X

AMOSTRA	LOCALIDADES	P	LATITUDE	LONGITUDE	CYT-B	COX/
UNIBAN 2040/ CIT1755	Biritiba-Mirim, SP	15	-23.58	-46.03		X
BS 499	Caucaia do Alto, SP	19	-23.68	-47.03	X	X
MAM 105 ^A	Estação Biológica Boracéia, Biritiba-Mirim, SP	14	-23.65	-45.9	X	
MAM 458 ^A					X	
ML 49 ^A	São Sebastião, SP	13	23.41	-45.11	X	
MAM 61 ^A					X	
MAM 62 ^A					X	
ML 48/ AF251523 ^A					X	
MAM 3 ^A	Fazenda Intervalles, Base do Carmo, Capão Bonito, SP	24	-24.33	-48.41	X	
MAM 9 ^A					X	
MAM 12					X	
CIT 77					X	X
CIT 78					X	X
G 034					X	X
CIT126					X	X
CIT 128					X	X
CIT 9					X	X
ROD 129	Ilha do Cardoso, SP	27	-25.14	-48.01	X	X
ROD 130					X	X
ROD 132					X	X
ROD 133					X	X
ROD 134					X	X
ROD 146					X	X
ROD 147					X	X
ROD 148					X	X
ROD 149					X	X

AMOSTRA	LOCALIDADES	P	LATITUDE	LONGITUDE	CYT-B	COX/
ROD 151	Ilha do Cardoso, SP	27	-25.14	-48.01	X	X
ROD 159					X	X
ROD307					X	X
ITM 0357	Jquitiba, SP	21	-23.92	-47.07	X	X
ITM 0359					X	X
ITM 0360					X	X
ROD306					X	X
ROD 139	Parque Estadual Albert Löefgreen, São Paulo, SP	17	-23.46	-46.63	X	X
ROD 262	Parque Estadual Carlos Botelho, Sete Barras, SP	23	-24.13	-47.94	X	X
ROD 263					X	X
ROD 279					X	X
ROD 261					X	X
ROD198					X	X
AC194	PESM, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, SP	11			X	X
NSV 1 ^A	PESM, Núcleo Santa Virgínia, 10 km, Ubatuba, SP	12	-23.35	-45.12	X	
NSV 16 ^A			-23.35	-45.12	X	
ROD 05			-23.35	-45.12	X	X
ROD 12			-23.35	-45.12	X	X
ROD 30			-23.35	-45.12	X	X
ROD 40			23.35	-45.12	X	X
ROD104			-23.35	-45.12	X	X
ROD 106			-23.35	-45.12	X	X
ROD 107			-23.35	-45.12	X	X
ROD 108			-23.35	-45.12	X	
M 08	Piedade, SP	20	-23.71	-47	X	X
ITM 0256					X	X

AMOSTRA	LOCALIDADES	P	LATITUDE	LONGITUDE	CYT-B	COX/
CRS 082	Pilar do Sul, SP	22	-23.81	-47.7	X	X
CRS 151					X	X
CRS 179					X	X
ITM 0008	São Bernardo do Campo, SP	18	-23.7	-46.55	X	X
ITM0011					X	X
ITM 0016					X	X
ITM 0019					X	X
ITM 0034					X	X
ITM 0073					X	X
ITM 0089						X
ITM 0090					X	X
ITM 0154					X	X
IIM303	Wenceslau Brás, PR	25	-23.85	-49.80	X	X
IIM336					X	X
IIM300					X	X
IIM233					X	X
IIM298					X	X
IIM076	Ortigueira, PR	26	-24. 20	-50.91	X	X
IIM130					X	X
IIM131					X	X
IIM161					X	X
IIM134					X	X
IIM137					X	X
IIM138					X	
IIM142					X	X
IIM156					X	X

AMOSTRA	LOCALIDADES	P	LATITUDE	LONGITUDE	CYT-B	COX/
JR299**	Blumenau SC (29)	29	-26,91	-49,06		X
JR297**						X
JR298**						X
9954**						X
9409**						X
9695**						X
9994**						X
MN37798/ EF455019**	Florianópolis, SC	30	-27.55	-48.56	X	
YL229 ^A	Itapoá, SC	28			X	
YL228 ^A					X	
MN37808/ EF455023**	Osório, RS	34	-29.90	-50.26	X	
MN37810 DQ826028**					X	
LF484/ EF455018**	Sapiranga, RS	33	-29.63	-51	X	
MN37799/ EF455020**					X	
MN37802/ EF455021**	Tainhas, RS	31	-29.26	-50.30	X	
MN37803/ EF455022**					X	
JR205**	Terra de Areia, RS	32	-29,59	-50,12		X
JR208**						X
JR194**						X
JR281**						X
120 amostras	34 localidades				108/66	78/77

A – Amostras cedidas pelo prof. Dr. James Patton, Universidade da Califórnia, Berkeley.

