

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

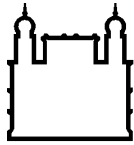
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE
DISTRIBUIÇÃO DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO
LESTE DA AMAZÔNIA E DO NORDESTE DO CERRADO

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES



Rio de Janeiro
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES

Estudos citogenéticos, filogenéticos e padrão de distribuição de *Makalata* (Rodentia: Echimyidae) do leste da Amazônia e do nordeste do cerrado

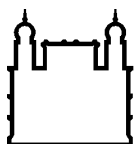
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde

Orientadora: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Co-orientadora: Dra. Ana Lazar Gomes e Souza

RIO DE JANEIRO

Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO
DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO LESTE DA AMAZÔNIA E DO
NORDESTE DO CERRADO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

CO-ORIENTADORA: Dra. Ana Lazar Gomes e Souza

Aprovada em: ____/____/____

Examinadores:

Prof. Dr. Marcelo Weksler (Museu Nacional) presidente

Prof. Dr. Leila Maria Pessôa (UFRJ)

Prof. Dr. Michel Barros Faria (UEMG)

Prof. Dr. Salvatore Siciliano (FIOCRUZ) suplente

Prof. Dr. Paulo Sérgio D'andrea (IOC / FIOCRUZ) suplente

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2016

Cópia da ata

À minha avó materna (*in memoriam*),
minha irmã Naina e
meus pais Nelma e Roberto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cibele Bonvicino, por ter aceitado me orientar, pelas oportunidades que me concedeu nestes dois anos, pela atenção, paciência e carinho maternal.

À minha co-orientadora Ana Lazar, pelo auxílio constante no decorrer de todo o trabalho.

Ao Dr. Héctor Seuáñez por me permitir frequentar e utilizar as dependências do laboratório do INCA, possibilitando a execução do projeto e grande aprendizado.

Ao Dr. François Catzeflis, Dr. João Alves e Dr. Michel Faria, pelas amostras gentilmente cedidas.

À Fiocruz por fornecer um campus amplo com pesquisadores e docentes experientes e receptivos, disciplinas esclarecedoras e pessoal técnico bem preparado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Jeiel Gabrir pelo auxílio na parte teórica, pela atenção, dedicação e apoio nas horas difíceis.

À Cintia Povill que me recebeu no laboratório desde o começo do mestrado com muito carinho, auxiliando na bancada, análises, trabalhos, aulas, campos... Parceira nas risadas e nas broncas, muito obrigada, Marmota.

Ao Cláudio Vieira que sempre de maneira jocosa, ajudou na bancada de citogenética, auxiliando com o microscópio e os bandeamentos.

À Camila Nacif pela ajuda com a citogenética e discussões, companheirismo e alegria contagiante.

Ao Diogo Lisbôa que me ajudou na bancada e nas análises inúmeras vezes.

Aos amigos Mirela D'arc, Sabrina Helmold e Sérgio Amaro pelo apoio na bancada, pelas inúmeras discussões e explicações genéticas regadas quase sempre à muito café, pelo apoio e incentivo, meu muito obrigada.

Ao Willian Tavares pelas ricas conversas sobre meu trabalho, pela ajuda com análises e com o texto.

Ao Dr. Miguel Moreira pelas discussões, explicações e soluções às questões que sempre apareciam.

Aos amigos do LABPMR e do INCA pelas discussões científicas e não científicas. Bom de ter dois laboratórios é poder conviver com pessoas de

especializações e visões diferentes. Aprendi muito! Em especial, com alunos da Cibele, pelas trocas de conhecimentos, convivência no dia a dia, seminários. Agradeço a todos pela paciência na reta final e colocações construtivas.

Aos amigos que ingressaram comigo no mestrado (Agostinho Pereira, Elizângela Feitosa, Fernanda Bittencourt, Karina Lopes e Jonathan Lopes), pelas trocas de experiências, apoio, pelos cafés, almoços e risadas.

Ao meus primos Sander e Marina Lacerda por me acolherem em sua casa desde os primeiros contatos no Rio de Janeiro, muito antes do mestrado.

Aos amigos Andreza Amaral e Marcus Antonius por me receberem durante minha estada na Paraíba, para congresso e visita à coleção da UFPB.

Aos amigos Régis Costa, Jorge Victor, Guilherme Fraenkel, Cintia Povill, Camila Nacif, Vanessa Mendonça, Renata Carneiro, Karina Rocha, Diego Ranzatto, Edegaro de Freitas, Eva Medeiros e Morgana Lima que muito me acolheram no Rio, dando o suporte nas horas difíceis, rindo nas horas alegres. O companheirismo de vocês foi fundamental nestes anos.

À minha família Nelma e Naina Lopes, e Roberto Jr pelo suporte financeiro, emocional e científico. Pela compreensão e apoio na minha busca por conhecimento, meus sonhos e escolhas audaciosas. Eu nada seria ou teria feito na vida se não tivesse vocês ao meu lado. Agradeço a Deus todos os dias pela família que tenho, não poderia ser melhor! A minha avó Neusa Magalhães (*in memoriam*), que sempre me incentivou nos estudos, torceu muito e colaborou para que eu chegasse no mestrado.

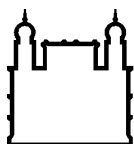
À Deus pela vida, saúde e oportunidades, pelo amparo constante na luta de cada dia!

À todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, OBRIGADA!.

Ficha catalográfica

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO LESTE DA AMAZÔNIA E DO NORDESTE DO CERRADO

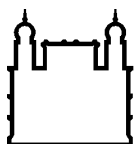
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arina Pacheco Magalhães Lopes

Makalata é um gênero de roedor arborícola encontrado predominantemente na floresta Amazônica, atualmente com duas espécies reconhecidas (*Makalata didelphoides* e *M. macrura*). Devido à dificuldade de coleta, há poucos estudos a respeito deste gênero. Existem publicados dois complementos cromossômicos atribuídos a *M. didelphoides* e nenhum para *M. macrura*. Existem vários estudos filogenéticos com *Makalata* mas apenas dois focando no gênero especificamente. No presente estudo foram realizadas análises citogenéticas e filogenéticas com quatro marcadores moleculares, citocromo *b*, citocromo oxidase subunidade I, éxon 28 do fator de Von Willebrand e o íntron 7 do Beta-fibrinogênio. As análises mostraram quatro diferentes linhagens evolutivas dentro do gênero *Makalata*: (1) *M. macrura* do Brasil e Peru, com estruturação geográfica, (2) *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, (3) *M. aff. didelphoides* do interflúvio entre o rio Branco e o rio Negro e, (4) *M. didelphoides* dividida em linhagem à esquerda do rio Branco, linhagem do escudo das Guianas, linhagem da Amazônia Paraense e do cerrado do Tocantins, e linhagem da Bolívia. O íntron 7 do Beta-fibrinogênio apresentou politomia para os dados analisados. Foram descritos dois novos cariótipos um atribuído a *M. aff. macrura*, outro a *M. aff. didelphoides* e dois novos cariótipos para *M. didelphoides*. Os padrões filogeográficos encontrados sugerem que alguns rios da bacia amazônica e o escudo das Guianas possuem importância na distribuição das linhagens de *Makalata* e que podem estar funcionando como barreiras geográficas. Os dados filogenéticos e citogenéticos são congruentes e indicam a presença de pelo menos quatro linhagens evolutivas distintas além das linhagens já conhecidas, e que necessitam ser descritas.

Palavras chave: gene mitocondriais e nucleares, cariótipo, rato de espinho arborícola do fucinho vermelho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CYTOGENÉTICS, PHYLOGENETICS AND DISTRIBUTION PATTERNS STUDIES OF *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) FROM EAST OF AMAZÔNIA AND NORTHEAST OF CERRADO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arina Pacheco Magalhães Lopes

Makalata is an arboreal rodent genus predominantly found in the Amazon forest, currently two recognized species (*Makalata didelphoides* and *M. macrura*). Due of the difficulty of collecting these specimens, there are few studies of this kind. In the literature there are two karyotypes attributed to *M. didelphoides* and neither for *M. macrura*. There are a lot of phylogenetics studies with *Makalata*, nevertheless there are only two studies about the genus specifically. In this study were performed cytogenetic and phylogenetic analyzes with four molecular markers, cytochrome *b*, cytochrome oxidase subunit I, exon 28 of the von Willebrand factor and intron 7 Beta-fibrinogen. These analyzes showed different evolutionary lineages within the genus *Makalata*: (1) *M. macrura* in Brazil and Peru, with geographic structure, (2) *M. aff. macrura* in the islands of the Rio Negro, (3) *M. aff. didelphoides* in the interfluve between the Branco River and the Negro River, and (4) *M. didelphoides* divided in lineage to the left of the Branco River, lineage of the Guianas Shield, lineage the Amazon of Pará and cerrado of Tocantins, and lineage of Bolivia. The intron 7 of Beta-Fibrinogen polytomy presented to the analyzed data. Were we described two new karyotypes assigned to one for *M. aff. macrura*, another *M. aff. didelphoides* and two new karyotypes of *M. didelphoides*. The found phylogeographic patterns suggest that some rivers of the Amazon basin and the Guianas shield have importance in the distribution of *Makalata* lineages and can be functioning as geographic barriers. The phylogenetic and cytogenetic data are consistent and indicate the presence of at least four distinct evolutionary lineage addition to already known strains, and need be described.

Keywords: mitochondriais and nuclear genes, karyotype, red nosed rat

ÍNDICE

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Gênero <i>Makalata</i>	2
1.2 Estudos cariológicos e filogenéticos.....	4
1.3 Estudos biogeográficos.....	5
2 OBJETIVOS.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Amostras.....	7
3.2 Análises Citogenéticas.....	8
3.2.1 Coloração convencional e bandeamento.....	9
3.3 Análise Filogenéticas.....	10
3.3.1 Isolamento do DNA, amplificação e purificação.....	10
3.3.2 Sequenciamento e alinhamento.....	12
3.3.3 Filogenia e Filogeografia.....	13
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Análises Cariotípicas.....	17
4.2 Análises Filogenéticas.....	21
4.2.1 Gene mitocondrial citocromo <i>b</i> – <i>mt-Cytb</i>	21
4.2.2 Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 – <i>mt-Co1</i>	26
4.2.3 Íntron sete do gene Beta-fibrinogênio – <i>íntron 7-Fgb</i>	31

4.2.4	Éxon 28 do fator de Von Willebrand – <i>éxon 28-Vwf</i>	34
4.2.5	Análise concatenada de <i>mt-Cytb</i> e <i>éxon 28-Vwf</i>	38
4.3	Análises de rede de haplótipos.....	41
5	DISCUSSÃO.....	45
5.1	Variação Cariotípica.....	45
5.2	Relações Filogenéticas.....	48
5.3	Variação Geográfica.....	54
6	Conclusão.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58
8	ANEXOS.....	65
	Anexo 1 – Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook & Russel (2001).....	65
	Anexo 2 - Gel de PCR e cromatograma do marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1.....	66
	Anexo 3 - Gel de PCR e cromatograma do marcador nuclear íntron 7 do Beta-fibrinogênio.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com a distribuição das espécies de <i>Makalata</i> , segundo Emmons & Patton (2015).	3
Figura 2. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios próximos.	7
Figura 3. Cariótipo de <i>M. aff. macrura</i> das ilhas do rio Negro, AM, em coloração convencional com $2n=72$ e $NF=134$.	18
Figura 4. Cariótipo de <i>M. aff. didelphoides</i> do interflúvio dos rio Negro e Branco, em coloração convencional com $2n=76$ e $NF=134$.	19
Figura 5. Cariótipos de <i>M. didelphoides</i> em coloração convencional com $2n=64$ e $NF=100$, de Caracaraí, RR.	19
Figura 6. Cariótipo de <i>Makalata didelphoides</i> com $2n=64$ e $NF=100$ da margem esquerda do rio Branco, RR, com bandeamento GTG.	19
Figura 7. Cariótipo de <i>Makalata didelphoides</i> com $2n=64$ e $NF=100$ da margem esquerda do rio Branco, RR, com bandeamento GTG.	20
Figura 8. Cariótipo de <i>M. didelphoides</i> em coloração convencional com $2n=68$ e $NF=132$, de São Valério da Natividade, TO.	20
Figura 9. Topologia de MV para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>mt-Cytb</i> .	25
Figura 10. Topologia de ML para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>mt-Co1</i> .	30
Figura 11 Topologia de MV a esquerda e de IB a direita, para <i>Makalata</i> com <i>íntron 7-Fgb</i> .	33
Figura 12. Topologia para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>éxon 28-Vwf</i> .	37
Figura 13. Topologia para <i>Makalata</i> com dados concatenado de <i>mt-Cytb</i> e <i>éxon 28-Vwf</i> .	40
Figura 14. Análise de median-joining para <i>Makalata</i> com <i>mt-Cytb</i> .	42
Figura 15. Análise de <i>Median-Joining</i> do complexo <i>Didelphoides</i> com haplótipos com <i>mt-Cytb</i> .	43
Figura 16. Análise de <i>Median-Joining</i> do complexo <i>Macrura</i> com haplótipos de <i>mt-Cytb</i> .	44
Figura 17. Mapa com os pontos de coleta e os cariótipos para o gênero <i>Makalata</i> .	47
Figura 18. Topologias com <i>mt-Cytb</i> publicadas por Patton <i>et al.</i> (2000) e Patterson & Velazco (2008), com modificações.	48