** Amostras extraídas no *GenBank*

Figura 4.1 - Melhor árvore obtida no programa Treefinder. Os números referem-se aos suportes obtidos de MP, ML e IB, respectivamente. O traço representa suportes inferiores a 50% ou ausentes. A árvore está dividida em sete clados, delimitados pela barra lateral, e foram subdivididos em quatro grupos representados pelas cores dos táxons: laranja: Grupo A; azul: Grupo B; verde: Grupo C e preto: Grupo D. Esses grupos podem ser visualizados na Figura 4.2. Seta vermelha indica os suportes obtidos para a espécie *E. russatus*.

Figura 4. 2 - Mapa com a distribuição dos pontos amostrados de acordo com a Tabela 4.1. As sete linhagens obtidas na Figura 4.1 estão representadas conforme a legenda. As elipses apresentam os grupos testados nas análises populacionais. Elipse marrom: grupo A; roxo: grupo B; amarelo: grupo C; e B vinho: grupo D; Barra preta sobre os pontos do grupo D representa as Serra do Mar e Serra dos Órgãos, principais elementos do relevo na região; as barras azuis correspondem aos principais rios ao longo do bioma. A área em verde representa o bioma Mata Atlântica

Figura 4.3 - Rede de haplótipos para 103 amostras do marcador *cyt-b* construída a partir do critério de Median-Joining (Network 4.6.1). A área do círculo representa a frequência dos haplótipos e os traços se referem aos passos mutacionais entre os haplótipos.

Tabela 4.2 - Índices de diversidade estimados para a amostra total e agrupamentos (A; B; C e D) de haplótipos obtidos nas análises de MV e rede de haplótipos. N° de sequências utilizadas, número de sítios segregantes (S), Diversidade nucleotídica (π), Diversidade Haplótica (Hd), D de Tajima (D), D* de Fu & Li (D*), F* de Fu & Li (F*), R2 de Rozas (R2), r de *raggedness* (r). * e ** significativos estatisticamente para $P > 0,10$ e $0,10 > P > 0,05$, respectivamente.

GRUPO	Nº DE SEQUÊNCIAS	S	π	H	Hd	D	D*	F*	R2	r
Total	103	46	0,01832	40	0,921	-1,01758*	-2,25433*	-2,10114**	0,0650	0,0100
A	17	27	0,00857	11	0,926	-1,29415*	-1,51104*	-1,67648**	0,0863	0,0431
B	5	9	0,00610	5	1,100	-0,52640	-0,52640	-0,55338	0,1315	0,2400
C	4	5	0,00312	3	0,833	-0,79684	-0,79684	-0,75299	0,3279	0,3056
D	77	34	0,01695	26	0,898	-0,52202*	-1,39460*	-1,26982**	0,0818	0,0153

Tabela 4.3 - Análises de variância molecular (AMOVA) por locus baseadas no fragmento do gene para o cyt-b para as populações definidas na Figura 4.1. Valores significativos estatisticamente para $P \leq 0,02$.

Fonte da Variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Variação (%)	Índice de Fixação
Entre os grupos	146.343	0.68800	2.94	0,02939
Entre as populações dentro dos grupos	1316.233	10.68258	45.63	0,47011
Dentro dos grupos	758.587	12.04106	51.43	0,48568

Figura 4 4 - Gráficos com diferenças nucleotídicas par a par esperada e observada. Total de 103 amostras para o cyt-b. Os grupos estão definidos na Figura 4.2. Linha contínua: frequência esperada; linha tracejada: frequência observada.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J. C. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. **Evolution**, v. 43, n. 6, p. 1192-1208, 1989.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BONVICINO, C. R.; GEISE, L. Taxonomic status of *Delomys dorsalis collinus* Thomas, 1917 (Rodentia: Cricetidae) and description of a new karyotype. **Mammalian Biology**, v. 60, n. 1, p. 124-127, 1995.
- CABANNE, G. B.; SANTOS, F.; MIYAKI, C. A. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes: Dendrocolapitidae): vicariance and recente demographic expansion in souther Atlantic forest. . **Biological Journal of Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 73-84, 2007.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 1, p. 785-789, 2009.
- CASTOE, T. A.; SPENCER, C. L.; PARKINSON, C. L.; Phylogeographic structure and historical demography of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): A perspective on North American desert biogeography. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v.41, n. 1, p. 193-212, 2007.
- DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant mammals. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 1, p. 1307-1318, 2000.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- EMMONS, L.E.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals. A field guide.** 2 ed. Chicago: University of Chicago, 1997, 184 p.
- EXCOFFIER, A.; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, n. 1, p. 47-50, 2005.
- FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I