Figura 19. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios e relevo próximos.....	52
Figura 20. Mapa com as localidades dos espécimes de <i>Makalata</i> evidenciando os acidentes geográficos que separam as linhagens.....	53
Figura 21. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados, destacando os rios e relevo próximos e as linhagens de <i>Makalata</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das amostras de <i>Makalata</i> sequenciadas neste trabalho.....	8
Tabela 2. Iniciadores usados para amplificação e sequenciamento dos marcadores <i>mt-Cytb</i> , <i>mt-Co1</i> , <i>íntron 7-Ffg</i> e <i>éxon 28-Vwf</i>	11
Tabela 3. Ciclagens utilizadas para os marcadores mitocondriais (<i>mt-Cytb</i> , <i>mt-Co1</i>) e nucleares (<i>íntron 7-Fgb</i> , <i>éxon 28-Vwf</i>), especificando as temperaturas e os tempos em segundos ou minutos.....	12
Tabela 4. Amostras do complexo Didelphoides utilizadas nas análises moleculares, com números de campo ou de museu, números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidade e referências.....	14
Tabela 5. Amostras do complexo de espécies <i>Macrura</i> utilizadas nas análises moleculares, números de campo e/ou museu, números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidades e referências.....	16
Tabela 6. Lista de haplótipos do <i>mt-Cytb</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	23
Tabela 7. Estimativas das distâncias genéticas (em porcentagem) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com <i>mt-Cytb</i>	24
Tabela 8. Lista de haplótipos de <i>Makalata</i> com <i>mt-Co1</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	27
Tabela 9. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>mt-Co1</i>	29
Tabela 10. Lista de haplótipos do <i>íntron 7-Fgb</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	32
Tabela 11. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>íntron 7-Fgb</i>	32
Tabela 12. Lista de haplótipos do <i>éxon 28-Vwf</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	35
Tabela 13. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre os haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>éxon 28-Vwf</i>	36
Tabela 14. Lista de haplótipos das sequências concatenadas de <i>mt-Cytb</i> e do <i>éxon 28-Vwf</i> de <i>Makalata</i>	39
Tabela 15. Dados citogenéticos disponíveis para <i>Makalata</i> , discriminando o táxon, localidade, números diplóide e fundamental, e referência.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2n: número diplóide

M3: terceiro molar

ACP: análises de componentes principais

Aff: affinis

AICc: akaike information criterion correction

AM: Amazonas

BO: Bolívia

BR: Brasil

cm: centímetros

CP1: componente principal 1

CP2: componente principal 2

CRB: Cibele Rodrigues Bonvicino

CVA: análise de variáveis canônicas

D-loop: gene mitocondrial não codificante

DNA: ácido desoxirribonucléico

éxon 28-VWF: éxon 28 do gene nuclear fator de von willebrand

et al.: e colaboradores

G: distribuição gamma

GenBank: banco de dados de sequências de livre acesso

GF: Guiana Francesa

GTR: modelo de substituição nucleotídica “generalised time-reversible”

GY: Guiana

Hap: haplótipos

HCL: ácido clorídrico

HKY: modelo de substituição nucleotídica hasegawa- kishino -yano

I: sítios invariáveis

íntron7-FGB: íntron 7 do gene nuclear Beta-fibrinogênio

IB: Inferência Bayesiana

Id: identificação

INPA: Instituto de Pesquisa da Amazonia

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

JAO: João Alves de Oliveira

JLP: James L Patton

K2p: Kimura 2 parâmetros

Km: quilômetro

Labpmr: laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios Silvestres

LHE: Louise H Emmons
MBF: Michel Barros Faria
Md: margem direita
Me: margem esquerda
Min: minuto
Ml: mililitro
Mm: milimolar
MN: museu nacional
MNFS: Maria Nazareth F da Silva
mt-Co1: citocromo oxidase unidade 1
mt-Cytb: mitocondrial- citocromo *b*
MV: máxima verossimilhança
N: tamanho da amostra
NF: número fundamental
ng: nanograma
°C: graus celsius
PA: Pará
PARNA: parque nacional
PCR: do inglês polimerase chain reaction
PE: Peru
pp: probabilidade posterior
Prq: parque
RAG1: gene nuclear de ativação recombinante
Ref.: referência
RO: Rondônia
rpm: rotações por minutos
RR: Roraima
seg: segundos
Taq: *thermus aquaticus*
TO: Tocantins
TrN: modelo de substituição nucleotídica, Tamura Ney
UFPB: Universidade Federal da Paraíba
Uv: ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia é a radiação que obteve o melhor sucesso adaptativo dentre os mamíferos, presente em todos os continentes e representando cerca de 40% da diversidade dos mamíferos vivos (Musser & Carleton, 2005; Upham & Patterson, 2012). Dividida em cinco subordens e aproximadamente 34 famílias, apresenta ampla diversidade ecológica, morfológica e taxonômica (Wilson & Reeder, 2005). Devido a essa grande diversidade, os roedores são bons representantes para estudos biogeográficos, ecológicos e evolutivos (Huchon, 1999).

A família Echimyidae é uma das mais antigas da América do Sul, com registros fósseis que datam entre o médio Eoceno e o Oligoceno, um dos mais antigos para roedores (Emmons *et al.*, 2015). É a família mais abundante em espécies (91 espécies viventes) e com a maior diversidade ecológica (Upham & Patterson, 2015). Essa família possui gêneros de hábitos terrestres como *Proechimys* e *Thrichomys*, arborícolas como *Echimys*, *Makalata* e *Isothrix*, semi-fossoriais como *Clyomys*, e semi-aquático como *Myocastor* (Lara *et al.*, 1996; Upham *et al.*, 2013; Upham & Patterson, 2015). Encontrados desde a América Central até a Argentina, são conhecidos como ratos de espinho por apresentarem pelos aristiformes, flexíveis e achatados (Lara *et al.*, 1996; Emmons, 2005; Galewski *et al.*, 2005; Upham *et al.*, 2013). Os equimídeos de hábito arborícola são pouco representados nas coleções dos museus, devido a amostragem inadequada do dossel ou por serem realmente escassos na natureza (Patton *et al.*, 2000; Bonvicino *et al.*, 2003), portanto, os limites genéricos e as relações entre estes roedores ainda são poucos estudados (Patton *et al.*, 2000). A família Echimyidae é composta por quatro subfamílias: Echimyinae, Eumysopinae, Dactylomyinae e Myocastorinae (Lara *et al.*, 1996; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013; Emmons *et al.*, 2015). A subfamília Echimyinae possui representantes exclusivamente arborícolas e com pelos aristiformes, patas curtas e cauda longa (maior que o comprimento do corpo), com atualmente nove gêneros, *Callistomys*, *Diplomys*, *Echimys*, *Isothrix*, *Makalata*, *Pattonomys*, *Phyllomys*, *Santamartomys* e *Toromys* (Emmons, 2005; lack-Ximenes *et al.*, 2005a, Emmons *et al.*, 2015).

Em 1809, Cuvier descreveu o primeiro gênero de equimídeo (*Echimys*) para alocar o já descrito *Myoxus chrysurus* Zimmermann 1780, cuja nova combinação passou a ser *Echimys chrysurus*. Atribuindo a autoria a Geoffroy St.-Hilaire, Desmarest em 1817 descreveu seis novas espécies alocadas ao gênero *Echimys*:

E. hispidus, *E. spinosus*, *E. cayennensis*, *E. setosus*, *E. dactylinus*, e *E. didelphoides* (Emmons *et al.*, 2015). Nos anos de 1838 e 1840 Isidore Geoffroy St.-Hilaire dividiu o gênero *Echimys* em três gêneros: *Dactylomys*, *Echimys* e *Nelomys*, dentro deste último o autor colocou, *Nelomys cristatus*, *N. paleaceus*, *N. semivillosus*, *N. blainvillii*, *N. armatus*, *N. didelphoides* (Emmons *et al.*, 2002, 2015). Nos mesmos trabalhos, St.-Hilaire propôs a divisão da família Echimyidae em três subfamílias Echimyinae, Dactylomyinae e Eumysopinae, esta classificação continua sendo utilizada nos dias de hoje, com apenas o acréscimo da subfamília Myocastorinae (Lara *et al.*, 1996, Leite & Patton, 2002; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013; Emmons *et al.*, 2015).

1.1. Gênero *Makalata*

O gênero *Makalata* foi criado por Husson em 1978 para alocar os espécimes de *Nelomys armatus* Lichtenstein, 1830 que passaram à combinação de *Makalata armata*. O holótipo de *Echimys didelphoides* Desmarest, 1817 é um indivíduo jovem de *Makalata armata* (Emmons, 1993), como a descrição de *M. armata* data de 1838, sendo posterior à descrição de *Echimys didelphoides* em 1817, o nome válido passou a ser *Makalata didelphoides*, sendo *Makalata armata* considerada um sinônimo júnior. *Makalata* é o gênero mais complexo da subfamília Echimyinae, atualmente com apenas três espécies reconhecidas, *Makalata macrura* Wagner, 1842, *Makalata didelphoides* Desmarest, 1817 e *Makalata obscura* Wagner, 1840 (Emmons & Patton, 2015).

Makalata didelphoides Desmarest, 1817 coloração variando entre ferrugíneo e amarelado com traços pretos, parte mais posterior do corpo e começo da cauda e focinho em notalidades bem alaranjadas. Cauda menor que o comprimento do corpo com pêlo apenas na base. Ventre amarelo esbranquiçado, patas curtas e largas de coloração avermelhada. Possuem hábito noturno, solitário e arborícola, alimenta-se de frutos, sementes verdes e alguns tipos de folhas, sendo mais comum em florestas de várzea (Emmons & Patton, 2015). A espécie ocorre do norte da Venezuela, passando pela Guiana, Guiana Francesa até a Amazônia oriental, principalmente a leste dos rios Negro e Madeira, nos estados do Maranhão e Ceará, e no nordeste da Bolívia (Figura 1, Emmons & Patton, 2015). Em sua descrição Desmarest aponta a localidade tipo de *M. didelphoides* como sendo América do Sul, sem maiores especificações.

Makalata macrura Wagner, 1842 muito semelhante a *M. didelphoides*, mas com ventre marron acinzentado (Emmons & Patton, 2015). Também possui parte mais posterior do corpo e focinho alaranjados. Geralmente encontrada em planície sazonal inundada, mata de várzea ou igapó (Hice & Velazco, 2012), tendo como localidade tipo Borba, na foz do rio Madeira no Amazonas. A espécie ocorre do oeste da bacia Amazônica (margem esquerda do rio Negro até próximo ao rio Madeira), incluindo Venezuela e o sudeste da Colômbia, leste do Equador e norte e centro do Peru (Emmons & Patton, 2015; Figura1).

Makalata obscura Wagner, 1840 esta espécie foi descrita a partir de dois espécimes coletados por Spix no Brasil, a descrição não é precisa, caracterizando o espécime como de corpo robusto, patas curtas e cauda grossa, pelagem escura com tonalidades de amarelo e ventre amarelo (Emmons & Patton, 2015). Emmons (2005) após análises morfológicas infere que esta espécie é muito parecida com *M. didelphoides* e talvez seja apenas uma variação desta.