- from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. T.N.T.: Tree analysis using new technology. Program and documentation, available from the authors, and at www.zmuc.dk/public/phylogeny, 2003.
- GONÇALVES, G. L.; MARINHO, J. R.; FREITAS, T. R. O. Genetic structure of Sigmodontinae rodents (Cricetidae) along na altitudinal gradiente of the Atlantic Rain Forest in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 882-885, 2009.
- GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and islands colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 1, p. 3969-3982, 2006.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131-137, 1969.
- JOB, G.; von Haeseler, A.; Strimmer, K. Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 1, p. 18, 2004.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DNAsp v.5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 1, p. 1451-1452, 2009.
- MARINHO, J. R. Estudo da comunidade e do fluxo gênico de roedores silvestres em um gradiente altitudinal de Mata Atlântica na área de influência da RST-453/RS-456 Rota do Sol. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- MIRANDA, G. B.; ANDRADES-MIRANDA, J.; OLIVEIRA, L. F. B.; LANGGUTH, A.; MATTEVI, M. S. Geographic patterns of genetic variation and conservation consequences in three south American rodents. **Biochemical Genetics**, v. 45, n. 1, p. 839-856, 2007.
- MOREAU, R.E. **The bird faunas of Africa and its islands**. Londres: Academic Press, 1966, 424 p.
- MORITZ, C.; PATTON, J. L.; SCHNEIDER, C. J. SMITH, T. B. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 31, n. 1, p. 533-363, 2000.
- NUNEZ, J. J.; WOOD, N. K.; RABANAL, F. E.; FONTANELLA, F. M.; SITES Jr., J. W. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugial and post-glacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). **Molecular Phylogenetics Evolution**, v.58, n. 2, p. 343-352, 2011.

- PARESQUE, R. Diversificação das espécies de *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia: Cricetidae) na região Neotropical. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 1, p. 229-238, 1996.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 244, n. 1, p. 1-306, 2000.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, T. M.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y. Y.; SITES, J. K. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13-26, 2005.
- POR, F. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., NETO, F.L. **Biomes of Brazil: an illustrated natural history**. Pensoft Publishers, Sofia, 2005.
- PORTO, T. J. CARNAVAL, A. C; ROCHA, P. L. B. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. **Diversity and Distributions**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2012.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for the conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RONQUIST, E.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1572-1574, 2003.
- SMITH, M.F.; PATTON, J.L. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome-*b*. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 6, n. 1, p. 89-128, 1999.
- SILVA, J. M. C.; STRAUBE, F. C.; Systematics and biogeography of scaled Woodcreepers (Aves: Dendrocolapidae). **Studies in Neotropical Fauna and Environments**, v. 31, n. 1, p. 3-10, 1996.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 2731-2739, 2011.

- VAIDYA, G.; LOHMAN, D. J.; MEIER, R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 1, p. 171-180, 2011.
- VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E. E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia São Paulo**, v. 19, p.1-298, 1970.
- VENTURA, K.; SATO-KUWABARA, Y.; FAGUNDES, V.; GEISE, L.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SILVA, M. J. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Phylogeographic structure and karyotypic diversity of the brazilian shrew mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 138, n, 1, p. 19-30, 2012.
- WEKSLER, M. Revisão sistemática do grupo de espécies *nitidus* do gênero *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

RESUMO GERAL

Euryoryzomys, anteriormente reconhecido como *Oryzomys* do grupo *nitidus*, compreende um conjunto de sete espécies: *E. emmonsae*, *E. lamia*, *E. legatus*, *E. macconnelli*, *E. nitidus*, *E. russatus* e *Euryoryzomys* sp. SB (espécie reconhecida para o grupo com base em dados cariotípicos, porém ainda não descrita formalmente). Essas espécies estão distribuídas em regiões de elevada a baixa altitude, ocorrendo em zonas tropicais andinas, até as demais planícies. Com exceção de *E. legatus*, todas as outras espécies ocorrem no Brasil. Morfologicamente, os representantes desse gênero apresentam características semelhantes entre si, o que dificulta sua precisa identificação. Acredita-se que o número de espécies para o gênero esteja subestimado e, além disso, as relações entre as espécies permanecem pouco esclarecidas. Este trabalho teve como objetivo realizar estudos filogenéticos e filogeográficos em roedores do gênero *Euryoryzomys*, bem como avaliar o potencial do DNA *barcoding* na identificação de suas espécies. Para isso, foram utilizados os marcadores moleculares *cyt-b*, *coxI* e *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP), cujas análises enfocaram três perspectivas: sistemática molecular e as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Euryoryzomys*; teste de DNA *barcoding* na delimitação das espécies e filogeografia de *E. russatus*. O capítulo um traz uma revisão sobre a sistemática de roedores desde o nível de ordem até o gênero *Euryoryzomys*; o segundo capítulo abordou as relações filogenéticas entre as espécies de roedores do gênero *Euryoryzomys* e os padrões de diversificação, utilizando sequências dos genes mitocondriais (*cyt-b*, *coxI*) e um nuclear IRBP. Os resultados evidenciaram que o gênero possui uma diversificação complexa devido à extensão geográfica que ocupa, e, além disso, está com sua diversidade subestimada - principalmente no bioma amazônico. É possível apontar para a ocorrência de pelo menos dois clados candidatos a novas espécies: *Euryoryzomys* sp. 1 (subclado de *E. emmonsae*); e *Euryoryzomys* sp. 2, originalmente descrita como espécimes pertencentes a *E. nitidus*. O terceiro capítulo investigou o potencial das sequências parciais do gene *coxI* na identificação das espécies do gênero *Euryoryzomys*, por meio das estimativas de variabilidade intra e interespecíficas e também apontou diversidade subestimada do gênero, sendo possível observar, neste trabalho, a ocorrência de pelo menos oito espécies: *Euryoryzomys* sp. 3

(espécie irmã de *E. macconnelli*), *E. macconnelli*, *Euryoryzomys* sp. 1, *E. emmonsae*, *Euryoryzomys* sp. 2, *E. legatus*, *Euryoryzomys* sp. SB e *E. russatus*, além de *E. lamia* e *E. nitidus*, que não compuseram a amostra do capítulo, totalizando 10 espécies para o gênero. Além disso, o método possibilitou a separação de espécies com números diplóides distintos, o que futuramente pode contribuir na identificação de amostras desconhecidas, provenientes principalmente da Amazônia. No quarto capítulo, foi realizado um estudo filogeográfico da espécie *Euryoryzomys russatus* e com o objetivo de investigar a sua diversidade genética ao longo da Mata Atlântica. Foi possível concluir que o principal processo responsável pela separação de linhagens de *E. russatus* pode ter sido isolamento por distância e que as linhagens estão separadas ao longo da MA principalmente em quatro grupos, sem entretanto, apresentam estruturação genética entre eles; o primeiro (grupo A) está restrito às regiões do RJ, ES e BA; o segundo (grupo B) entre PR, SC e norte do RS; o terceiro (grupo C) no RS; e o quarto (grupo D), ao longo de SP, RJ e PR. O intenso desmatamento na região compromete o entendimento da dinâmica do bioma em relação aos processos de diversificação das espécies, uma vez que a destruição de habitats pode apagar assinaturas desses processos históricos. Dessa forma, medidas eficazes de conservação são necessárias.