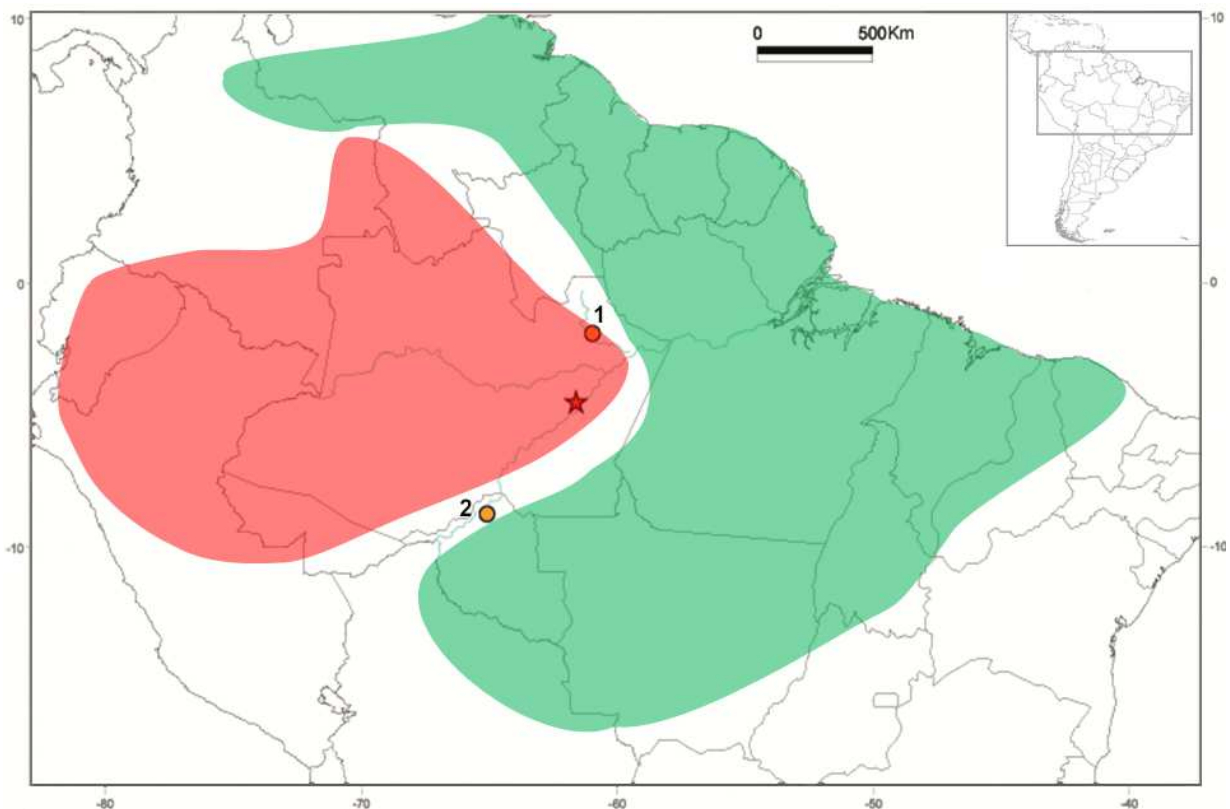


Figura 1. Mapa com a distribuição das espécies de *Makalata*, segundo Emmons & Patton (2015). Em vermelho a distribuição de *M. macrura* e em verde a distribuição de *M. didelphoides*. Os círculos representam as localidades dos espécimes já cariótipados para o gênero (1-Balbina, AM; Lima et al., 1998 e 2-Samuel, RO; Leal-Mesquita, 1991) e a estrela representa a localidade tipo de *M. macrura* (Borba, AM).

1.2. Estudos cariológicos e filogenéticos

As análises cariológicas em vertebrados auxiliam a traçar a história evolutiva de um ou vários cromossomos, podendo estabelecer relações de parentesco, principalmente quando analisados junto com sequências de DNA (Kasahara, 2009). Os rearranjos cromossômicos são eventos relativamente raros, com taxa mínima de homoplasia, o que torna a citogenética uma ferramenta importante para estudos sistemáticos (Nagamachi *et al.*, 2015).

Para os roedores, grupo com alta similaridade morfológica entre as espécies, onde variações ambientais influem na variação fenotípica (Dobigny *et al.*, 2002), a análise cariotípica tem se mostrado útil para decisões taxonômicas. Um exemplo na família Echimyidae é o gênero *Proechimys* Allen, 1899, que possui muitas espécies crípticas (morfológicamente similares) e número diplóide variando de 14 a 62 de acordo com a espécie (Ribeiro, 2006; Eler *et al.*, 2012).

Devido à dificuldade em se coletar espécimes de *Makalata*, os trabalhos citogenéticos com representantes deste gênero são raros, existindo apenas dois complementos cromossômicos já publicados até o momento. O cariótipo de um espécime do rio Jamari em Rondônia, identificado como *M. armata* mostrou $2n=70$ e $NF=120$ (Leal Mesquita, 1991), e outro de um espécime identificado como *M. didelphoides* da Hidrelétrica de Balbina, rio Uatumã, estado do Amazonas, que mostrou $2n=66$ e $NF=106$ (Lima *et al.*, 1998). Até o momento, nenhum indivíduo identificado como *M. macrura* foi cariotipado.

Análises filogenéticas são amplamente utilizadas em estudos taxonômicos e filogeográficos para avaliar áreas mais diversas, endêmicas, oferecendo meios de testar hipóteses de diversificação (da Silva & Patton, 1998). Muitos estudos filogenéticos com a família Echimyidae utilizaram sequências de *Makalata* no conjunto de dados (da Silva & Patton, 1993; Lara *et al.*, 1996; Da Silva & Patton, 1998; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013). No entanto, existem poucos estudos com a variação dentro do gênero, com exceção do amplo estudo sobre mamíferos do rio Juruá (Patton *et al.*, 2000) onde as relações intragenéricas de *Makalata* e sua distribuição ao longo deste rio foram abordadas. Outro estudo, focado no gênero *Isothrix*, utilizou dentre outros Echimyidae, 17 sequências de *Makalata*, apresentando algumas considerações sobre este gênero (Patterson & Velazco, 2008).

1.3. Estudos biogeográficos

Existem três hipóteses que surgiram na tentativa de explicar a alta diversificação de espécies observadas nas planícies da bacia Amazônica, são elas (1) hipótese de refúgio (Vanzolini & Williams, 1970; Prance 1982), (2) hipótese de gradiente ecológico (Endler, 1977, 1982) e (3) hipótese de rios como barreira. Esta última, criada por Alfred Russell Wallace em 1854, quando observando a abundância e as relações entre as espécies de primatas ao longo do rio Amazonas, sugeriu que os grandes rios amazônicos (como os rios Negro, Madeira e Amazonas) representariam uma barreira para o fluxo gênico, promovendo a divergência genética entre as populações de cada margem. Esta hipótese tem como pressuposto a ideia de que a população inicial teria sido dividida pelo rio, interrompendo o fluxo gênico entre as populações atuais, ficando efetivamente separadas (Gascon *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2013; Leite & Rogers, 2013). Esta hipótese gerou muitos estudos que visam testar os padrões de diferenciação das espécies entre as populações de cada margem dos rios (Gascon *et al.*, 2000). Estudos sobre a fauna e a extensão desta pelos biomas ajudam a entender como as espécies se diferenciaram, a existência de endemismos e a complexidade da diversidade biológica (Nascimento *et al.*, 2013; Leite & Rogers, 2013).

Para muitas espécies de vertebrados, os rios funcionam como barreira geográfica, separando e impedindo o fluxo gênico entre as populações, provocando diversificação e especiação. Estudos com anfíbios e aves tem suportado a hipótese de que os rios amazônicos funcionam como importante barreira geográfica, separando as espécies (Aleixo, 2006; Chevirona *et al.*, 2005; Funk *et al.*, 2007). Estudos com pequenos mamíferos também mostram que os rios tem interferência no fluxo genéticos de algumas espécies (Patton *et al.*, 1994; Da Silva & Patton, 1998; Nascimento *et al.*, 2011). Entre esses estudos, destacamos estudos que apontam o rio Negro como barreira para o fluxo gênico entre espécies de primatas e roedores (Da Silva & Patton, 1998; Bonvicino *et al.*, 2003; Bonvicino & Weksler, 2012; Leite & Rogers, 2013). Aqui, a hipótese dos rios como barreiras foi testada com amostras de *Makalata*.

2. Objetivos

Analisar as relações filogenéticas, a variação cariotípica e o padrão de distribuição dos espécimes de *Makalata*, com foco nos indivíduos coletados na Amazônia brasileira nos municípios de Barcelos, Santa Isabel do Rio Negro no estado do Amazonas e Caracaraí no estado de Roraima, e no Cerrado do Brasil central no município de São Valério da Natividade no estado de Tocantins. Foram utilizados dados cariotípicos e sequências de marcadores mitocondriais e nucleares. Especificamente pretende-se:

- 1) Descrever e analisar a variação cariotípica em amostras disponíveis para este estudo;
- 2) Avaliar as relações filogenéticas dos espécimes utilizando sequências de DNA dos genes mitocondriais citocromo *b* e citocromo oxidase subunidade I, e do marcadores nucleares, éxon 28 do fator de Von Willebrand e íntron 7 do Beta-fibrinogênio;
- 3) Analisar, a partir dos padrões filogeográficos dos espécimes estudados, a presença de possíveis barreiras geográficas

3. Material e métodos

3.1. Amostras

As amostras analisadas neste estudo consistem em células em suspensão e tecido hepático, coletadas previamente, totalizando 20 espécimes de *Makalata*. Destas, 19 são da Amazônia, sendo 13 de Barcelos e Santa Isabel do Rio Negro, no estado do Amazonas (Figura 2, localidades 1 a 9), seis de Caracaraí no estado de Roraima (Figura 2, localidades 15 a 17), e um da região de Cerrado no sul do estado de Tocantins (Figura 2, localidade 20). Encontram-se depositados no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, Fiocruz, Brasil. No mapa da Figura 2 estão plotadas as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, localidades de 1 a 20 são de sequências obtidas neste trabalho, as demais localidades são de sequências obtidas no GenBank.

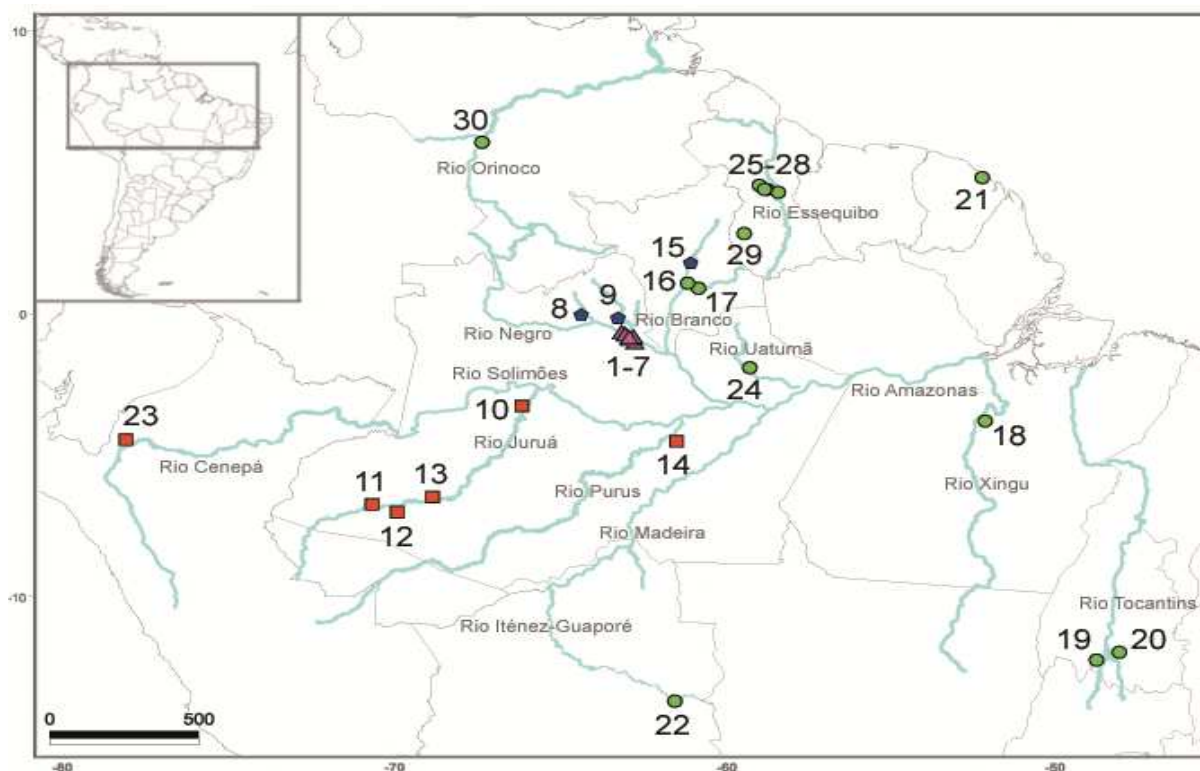


Figura 2. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios próximos. **Brasil: Amazonas**, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima**, Caracaraí (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa**: (21) Cayenne. **Bolivia**: Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru**: (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana**: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela**: Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado = *M. macrura*, triângulos = *M. aff. macrura*, círculos= *M. didelphoides*, pentágonos= *M. aff. didelphoides*.

Para facilitar a exposição e compreensão dos dados, as linhagens que encontramos diferentes das linhagens já existentes (*M. macrura* e *M. didelphoides*), nomeamos de *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*.

Tabela 1. Lista das amostras de *Makalata* sequenciadas neste trabalho discriminando a espécie, número de campo (ID), sexo (S) e localidade de coleta. Os estados do Brasil são: AM=Amazônia, RR=Roraima, e TO=Tocantins.