ABSTRACT

Euryoryzomys, previously recognized as *Oryzomys nitidus* group, heretofore comprises seven species: *E. emmonsae*, *E. lamia*, *E. legatus*, *E. macconnelli*, *E. nitidus*, *E. russatus*, and *Euryoryzomys* sp. (with $2n=76$, recognized for the group based on karyotypic data, but it is not formally described until now). These species are widespread in Neotropics, occupying regions of high to low altitudes, including Andean areas and subtropical plains. Except for *E. legatus*, all the other species occur in Brazil. Morphologically, the representatives of this genus share similar traits difficulting accurate identification. The aim of this study is to conduct molecular studies based on molecular systematics and phylogenetic inferences, investigate the potential of DNA barcoding in order to test the delimitation of the species of the genus *Euryoryzomys*, and also to develop phylogeographic studies in *E. russatus*, a species widespread in the Atlantic Forest. Based on this purpose, the present work encompasses four chapters: Chapter 1 contains a revision concerning the systematic position of the genus *Euryoryzomys*; Chapter 2 shows the investigation concerning phylogenetic relationships among species of the genus, and also inferences regarding patterns of diversification are discussed, using *cyt-b*, *IRBP*, and *coxI* sequences. According to these approaches the genus has a complex pattern of diversification due to its geographic distribution, moreover its diversity is underestimated, especially in the Amazon biome. We could point out at least two candidate clades as new species: *Euryoryzomys* sp. 1 (a subclade of *E. emmonsae* clade) and *Euryoryzomys* sp. 2, previously described as specimens belonging to *E. nitidus*. Chapter 3 investigates the potential of a partial sequence of the *coxI* for identification of the species of *Euryoryzomys*, and estimates intra- and interspecific variability, which revealed, once again, that the number of species is underestimated. At least eight species could be pointed out in this study: *Euryoryzomys* sp. 1, *E. emmonsae*, *Euryoryzomys* sp. 2, *E. macconnelli*, *Euryoryzomys* sp. 3 (sister species of *E. macconnelli*), *E. legatus*, *Euryoryzomys* sp. SB, and *E. russatus* (plus *E. nitidus* and *E. lamia* - not included in the analyses – and therefore resulting in at least 10 species for the genus). Moreover, the method was able to separate species with different diploid numbers, which can further contribute to the identification of unknown samples. Chapter 4 investigates the phylogeography of *E. russatus*, and also describes its genetic diversity over the Atlantic Forest (AF). The

hypothesis of isolation by distance could be the main process responsible for the split of the lineages of *E. russatus* which were separated along the AF into four main groups: group A restricted to regions RJ, ES, and BA; group B encompasses PR, SC and northern of RS; group C composed of representatives from RS; and group D related to animals from SP, RJ, and PR. The massive deforestation in the Atlantic Forest undertakes the understanding concerning the dynamics of the biome and in relation to the processes of species diversification, since the destruction these historical processes, thus effective conservation measures are needed.

A.1 Protocolos utilizados para extração de DNA

Todas as amostras foram submetidas ao método de extração por *Chelex*. Trata-se de resina, cujo método original foi descrito para extração de DNA em material forense, por isso está baseado na utilização de uma quantidade muito reduzida de material biológico.

Preparação do *Chelex*

Para a preparação do *Chelex* 5%, foi realizado o seguinte procedimento:

- I. Pesar 2,25 g de *Chelex* em tubo Falcon de 50 mL;
- II. Adicionar água milli-Q até atingir 45 mL;
- III. Aliquotar 500µL da solução *Chelex* 5% em tubos do tipo *ependorf* (1,5 mL).
- IV. Os tubos devem permanecer estocados a 4°C.

Extração de DNA com *Chelex* 5%

O seguinte procedimento foi seguindo para a extração do DNA:

PRIMEIRA ETAPA:

- I. Separar uma lista com o material do qual foi extraído o DNA.
- II. Separar a quantidade de tubos com *Chelex* 5% necessários para extrair DNA das amostras selecionadas, incluindo mais dois tubos para controle
- III. Numerar tubos contendo *Chelex* 5% de acordo com os números do material preparado na lista do item 1.
- IV. Separar uma quantidade mínima do tecido de interesse com auxílio de pinça e estilete e depositá-lo no respectivo *ependorf* com *Chelex* 5%.
- V. Entre a retirada de um material e outro, os instrumentos foram lavados em álcool e passados na chama do bico de Bunsen para esterilizá-los.

VI. Adicionar 10 μ L de proteinase K (20mg/mL) em cada tubo.

VII. Manter os tubos por 12 horas em estufa a 56°C em uma plataforma com agitador.

SEGUNDA ETAPA:

I. Preparar novos tubos do tipo *ependorf* 1,5 mL para receber o DNA extraído que será armazenado.

II. Retirar os tubos da estufa e agitá-los no vórtex por aproximadamente 15 segundos

III. Aquecê-los em banho-seco entre 95 e 100° C por 15 minutos.

IV. Agitar novamente os tubos no vórtex por aproximadamente 15 segundos.

V. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos para sedimentar o *Chelex*.

VI. Retirar de 200 a 300 μ L de sobrenadante dos tubos que acabaram de ser centrifugados e transferir para cada tubo preparado no início dessa etapa.