Espécie	ID	S	Localidade de coleta
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	F	AM, Barcelos, rio Aracá, Igarapé do Bigorna
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	M	AM, Barcelos, rio Aracá, Igarapé do Bigorna
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	F	AM, Santa Isabel do rio Negro, rio Preto
<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	M	RR, Caracaraí, Parque Nacional do Viruá
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Itamaraty
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568, CRB2569	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626, CRB2627	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Urumari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Urumari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Tigre
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Giriau
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Budari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Cururu
<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	M	TO, São Valério da Natividade
<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	F	RR, Rio anauá, próximo ao rio Branco
<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	M	RR, Caracaraí, rio Anauá
<i>M. didelphoides</i>	JAO2311, JAO2297, JAO2298	F	RR, Caracaraí, rio Anauá

3.2. Análises citogenéticas

Todas as células em suspensão foram obtidas no campo por cultura de curta duração seguindo o protocolo descrito por Andrade e colaboradores (2004). No laboratório, as células em suspensão foram lavadas pelo menos duas vezes com fixador Carnoy (3 volumes metanol, 1 volumes ácido acético). Para montagem das lâminas, os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados por 10 minutos a 1.500rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com pipeta Pasteur. As lâminas foram lavadas com detergente neutro, mergulhadas em Etanol e secas com gase. Para pingar o material cada lâmina foi mergulhada em metanol 70%, deixando escorrer o excesso em papel absorvente e a uma distância de aproximadamente 15cm da lâmina uma gota da suspensão celular foi pingada e a

lâmina flambada. A qualidade do material (crescimento celular, choque hipotônico) e concentração das metáfases foram verificadas ao microscópio invertido. Aqui 2n refere-se ao número diplóide e NF ao número fundamental autossômico.

3.2.1. Coloração convencional e bandeamentos

As lâminas com boas metáfases foram envelhecidas um dia e coradas utilizando solução de Giemsa 5% diluída em tampão Fosfato 0,1M (53,7ml NaH_2PO_4 , 46,3ml Na_2HPO_4 , água deionizada em quantidade suficiente para completar 1000ml) por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, secas e analisadas ao microscópio óptico com câmera digital acoplada. As fotos das metáfases foram capturadas através de um programa de captura e edição de imagem (Q-Capture Pro 7) e as melhores foram impressas para montagem dos cariótipos.

O bandeamento GTG foi realizado seguindo o protocolo de Seabright (1971) com modificações. As lâminas foram lavadas em água corrente, utilizando detergente neutro, colocadas em éter e secas com papel absorvente, pingadas conforme a técnica descrita acima e foram envelhecidas um dia. No dia seguinte a tripsina para a digestão das proteínas, foi preparada na proporção de 0,050g de tripsina para 50ml de solução salina de Hanks (6,75g Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1g NaHCO_3 , 0,5ml Fungizona, 1ml Penicilina, 50ml Streptomina). As lâminas foram mergulhadas na solução de tripsina por 30 a 45 segundos e imediatamente lavadas em água destilada. Após secas foram mergulhadas no corante por 10 minutos, lavadas em água corrente, secas e foto-documentadas ao microscópio.

Para o bandeamento CBG (Heterocromatina Constitutiva) foi seguido o protocolo de Sumner (1972) com modificações. As lâminas foram pingadas conforme descrito acima e envelhecidas por sete dias. Depois foram tratadas em solução de 2xSSC (17,53g NaCl, 8,82g Citrato de Na, 900ml de água deionizada) em banho Maria a 60°C por 15 minutos, lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de ácido clorídrico (HCL) na concentração de 0,2N por 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas em água corrente e secas. Em seguida submersas numa solução filtrada de Hidróxido de Bário [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] a 5% à temperatura de 60°C por 30 a 45 segundos, lavadas rapidamente em ácido clorídrico a concentração de 2N e em seguida em água corrente. Depois de secas, as lâminas foram incubadas novamente em solução de 2xSSC, à 60°C por 30 minutos, lavadas em água corrente e secas para serem coradas em Giemsa 5% por 20 minutos.

Foram fotografadas e contadas 20 metáfases de cada amostra das localidades foco deste estudo. Destas, foram escolhidas as cinco melhores metáfases para serem impressas, recortadas e montadas. As análises de banda GTG e CGB foram realizadas e utilizadas para comparação das metáfases e confirmação da montagem do cariótipo.

3.3. Análises filogenéticas

A nomenclatura dos genes seguiu a disponível no site UniProt <http://www.uniprot.org>, específica para roedores (acesso em 13.06.2016).

3.3.1. Isolamento do DNA, amplificação e purificação

O DNA foi isolado a partir de tecido hepático (conservado em álcool etílico absoluto) utilizando de protocolo fenol-clorofórmio adaptado (Anexo I) de Sambrook & Russell (2001). Para checar a qualidade do DNA extraído, as amostras foram corridas em gel de agarose a 0,8% e observadas em transiluminador de ultra violeta (Gel Logic 200, Carestream Health). Após a extração, os fragmentos de DNA foram amplificados através de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*). Para isso, foram escolhidos dois genes mitocondriais, o citocromo *b* (*mt-Cytb*) completo, com 1140 pares de bases, por ter um bom sinal filogenético, para a maioria dos mamíferos e ser amplamente utilizado nos estudos filogenéticos e filogeográficos (Patterson & Velazco, 2008), e o citocromo oxidase unidade 1 (*mt-Co1*) parcial, com 657 pares de base, por sua utilização no projeto Barcoding (<http://brbol.org/>'DNA Barcode' de Tetrápoda: Construção de uma Rede Integrada de 'DNA Barcode' de Anfíbios, Répteis, Aves e Mamíferos). Além destes, foram escolhidos dois marcadores nucleares que possuem uma menor taxa de substituição nucleotídica que os genes mitocondriais (Springer *et al.*, 2001). O íntron 7 do gene nuclear Beta-fibrinogênio (*íntron 7-Fgb*), com 745 pares de base, foi escolhido por suplementar os dados de sequências mitocondriais e ser muito empregado em inferências filogenéticas de taxons recentes e por ter evolução mais rápida (Prychitko & Moore, 1997, 2000, Nascimento *et al.*, 2013). O éxon 28 do gene nuclear fator de Von Willebrand (*éxon 28-Vwf*), com 1143 pares de base, foi escolhido por ser muito usado para reconstruções filogenéticas de mamíferos nos vários níveis taxonômicos (Huchon & Douzery, 2001; Galewski *et al.*, 2005).

As reações foram realizadas em termociclador (*Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems*) utilizando iniciadores e ciclagens específicas para cada gene (Tabelas 2 e 3). Para um total de 50µl de reação foi adicionado 1µl de DNA (de 100 ng/µl), 0,4µl dNTPs (25 µM/ml), 0,5µl de cada iniciador (10 pmol/ µl), 5µl tampão de amplificação 10X, 2µl de MgSO₄ e 0,3µl de polimerase Taq Platinum (Invitrogen) e 40,3µl de água ultra pura. Para confirmação da presença dos amplicons, 3µl de produto de PCR foram homogenizados com 2µl de corante de ácidos nucleicos GelRed e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) com tampão de NaOH 1X pH8 (0,4gr NaOH, 2,75gr Ácido Bórico, H₂O q.s.p. 1000ml), observadas no transiluminador ultra violeta (Gel Logic 200, Carestream Health), acoplado ao programa *Quantity One* que fotodocumenta os géis. As amostras devidamente amplificadas foram purificadas utilizando o conjunto de reagentes de purificação *illustra GFX™ PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram novamente corridos em gel de agarose (1,5%) para checar a qualidade das bandas obtidas para então realizar a reação de sequenciamento.

Tabela 2. Iniciadores usados para amplificação (asterisco) e sequenciamento dos marcadores *mt-Cytb*, *mt-Co1*, *íntron 7-Ffg* e *éxon 28-Vwf* com as sequências, sentido das fitas e referência (ref) 1. Irwin *et al.* (1991), 2. Smith & Patton (1993), 3. Cassens *et al.* (2000), 4. Casado *et al.* (2010), 5. Matocq *et al.* (2007), 6. Ward *et al.* (2005), 7. Presente estudo.

Iniciadores	Sequências	Fita	Ref
L14724*	5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'	senso	1
MVZ16	5' AAATAGGAARTATCATTCTGGTTTRAT 3'	anti-senso	2
mt-Sot in 2	5' TGAGGACAAATATCATTYTGAG 3'	senso	3
mt-Cytb rev*	5' GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG 3'	anti-senso	4
β17-mammL*	5' ACCCCAGTAGTATCTGCCGTTTGGATT 3'	senso	5
βfib-mammU*	5' CACAACGGCATGTTCTTCAGCAC 3'	anti-senso	5
FishF1COI*	5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'	senso	6
FishR1COI*	5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'	anti-senso	6
VWF A*	5' CTGTGATGGTGTCAACCTCACCTGTGAA 3'	senso	7
VWF B*	5' TCGGGGGGAGCGTCTCAAAGTCCTGGATG 3'	anti-senso	7
VWF B2	5' GCAGGGTTTCTGTGACCATGTAGACCA 3'	anti-senso	7

Tabela 3. Ciclagens utilizadas para os marcadores mitocondriais (*mt-Cytb*, *mt-Co1*) e nucleares (*íntron 7-Fgb*, *éxon 28-Vwf*), especificando as temperaturas e os tempos em segundos (seg) ou minutos (min).

Gene	Des	Ciclos	Extensão
<i>mt-Cytb</i>	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 48°C 45seg, 72°C 90seg)	72°C 4min
<i>mt-Co1</i>	94°C 2min	5 ciclos (94°C 30seg, 42°C 30seg, 72°C 1min) 5 ciclos (94°C 30seg, 40°C 30seg, 72°C 1min) 25 ciclos (94°C 30seg, 38°C 30seg, 72°C 1min)	72°C 1min
<i>íntron 7-Fgb</i>	94°C 4min	35 ciclos (94°C 45seg, 58°C 30seg, 72°C 90seg)	72°C 4min
<i>éxon 28-Vwf</i>	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 65°C 45seg, 72°C 90seg)	72°C 4min

3.3.2. Sequenciamento e alinhamento

Os produtos purificados foram sequenciados com o conjunto de reagentes *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram preparadas da mesma forma para cada amostra com cada um dos iniciadores separadamente. Para um volume de 10µl de reação utilizou-se: 2µl do produto purificado (*Template*), 1,5µl de tampão *Ready Reaction Kit*, 1µl do tampão *BigDye Sequencing Buffer (5x)*, 1µl de iniciador (3,2 pmol/ µl, Tabela 2) e 4,5µl H₂O ultra pura. As reações foram realizadas no termociclador (*Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático “ABI 3130xl” Genetic Analyser (Applied Biosystems) da plataforma de sequenciamento da Divisão de Genética do Instituto Nacional de Câncer (INCA). As sequências obtidas foram editadas utilizando os programas Chromas Lite (McCarthy *et al.*, 1998), Chromas Pro versão 1.45 (McCarthy *et al.*, 1998) e alinhadas manualmente no MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Com base em análises filogenéticas preliminares as amostras utilizadas foram separadas em dois grupos nomeados Macrura (*M. macrura* e *M. aff. macrura*) e Didelphoides (*M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*), listadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente, assim como amostras adicionadas do GenBank e seus respectivos números de acesso. As amostras previamente sequenciadas foram obtidas em um trabalho de monografia em 2004 que não resultou em artigo científico.

3.3.3. Filogenia e filogeografia

A identificação dos haplótipos foi realizada com o programa DnaSP versão 5 (Librado & Rozas, 2009) e, para numerar os diferentes haplótipos, foi escolhida a opção “deleção par a par” (*pairwise deletion*) para que o máximo de caracteres fosse utilizado em cada comparação, no caso de dados ausentes. Para as análises de distância genética foi utilizado o algoritmo de distância de Kimura-2-parâmetros (K2p: Kimura, 1980), utilizando a opção de deleção completa, realizadas no programa MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). O modelo de substituição K2p corrige para múltiplas substituições na mesma posição, levando em conta a diferença de frequência entre transições e transversões, assumindo frequências iguais entre os quatro nucleotídeos e que as taxas de substituições não variam entre as posições.

O modelo de substituição para as análises filogenéticas foi escolhido pelo teste de AIC do inglês “Akaike Information Criterion” (Akaike, 1973) com correções (Hurvich & Tsai, 1988; Burnham & Anderson, 2003), através do programa jModelTest versão 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). As análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram realizadas com o programa PhyML versão 3.1 (Guindon & Gascue, 2003) e a confiabilidade dos ramos foi calculada com o método de reamostragem de bootstrap utilizando 1000 gerações. As análises de Inferência Bayesiana (IB) foram processadas no programa MrBayes versão 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e o valor de suporte usado para os agrupamentos foi a probabilidade posterior obtida em 10000 gerações, removendo 10% das árvores iniciais.

Para calcular e gerar a rede de haplótipos através da análise de Median-Joining (MJ) utilizou-se o programa Network versão 4.6.1.3 (Bandelt *et al.*, 1999) que adota a parcimônia como critério. Esta análise foi realizada apenas para o marcador mitocondrial Citocromo *b*, sendo uma análise com todos os haplótipos e outras duas com cada complexo (Macrura e Didelphoides) em separado.

Para as análises das árvores filogenéticas foram adicionadas ao conjunto de dados sequências de *Echimys chrysurus* (MBF73) e *Isothrix negrensis* (CRB2432), sequenciadas neste estudo para todos os marcadores analisados e *Mesomys hispidus* (CRB2054) para os marcadores *mt-Cytb*, *mt-Co1* e *éxon 28-Vwf*. Para as análises com os marcadores *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* foram ainda adicionadas as sequências de *Toromys grandis* (FMNH92198) disponível no GenBank, com os códigos de acesso KF590699 e KF590676, para cada marcador respectivamente.

Tabela 14. Amostras do complexo *Didelphoides* utilizadas nas análises moleculares, com números de campo ou de museu (ID), números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidade e referências (Ref). 1= presente estudo, 2= previamente sequenciadas, 3= Da Silva & Patton (1993), 4. Patton *et al.* (2000), 5. Engstrom *et al.* (ainda não publicado).

Taxon	ID	<i>mt-Cytb</i>	<i>mt-Co1</i>	<i>éxon 28-Vwf</i>	Localidade	Ref
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793, CRB1801	EU302690.1, EU302691.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, lg. Bigorna	1,2
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	EU302692.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto	1,2
<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, PARNA Viruá	1
<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: TO, São Valério da Natividade	1
<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, rio Anauá-rio Branco	1
<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2297, JAO2311	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, rio Anauá	1
<i>M. didelphoides</i>	LHE554, LHE595, LHE632	L23361.1, L23362.1, L23364.1	Sem GB	Sem GB	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu	3
<i>M. didelphoides</i>	LHE600/T3530	L23363.1	Sem GB	AJ849311.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu	3
<i>M. didelphoides</i>	V1251, V1566	EU302704.1, EU302705.1.	Sem GB	Sem GB	GF: Cayenne	2
<i>M. didelphoides</i>	ECH4, TTS380, TTS383	EU313230.1, EU313233.1, EU313234.1	Sem GB	Sem GB	BO: Santa Cruz, Flor de Oro, m.e. rio Iténez, Prq Noël Kempff Mercado	4
<i>M. didelphoides</i>	LCP700	EU313231.1	Sem GB	Sem GB	BR: TO, rio Santa Teresa	4
<i>M. didelphoides</i>	ROM107837,	Sem GB	JF458607.1,	Sem GB	VE: Pozon, 50Km a NE de Puerto Ayacucho	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM109023, ROM111775.	Sem GB	JF458608.1, JF458626.1.	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM119133	Sem GB	JF458622.1,	Sem GB	GY: Acima de Takutu Essequibo, sítio Dadanawa	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM107377, ROM107375, ROM107374, ROM107362, ROM107371, ROMF39480,	Sem GB	JF458610.1, JF458613.1, JF458614.1, JF458617.1, JF458627.1, JF444311.1,	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro burro	5

<i>M. didelphoides</i>	ROM107376 ROM109072, ROM107100, ROM107373, ROM109074, ROM109166, ROM109236, ROMF38836,	Sem GB	JF458612.1 JF458609.1, JF458624.1, JF458623.1, JF458625.1, JF458618.1, JF458619.1, JF458611.1,	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM109073, ROM107372, ROMF39284, ROM111609, ROM111622, ROM111621	Sem GB	JF458615.1, JF458616.1, JF458620.1, JF458621.1, JF458628.1, JF458629.1	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama	5
<i>M. didelphoides</i>	LCP716/ UFMG3012	EU313232.1	JF297658.1	JF297707.1	BR: TO, rio Santa Teresa	4

Abreviações: I.= ilha, Ig.= Igarapé, m.e.= margem esquerda, Prq.=parque. BO= Bolívia, PE= Peru, GF=Guiana Francesa, GY=Guiana, os estados brasileiros (BR) são: AM=Amazônia, PA=Pará, RR=Roraima, TO=Tocantins. Sem GB=sem número de acesso ao GenBank.

Tabela 5. Amostras do complexo de espécies *Macrura* utilizadas nas análises moleculares, números de campo e/ou museu (id), números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidades e referências (ref). 1= presente estudo, 2= previamente sequenciadas, 3= Silva & Patton(1993), 4= Patton *et al.* (2000), 5= Patterson & Velazco (2008).

Taxon	ID	<i>mt-Cytb</i>	<i>mt-Co1</i>	<i>éxon 28-Vwf</i>	Localidade	Ref
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	EU302694.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Itamaraty	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	EU302695.1,	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I.	1,2
	CRB2569	EU302696.1				
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	EU302697.1,	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Urumari	1,2
	CRB2627	EU302698.1,				
	CRB2628	EU302699.1				
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	EU302700.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Tigre	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	EU302701.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	EU302702.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	EU302703.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu	1,2
<i>M. macrura</i>	JLP15214/T3521	L23356.1	Sem GB	AJ849312.1	BR: AM, perto de Miranda, rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	JLP15394	L23357.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	JLP7191	L23358.1	Sem GB	Sem GB	PE: Huampami, rio Cenepa	3
<i>M. macrura</i>	INPA2474	L23359.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Beruri, m.d. rio Purus	3
<i>M. macrura</i>	MNFS465	L23360.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	DWF466	EU313235.1	Sem GB	Sem GB		5
<i>M. macrura</i>	JLP7197	EU313236.1	Sem GB	Sem GB	PE: Huampami, rio Cenepa	5
<i>M. macrura</i>	MNFS1717	EU313237.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Colocação Vira-Volta, m.e. rio Juruá, Ig. Arabidi	4
<i>M. macrura</i>	MNFS894	EU313238.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Altamira, m.e. rio Juruá	4

Abreviações: i. = ilha, ig.= igarapé, m.e.= margem esquerda, PE= Peru, o estado brasileiro (BR) é AM=Amazônia. Sem GB= sem número de acesso do GenBank

4. RESULTADOS

4.1. Análises cariotípicas

Foram encontrados quatro cariótipos entre as amostras estudadas, todos eles inéditos. O primeiro cariótipo encontrado foi de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro. Para caracterização do cariótipo foram cariotipados o macho CRB2839 e a fêmea CRB2841 que mostraram $2n=72$ e $NF=134$ (Figura 3). O complemento autossômico é composto por 32 pares de cromossomos de dois braços variando gradativamente em tamanho de grande a pequeno, e 3 pares de acrocêntricos pequenos. O cromossomo sexual, X é um submetacêntrico grande e o Y é um cromossomo acrocêntrico pequeno. Não foi possível encontrar metáfases completas com banda CGB e GTG.

O segundo cariótipo encontrado de *M. aff. didelphoides*. Para a caracterização do mesmo foram cariotipados o macho CRB1801 e a fêmea CRB2496 que mostraram um cariótipo inédito com $2n=76$ e $NF=134$ (Figura 4). O complemento autossômico é composto por 30 pares cromossomos de dois braços, sendo um submetacêntrico grande, o maior da composição, e o restante variando gradativamente em tamanho de grande a pequeno, e 7 pares de acrocêntricos, sendo o primeiro par maior que os demais, que não possuem grande variação em tamanho. O cromossomo sexual X é um metacêntrico grande e o Y o menor cromossomo de dois braços da composição. As bandas CBG e GTG não foram possíveis para estes espécimes devido a pouca quantidade de metáfases nas preparações.

O terceiro cariótipo foi encontrado em *M. didelphoides* de Caracarái, estado de Roraima. Para a caracterização do cariótipo, foram cariotipados o macho JAO2295 e a fêmea JAO2298 que mostraram $2n=64$ e $NF=100$ (Figura 5). O complemento autossômico é formado por 19 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, variando em tamanho de grande a pequeno, e 24 cromossomos acrocêntricos, sendo o primeiro par maior, com quase o dobro do tamanho em relação aos demais que possuem pouca variação de tamanho entre eles. O cromossomo sexual X é um submetacêntrico grande e o Y é um cromossomo metacêntrico pequeno. As bandas GTG e CBG (Figuras 6 e 7) ajudam a confirmar a montagem do cariótipo em coloração convencional, por evidenciarem a posição do centrômero no caso da banda CBG, e por facilitarem o pareamento em GTG. O

bandeamento CBG, mostrou bandas positivas para todos os cromossomos, salvo o cromossomo sexual Y, que totalmente heterocromático.

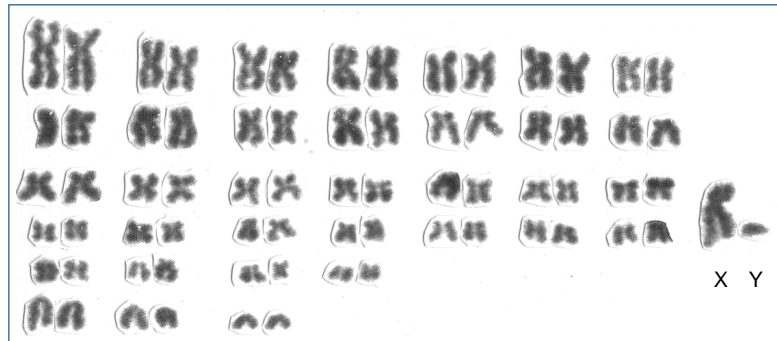


Figura 3. Cariótipo de *M. aff. macrura* em coloração convencional do macho CRB2839 com $2n=72$ e $NF=134$.

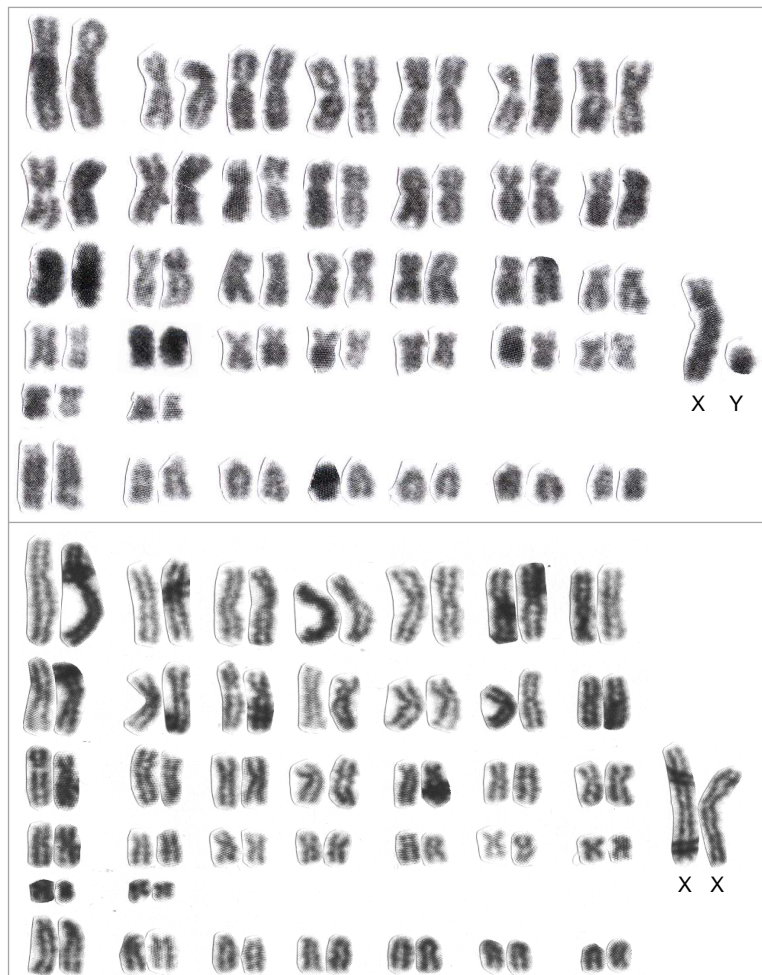


Figura 4. Cariótipo de *M. aff. didelphoides* em coloração convencional com $2n=76$ e $NF=134$, do macho CRB1801 em cima, e da fêmea CRB2496 em baixo.

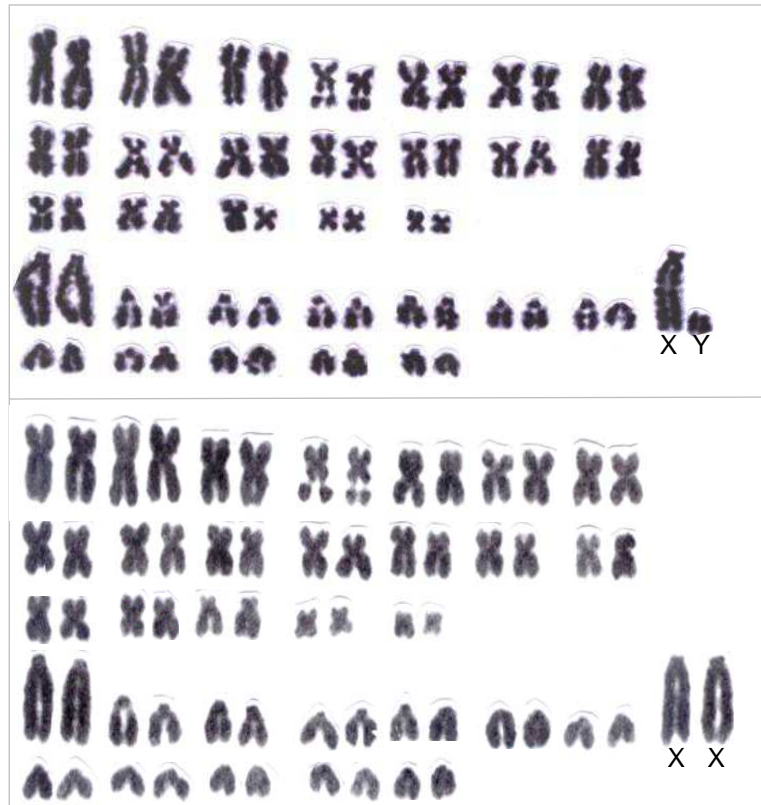


Figura 5. Cariótipos de *M. didelphoides* em coloração convencional com $2n=64$ e $NF=100$, acima macho JAO2295 e abaixo fêmea JAO2298, ambos de Caracaraí, RR.