VII. Fazer diluições 1:1 em novos tubos, identificando claramente a diluição feita.

Gel de Agarose 1% (em cuba de eletroforese pequena)

I. Pesar 0,3 g de agarose em um Erlenmeyer e adicionar 30 mL de solução tampão 1xTAE (procedimento para cubas pequena).

II. Montar o suporte da cuba.

III. Aquecer em forno microondas até toda agarose ficar dissolvida (cerca de 30 segundos em potência alta)

IV. Retirar o Erlenmeyer do microondas, homogeneizar gentilmente a solução e colocar mais 60 segundos em potência média baixa.

- V. Adicionar 0,5 μ L de GelRed (1000x - Uniscience), homogeneizar e aguardar a solidificação.
- VI. Aplicação das amostras no gel e avaliação da qualidade e concentração de DNA
- VII. Adicionar 2 μ L de *Blue Juice* (Invitrogen) em 0,5 μ L o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen Cat. No. 10068-013).
- VIII. Adicionar 2 μ L das amostras em 2 μ L *Blue Juice*;
- IX. Aplicar em cada poço do gel a solução contendo a amostra já misturada com o *Blue Juice*.

A corrida eletroforética foi realizada (em média) a 80 V, 150 mA, por cerca de 30 minutos.

Os resultados foram verificados em transiluminador ultravioleta e em seguida as imagens foram registradas no equipamento Alpha DigiDoc.

Após a obtenção da imagem, a concentração do DNA foi estimada a partir de comparação de cada amostra com as bandas geradas pelo marcador e as que apresentavam resultado satisfatório, cerca de 20ng/ μ L, foram encaminhadas para a reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras que possuíam mais de 20ng/ μ L foram diluídas e as que possuíam menos, foram submetidas a novas PCR's.

Todos os PCR foram realizados conforme o seguinte procedimento:

- I. Tubos para PCR (0,2 mL) foram separados de acordo com a quantidade de amostras de DNA somados a um controle positivo e outro negativo.
- II. Os reagentes e amostras de DNA, após retirados do freezer, foram mantidos no gelo, até o término do procedimento.
- III. Solução-mãe (Mix) da reação foi preparada sem as amostras de DNA em tubo adequado ao volume total e permaneceu mantida no gelo.
- IV. Adicionar a alíquota correspondente da enzima *Taq* DNA polimerase.

- V. A solução-mãe foi fracionada e distribuída nos tubos de PCR de acordo com o volume da reação correspondente.
- VI. O volume de DNA foi adicionado de acordo com o protocolo correspondente.
- VII. Um tubo somente com a solução-mãe também foi preparado para todas as reações, sendo este o controle negativo.
- VIII. As amostras foram colocadas no termociclador iniciando-se o programa correspondente ao fragmento de interesse.

Os fragmentos gerados por PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (item 2.2.3 deste capítulo) para averiguar se o tamanho dos fragmentos obtidos correspondia ao tamanho da banda esperada, quando comparados com as bandas de um marcador padrão (*Low DNA Mass Ladder* e 100bp, Invitrogen).

A.2 Protocolo para purificação e sequenciamento de fragmentos amplificados

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com as enzimas Exonuclease I de *E. coli* 20U/ μ L (EN0581) e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, 1U/ μ L (Ref. EN0511- FERMENTAS). Uma solução previamente realizada, foi diluída nas seguintes proporções: 1U de SAP/reação e 10U de Exo, portanto, 1 μ L de SAP e 0.5 μ L de Exo para a solução em uso.

Todos os tubos da PCR recebiam em média 3 μ L da solução Exo/SAP e em seguida eram submetidos a um novo ciclo de temperatura no termociclador: 37°C a 50 min, 80°C a 15 min.

Para verificar se os produtos de PCR eram purificados adequadamente, empregaram-se os procedimentos descritos acima no item 2.2.3. Os produtos que apresentaram resultados satisfatórios foram encaminhados para o sequenciamento na seguinte forma:

7,5 μL de volume total em um tubo de 1,5 ml sendo que 6 μL do volume total correspondiam ao produto purificado e mais 1,5 μL de cada oligonucleotídeo, sendo o último na concentração de 5 μM .

As reações de sequenciamento foram realizadas, utilizando-se o BigDye (DNA "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart, Applied Biosystems) e sequenciadas no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzes (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas no programa CodonCode Aligner.