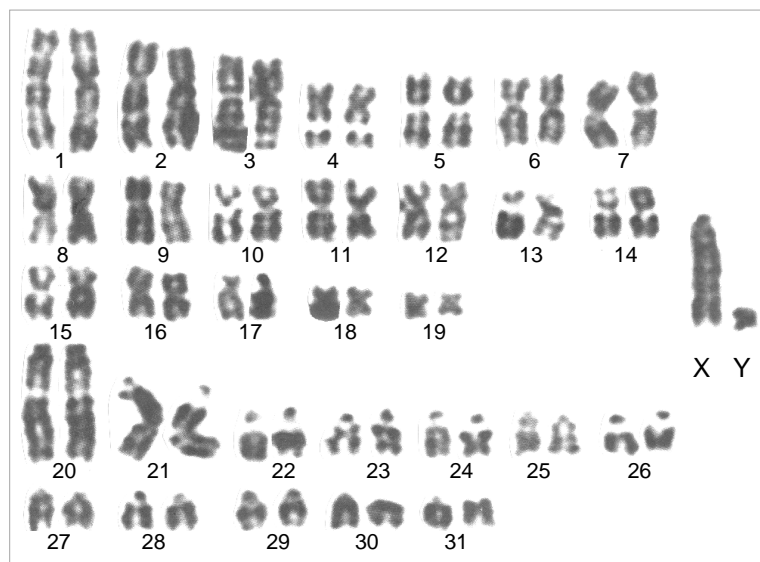


Figura 6. Cariótipo de *Makalata didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$ do espécime JAO2295 ♂ de Caracaraí, RR, com banda GTG

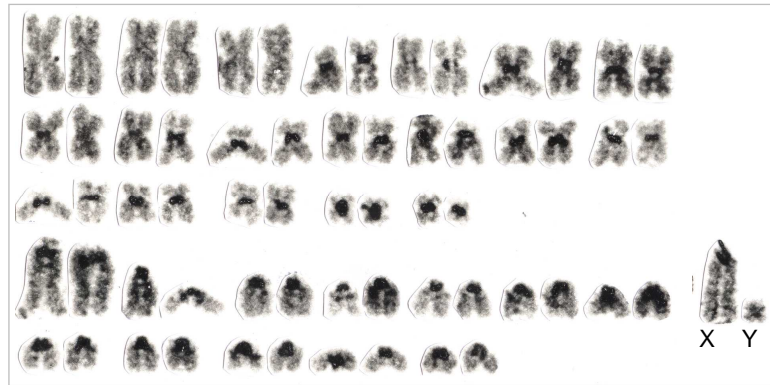


Figura 7. Cariótipo de *Makalata didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$ do espécime JAO2295 ♂ de Caracaraí, RR, com banda CBG.

O quarto cariótipo encontrado no macho CRB3717, único espécime de *Makalata didelphoides* de São Valério da Natividade. Este novo cariótipo possui $2n=68$ e $NF=132$, e o complemento autossômico é formado por 33 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos que variam de tamanho grande a pequeno. (Figura 8). O cromossomo sexual X é um submetacêntrico grande e o Y um metracêntrico pequeno, o menor da composição. Não foi possível obter nenhuma das bandas para esta preparação.

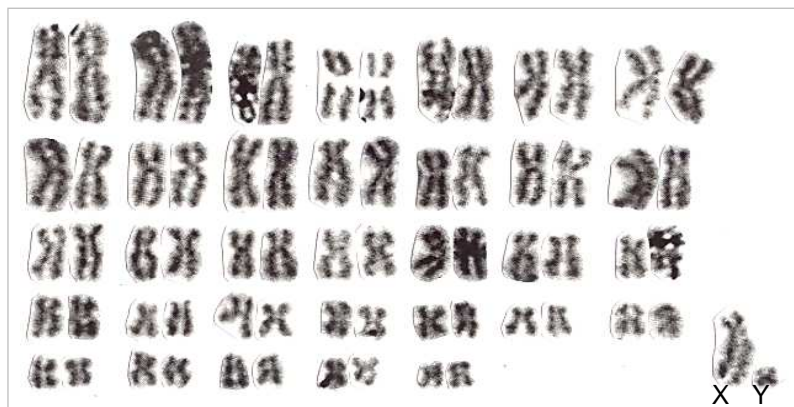


Figura 8. Cariótipo de *M. didelphoides* em coloração convencional com $2n=68$ e $NF=132$, do espécime macho CRB3717 de São Valério da Natividade, TO.

4.2. Análises filogenéticas

Os resultados obtidos para cada gene são apresentados separadamente. Para o gene *mt-Cytb* foram sequenciados apenas seis amostras de *M. didelphoides* da região de Caracaraí, RR, uma vez que as demais amostras já haviam sido sequenciadas e estão disponíveis no GenBank. Para o *mt-Co1* e o *éxon 28-Vwf*, foram sequenciadas 10 *M. aff. macrura*, cinco *M. didelphoides* e quatro *M. aff. didelphoides* e para o *intron 7-Fgb* foram sequenciadas nove *M. aff. macrura* e duas *M. didelphoides* e três *M. aff. didelphoides*. Não foi possível sequenciar as demais amostras com este marcador devido a problemas com o sequenciamento da fita reversa. No intuito de descartar a possibilidade de contaminação, para todas as amostras que apresentaram resultados discordantes entre as topologias, foram refeitos todos os passos desde a extração de DNA, para cada uma destas amostras em separado.

4.2.1. Gene mitocondrial citocromo *b* - *mt-Cytb*

Foi sequenciado o *mt-Cytb* completo de cinco amostras de *M. didelphoides* e analisadas com as 33 sequências de *mt-Cytb* de *Makalata* disponíveis no GenBank (Tabelas 4 e 5). A análise das 39 sequências revelou nove sequências e nove haplótipos de *M. macrura*, 10 sequências e cinco haplótipos de *M. aff. macrura*, 16 sequências e 13 haplótipos de *M. didelphoides*, e quatro sequências e quatro haplótipos de *M. aff. didelphoides* (Tabela 6), totalizando 31 haplótipos. As estimativas de distância genética intraespecífica (Tabela 7) variaram de 0,1 a 7,0% para *M. macrura*, de 0,1 a 12,2% para *M. didelphoides*, de 0,1 a 0,5% para *M. aff. macrura*, e de 0,2 a 2,8% para *M. aff. didelphoides*. As estimativas de distância genética interespecífica variaram de 17,1 a 18,2% entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*, 13,1 a 17,8% entre *M. macrura* e *M. didelphoides*, 13,4 a 17,3% entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, 10,1 a 13,9% entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides* e 9,2 a 11,2% entre *M. macrura* e *M. aff. macrura*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de *mt-Cytb* de *Makalata* foi o HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição gamma) que é um modelo que assume frequências de base iguais e considera as taxas de transições e transversões como sendo igual a um. As árvores resultantes da análise Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (MV) foram geradas utilizando este mesmo modelo. As análises de MV e IB geraram topologias semelhantes confirmando o

monofiletismo de *Makalata* [1 probabilidade posterior (pp) e 99% bootstrap(BS)] e das espécies *M. didelphoides* e *M. macrura*. Os haplótipos de *Makalata* aparecem divididos em dois clados, um com *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, aqui designado complexo *Didelphoides*, e o outro com *Makalata macrura* e *M. aff. macrura*, aqui designado complexo *Macrura* (Figura 9).

O clado complexo *Didelphoides*, com altos valores de suporte [1 probabilidade posterior (pp) e 91% bootstrap (BS)], ficou dividido em dois grupos, um com haplótipos de *M. didelphoides* (0,8 pp, 79% BS) e outro com haplótipos do interflúvio dos rios Negro e Branco (1 pp, 100% BS), sugerindo uma linhagem diferente de *M. didelphoides*, aqui nomeada de *M. aff. didelphoides*. No clado *M. didelphoides* os haplótipos da Bolívia (1 pp, 100% BS) se separaram do clado com os demais haplótipos (1 pp, 88% BS). Neste último clado, o haplótipo LHE595 de Altamira, PA é a primeira linhagem a divergir seguida do clado (1 pp, 99% BS) com haplótipos de Caracaraí, e do clado com o restante dos haplótipos (1 pp, 97% BS). Neste último clado o haplótipo de Cayenne aparece como grupo irmão do clado com haplótipos do TO e PA (1 pp, 84% BS), com os haplótipos de localidades do Tocantins (1 pp, 100% BS) agrupados à parte do clado com haplótipos do Pará (1 pp, 100% BS, Figura 9).

O complexo *Macrura* (1 pp, 100% BS) aparece dividido em dois clados, um com haplótipos de *M. macrura* (1 pp, 91% BS) como grupo irmão do clado (1 pp, 100% BS) com haplótipos das ilhas do rio Negro, aqui designados *M. aff. macrura*. O clado dos haplótipos de *M. macrura* aparece dividido em dois, um apenas com o haplótipo de Beruri, AM, e o outro (1 pp, 98% BS) com o restante dos haplótipos divididos em dois grupos, um com haplótipos do Peru e de Colocação do Vira –Volta sem suporte, e outro (0,9 pp, 96% BS) com haplótipos da região do rio Juruá, no estado do Amazonas.

Tabela 15. Lista de haplótipos do *mt-Cytb*, discriminando o táxon, número de campo ou museu (ID), número do GenBank, e localidade de coleta. BO= Bolívia, GF= Guiana Francesa, PE= Peru. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig. = igarapé, I.= ilha do rio Negro, PARNA=Parque Nacional. m.e.=margem esquerda

Hap	Taxon	ID	GENBANK	Localidade
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	EU302703.1	BR: AM, Barcelos, I. Cururu
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	EU302694.1	BR: AM, Barcelos, I. do Itamaraty
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628	EU302698.1, EU302699.1	BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
HB	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568, CRB2569	EU302695.1, EU302696.1	BR: AM, Barcelos, I.
HC	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	EU302697.1	BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
HC	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	EU302701.1	BR: AM, Barcelos, I. Giriau
HD	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	EU302700.1	BR: AM, Barcelos, I. do Tigre
HE	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	EU302702.1	BR: AM, Barcelos, I. Budari
HF	<i>M. macrura</i>	JLP7191	L23358.1	PE: Huampami (Aguaruma Village), rio Cenepá
HG	<i>M. macrura</i>	JLP7197	EU313236.1	PE: Huampami (Aguaruma Village), rio Cenepá
HH	<i>M. macrura</i>	JLP15214	L23356.1	BR: AM, perto de Miranda, rio Juruá
HI	<i>M. macrura</i>	JLP15394	L23357.1	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá
HJ	<i>M. macrura</i>	MNFS465	L23360.1	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá
HK	<i>M. macrura</i>	MNFS894	EU313238.1	BR: AM, Altamira, m.e. rio Juruá
HL	<i>M. macrura</i>	MNFS1717	EU313237.1	BR: AM, Colocação Vira-Volta, m.e. rio Juruá, Ig. Arabidi
HM	<i>M. macrura</i>	DWF466	EU313235.1	
HN	<i>M. macrura</i>	INPA2474	L23359.1	BR: AM, Beruri, m.d. rio Purus
HO	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	EU302690.1	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
HP	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	EU302691.1	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
HQ	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	EU302692.1	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
HR	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273		BR: RR, Caracarái, PARNA Viruá
HS	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291		BR: RR, rio Anauá próximo ao rio Branco
HS	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295		BR: RR, Caracarái, rio Anauá
HT	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297		BR: RR, Caracarái, rio Anauá
HU	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311		BR: RR, Caracarái, rio Anauá
HV	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717		BR: TO, São Valério da Natividade
HW	<i>M. didelphoides</i>	ECH4	EU313230.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, rio Iténez, m.e., PARNA Noël Kempff Mercado
HW	<i>M. didelphoides</i>	TTS383	EU313234.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, rio Iténez, m.e., PARNA Noël Kempff Mercado
HX	<i>M. didelphoides</i>	V1251, V1566	EU302704.1, EU302705.1	GF: Cayenne
HZ	<i>M. didelphoides</i>	LHE554	L23361.1	BR: PA, Altamira, m.e. rio Xingu
HAA	<i>M. didelphoides</i>	LHE595	L23362.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu
HAB	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	L23363.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu
HAC	<i>M. didelphoides</i>	LHE632	L23364.1	BR: AM, Altamira, m.e. rio Xingu
HAD	<i>M. didelphoides</i>	TTS380	EU313233.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, m.e. rio Iténez, PARNA Noël Kempff Mercado
HAE	<i>M. didelphoides</i>	LCP700	EU313231.1	BR: TO, rio Santa Teresa
HAF	<i>M. didelphoides</i>	LCP716	EU313232.1	BR: TO, rio Santa Teresa

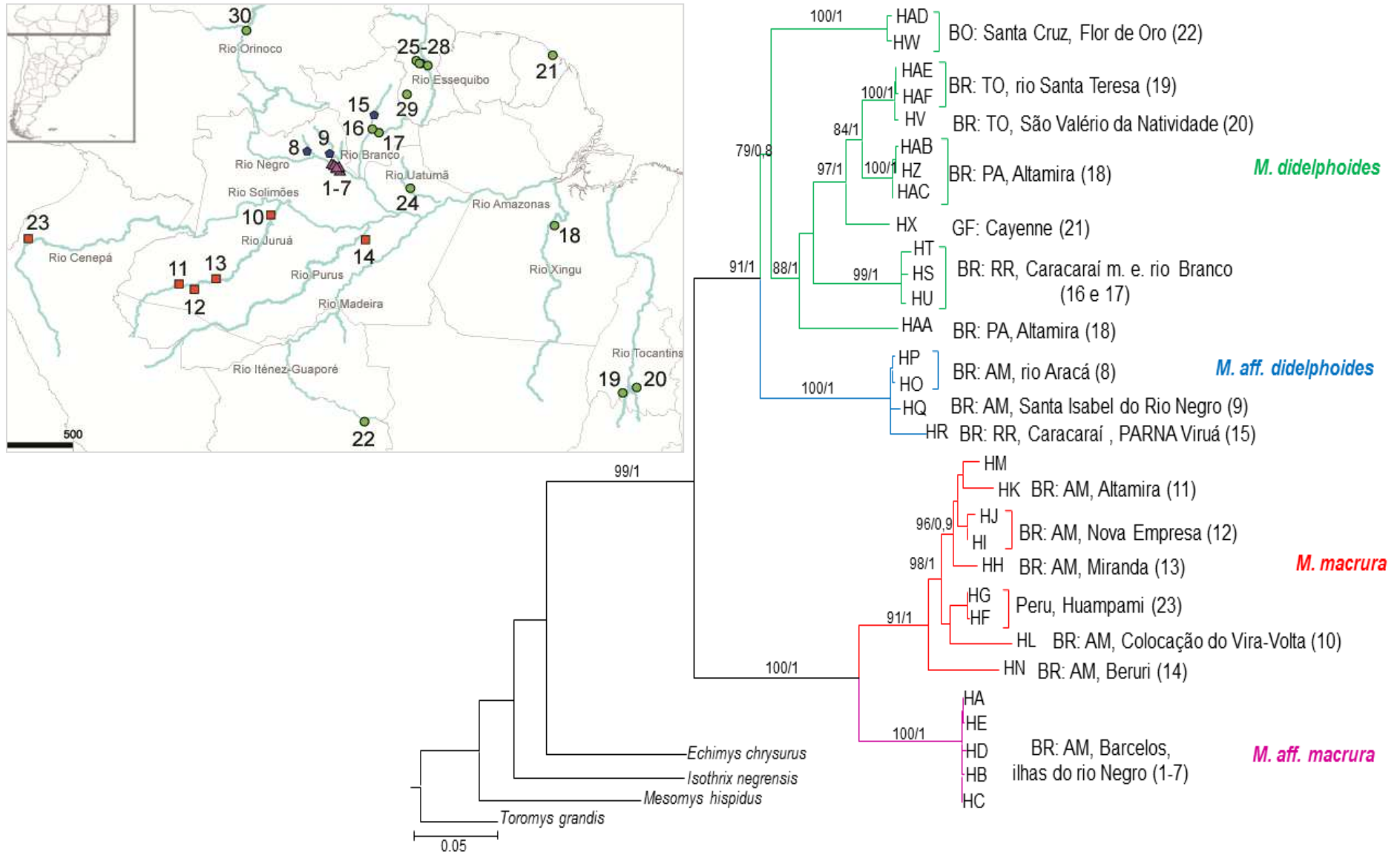


Figura 9. Topologia de ML para o gênero *Makalata* com o *mt-Cytb*. Os números próximos aos ramos são os valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos ver tabela 6. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia e os números entre parêntesis são referentes às localidades do mapa.

4.2.2. Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1- *mt-Co1*

As análises das sequências do *mt-Co1* de cinco amostras de *M. didelphoides* obtidas neste trabalho e 25 disponíveis no GenBank revelaram 13 haplótipos, as quatro sequências de *M. aff. didelphoides* aqui obtidas revelaram quatro haplótipos, e as 10 amostras de *M. aff. macrura* aqui sequenciadas revelaram quatro haplótipos, num total de 21 haplótipos para este marcador (Tabela 8). As estimativas de distância genética intraespecíficas com o modelo Kimura 2-parâmetros (Tabela 9) variaram de 0,2 a 0,6% para *M. aff. macrura*, de 0,2 a 1,8% para *M. aff. didelphoides*, e de 0,2 a 14,5% para *M. didelphoides*. As estimativas de distância genética interespecíficas (Tabela 9) variam de 9,0 a 12,3 entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides*, de 11,6 a 15,0 entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, e de 12,1 a 12,7 entre *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de *mt-Co1* de *Makalata* foi o TrN (Tamura & Nei, 1993) + G (distribuição gamma) que é um modelo que considera as frequências de variação de bases, taxas de transversões iguais e taxas de transição variável. As topologias resultantes da análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança foram geradas utilizando este mesmo modelo.

As análises filogenéticas geraram topologias semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* [93% bootstrap (BS), 1 probabilidade posterior (pp)], com a maioria dos ramos bem suportados. O gênero ficou dividido em dois clados, (1) primeiro sem suporte agrupando os haplótipos da reserva de Iwokrama (localidade 25 a 28, Figura 10), (2) o segundo com pouco suporte (66% BS, 0,9 pp), com o restante das linhagens, *M. didelphoides*, *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Neste segundo clado os haplótipos ficaram divididos em três ramos, (a) o primeiro (100% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura* das localidades 1 a 7, e o haplótipo CRB3717 de *M. didelphoides* da localidade 20 em São Valério da Natividade, (b) o segundo (99% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. didelphoides* das localidades 8, 9 e 15, (c) o terceiro, sem suporte, com haplótipos de *M. didelphoides* das localidades 16 e 17, agrupado com os haplótipos da localidade 19 em Tocantins (Hc21), localidade 29 no Alto Takutu-Alto Essequibo, na Guiana, e localidade 30 em Pozon, na Venezuela.

Tabela 8. Lista de haplótipos de *Makalata* com *mt-Co1*, discriminando a espécie, números de campo ou museu (ID), números do GenBank, e as localidades. BO= Bolívia, GY= Guiana, PE= Peru. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig. = igarapé, i.= ilha do rio negro, PARNA=Parque Nacional.

Hap	Taxon	ID	GENBANK	Localidade
Hc1	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793		BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hc2	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801		BR: AM, Barcelos, Ig. Bigorna
Hc5	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496		BR: AM, Sta Isabel do Rio Negro
Hc9	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273		BR: RR, Caracaraí, PARNA Viruá
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466		BR: AM, Barcelos, I. do Itamaraty
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628		BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840		BR: AM, Barcelos, I. Budari
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841		BR: AM, Barcelos, I. Cururu
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568		BR: AM, Barcelos, rio Negro, ilha
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2569		BR: AM, Barcelos, rio Negro, I.
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832		BR: AM, Barcelos, I. do Tigre
Hc7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626		BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
Hc8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839		BR: AM, Barcelos, I. Giriau
Hc10	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291		BR: RR, rio Anauá
Hc10	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2297, JAO2311		BR: RR, Caracaraí, rio Branco
Hc3	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717		BR: TO, São Valério da Natividade
Hc11	<i>M. didelphoides</i>	ROM109023	JF458608	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama
Hc11	<i>M. didelphoides</i>	ROM107377, ROM107375, ROM107374, ROM107362, ROM107371	JF458610, JF458613, JF458614, JF458617, JF458627	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc12	<i>M. didelphoides</i>	ROM109072, ROM107100,	JF458609, JF458624,	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc12	<i>M. didelphoides</i>	ROM111775	JF458626	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama
Hc13	<i>M. didelphoides</i>	ROM107373, ROM107372, ROMF39284,	JF458615, JF458616, JF458620,	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, RIO Burro Burro
Hc13	<i>M. didelphoides</i>	ROM109074	JF458623	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc14	<i>M. didelphoides</i>	ROM109166, ROM109236, ROM109073	JF458618, JF458619, JF458625	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc15	<i>M. didelphoides</i>	ROM111622, ROM111609	JF458628, JF458621	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama
Hc16	<i>M. didelphoides</i>	ROM111621	JF458629	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama
Hc17	<i>M. didelphoides</i>	ROMF38836	JF458611	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc17	<i>M. didelphoides</i>	ROMF39480	JF444311	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc18	<i>M. didelphoides</i>	ROM119133	JF458622	GY: AltoTakutu-Alto Essequibo,

Hc19	<i>M. didelphoides</i>	ROM107376	JF458612	sítio Dadanawa GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc20	<i>M. didelphoides</i>	ROM107837	JF458607	VE: Pozon, 50Km NE Puerto Ayacucho
Hc21	<i>M. didelphoides</i>	UFMG 3012	JF297658	BR: TO, rio Santa Teresa

Tabela 9. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de *Makalata* com o marcador *mt-Co1*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Para identificação dos hapótipos veja Tabela 9.

Hap.	Amostras	Hc1	Hc2	Hc5	Hc9	Hc20	Hc10	Hc15	Hc14	Hc17	Hc13	Hc16	Hc11	Hc12	Hc19	Hc18	Hc21	Hc3	Hc4	Hc6	Hc7		
Hc1	CRB1793																						
Hc2	CRB1801	0,2																					<i>Makalata aff. didelphoides</i>
Hc5	CRB2496	0,6	0,5																				
Hc9	JAO2273	1,1	1,3	1,8																			
Hc20	JF458607	9,8	9,6	9,0	9,4																		
Hc10	JAO2295	9,9	9,8	9,6	9,2	7,2																	
Hc15	JF458628	10,1	9,9	10,5	9,8	9,8	7,7																
Hc14	JF458616	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,5															
Hc17	JF444311	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,3	0,5														<i>Makalata didelphoides</i>
Hc13	JF458619	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,2	0,3	0,2													
Hc16	JF458624	10,5	10,3	10,9	10,1	10,1	7,7	0,3	0,5	0,3	0,2												
Hc11	JF458629	10,7	10,5	11,1	9,9	9,8	7,2	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5											
Hc12	JF458613	10,7	10,5	11,1	9,9	10,0	7,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5	0,3										
Hc19	JF458612	10,9	10,7	11,3	10,1	10,1	7,7	0,6	0,8	0,6	0,5	0,6	0,5	0,2									
Hc18	JF297658	10,9	10,7	10,9	10,1	6,3	7,8	9,8	10,0	10,0	10,0	10,2	10,0	10,0	10,2								
Hc21	JF458622	10,9	11,1	11,3	10,1	6,7	7,6	11,1	11,3	11,3	11,3	11,5	11,3	11,3	11,5	6,7							
Hc3	CRB3717	12,1	11,9	12,3	12,1	13,7	11,4	13,3	12,7	13,1	13,1	13,3	13,1	13,1	13,1	12,6	14,5						
Hc4	CRB2840	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,2					<i>Makalata aff.</i>
Hc6	CRB2626	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,5	0,3				<i>macrura</i>
Hc7	CRB2568	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,5	0,3	0,3			
Hc8	CRB2839	12,5	12,3	12,7	12,5	14,1	11,8	13,7	13,1	13,5	13,5	13,7	13,5	13,5	13,5	13,0	15,0	0,6	0,5	0,2	0,5		

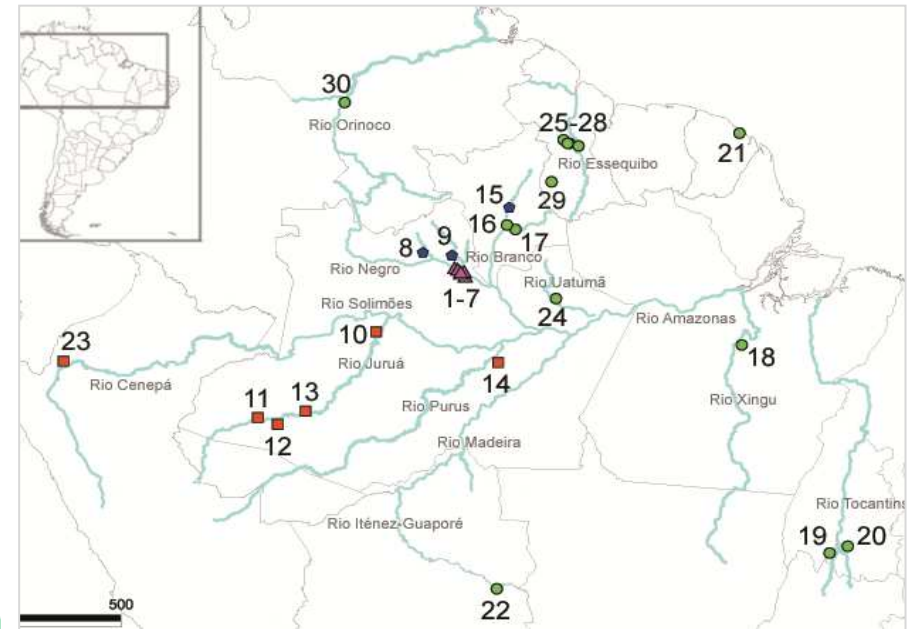
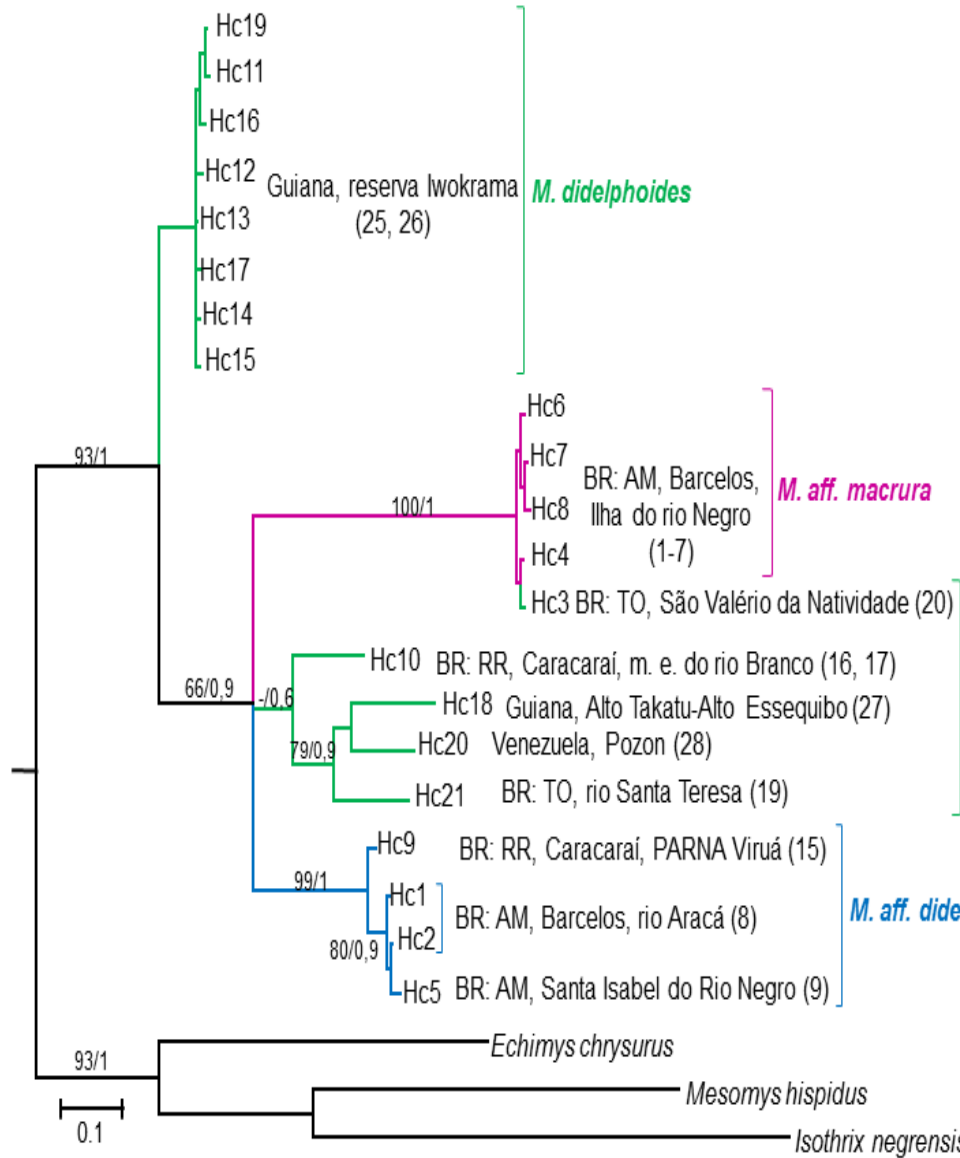


Figura 10. Topologia de ML para o gênero *Makalata* com o *mt-Co1*. Os números próximos aos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos ver tabela 9. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia, os números entre parênteses fazem referência aos números das localidades do mapa.

4.2.3. Íntron 7 do gene Beta-fibrinogênio - íntron 7-Fgb

A análise das sequências do íntron 7-Fgb de duas amostras de *M. didelphoides* revelou um haplótipo, de três amostras de *M. aff. didelphoides* revelou dois haplótipos, e de nove amostras de *M. aff. macrura* revelou cinco haplótipos, totalizando oito haplótipos em 14 amostras de *Makalata* (Tabela 10). As distâncias genéticas intraespecíficas estimadas com o modelo Kimura 2-parâmetros (Tabela 11) variaram de 0 a 0,4% para *M. aff. didelphoides*, 0,3 a 1,5% para *M. aff. macrura*, 0 a 0,6% para *M. didelphoides*, 0,4 a 1,8% entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*, e 0,2 a 0,5% entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*. As distâncias genéticas interespecíficas estimadas variam de 0,2 a 0,5 entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, e de 0,4 a 1,8 entre *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* e de 0,5 a 0,6 entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de íntron 7-Fgb de *Makalata* foi GTR - General time reversible (Rodríguez *et al.*,1990) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição gamma) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança foram feitas usando esse mesmo modelo. As análises confirmaram o monofiletismo de *Makalata*, no entanto as topologias diferiram e poucos ramos foram bem suportados (Figuras 11). Com este marcador os haplótipos de *M. aff. macrura* aparecem agrupados com haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*. Em ambas as topologias o maior valor de suporte apresentado é o do clado que inclui o haplótipo de *M. aff. didelphoides* (69% BS, 0,8 pp).

Tabela 10. Lista de haplótipos do *íntron 7-Fgb*, discriminando a espécie, número de campo (ID), e a localidade. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM) e Roraima (RR). Ig.=igarapé, I.= ilha

Hap	Taxon	ID	Localidade de coleta
Hb1	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793, CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hb3	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Itamaraty
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Urumari
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
Hb4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, rio Negro, ilha
Hb5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Urumari
Hb6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Tigre
Hb7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
Hb8	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco

Tabela 11 Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de *Makalata* com o marcador *íntron 7-Fgb*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Para identificação dos haplótipos veja tabela 9.

Hap	Amostras	Hb1	Hb3	Hb4	Hb6	Hb5	Hb2	Hb7	
Hb1	CRB1793								<i>M. aff. didelphoides</i>
Hb3	CRB2496	0,4							
Hb4	CRB2568	0,7	0,4						
Hb6	CRB2832	0,7	0,4	0,3					
Hb5	CRB2626	1,1	0,8	0,4	0,7				<i>M. aff. macrura</i>
Hb2	CRB2466	1,4	1,1	0,7	0,9	0,3			
Hb7	CRB2841	1,8	1,4	1,4	1,5	1,2	1,2		
Hb8	JAO2311	0,6	0,5	0,3	0,5	0,2	0,5	0,3	<i>M. didelphoides</i>

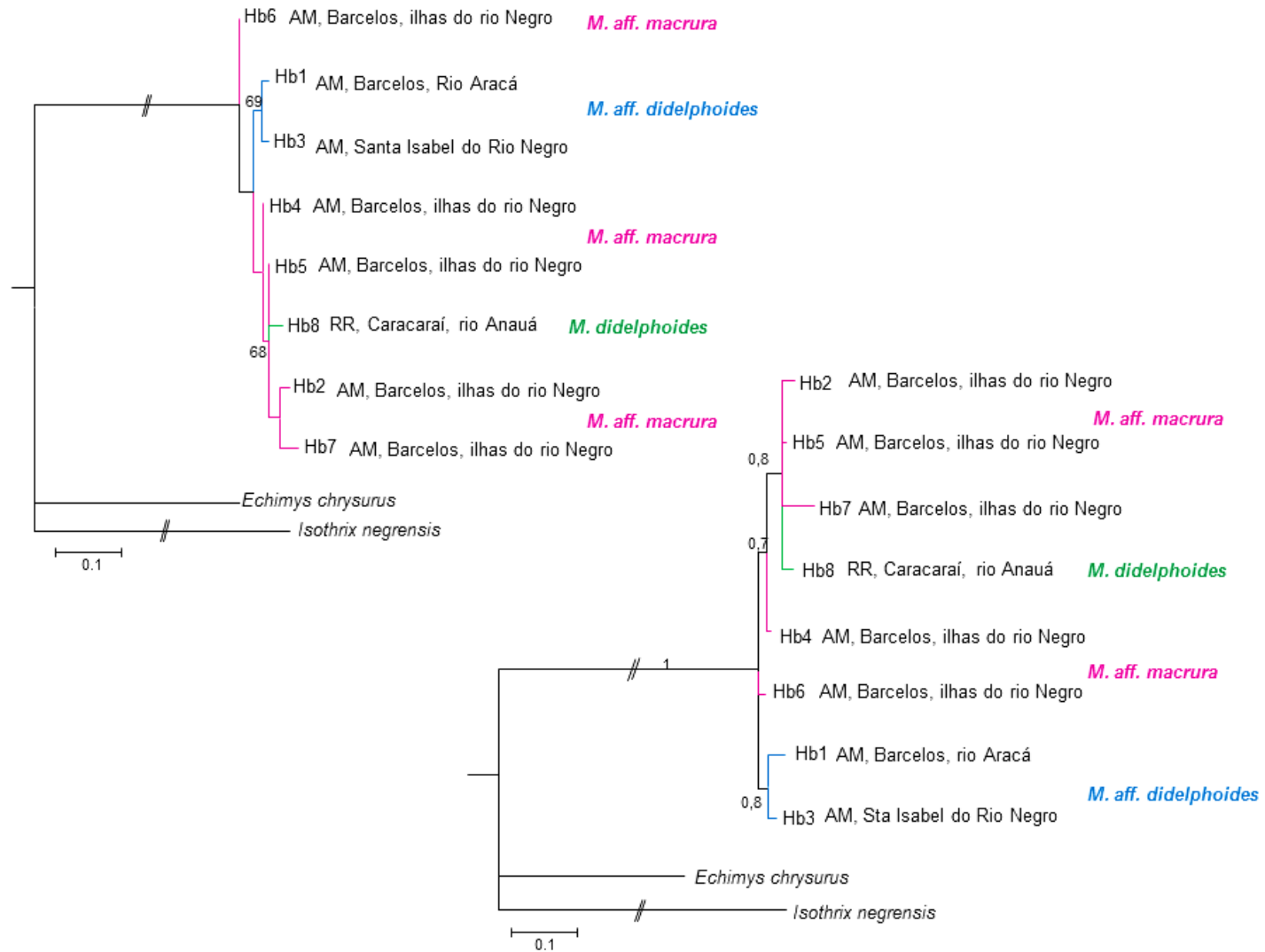


Figura 11. Topologia de MV a esquerda e de IB a direita, para *Makalata* com *íntron 7-Fgb*. Valores próximos aos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 ou probabilidade posterior. Para identificação dos haplótipos ver Tabela 11.

4.2.4. Éxon 28 do fator de Von Willebrand – éxon 28-Vwf

A análise das sequências do éxon 28-Vwf foi realizada para 22 amostras de *Makalata*, sendo sete de *M. didelphoides*, destas cinco foram sequenciadas neste trabalho, quatro de *M. aff. didelphoides*, uma de *M. macrura* do GenBank e 10 de *M. aff. macrura*. Todas as sequências, revelaram haplótipos exclusivos (Tabela 12). As estimativas de distância genética intraespecíficas com o modelo Kimura 2-parâmetros mostraram variação de 0,1 a 1,2% em *M. didelphoides*, 0,1 a 1,5% em *M. aff. macrura* e 0,8 a 1,1% em *M. aff. didelphoides* (Tabela 13). As estimativas de distância genética interespecíficas (Tabela 13) variaram de 0,8 a 1,5 entre *M. macrura* e *M. didelphoides*, de 0,8 a 1,8 entre *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, 0,9 e 1,8 entre *M. macrura* e *M. aff. macrura*, e de 1,1 a 2,7 entre *M. didelphoides* e *M. aff. macrura*, 1,2 a 1,5 entre *M. macrura* e *M. aff. didelphoides*, e 1,3 a 2,4 entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de éxon 28-Vwf de *Makalata* foi o GTR - General time reversible (Rodríguez *et al.*, 1990) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição *gamma*) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança (Figura 12) foram feitas usando esse mesmo modelo. As topologias de MV e IB foram semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* (99% BS, 1 pp), dividido em dois clados, um sem suporte com os haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, e o outro (62% BS, 0,9 pp) com um haplótipo de *M. macrura* como grupo irmão do clado (90% BS, 0,9 pp) com haplotipos de *M. aff. macrura*. O clado (90% BS, 1 pp) de *M. didelphoides* apresenta três haplótipos colapsados, um subclado (99% BS, 1 pp) com haplótipos de TO e PA, outro (72% BS, 1 pp) com os haplótipos Hv17 e Hv18 de Caracarái. O clado (72% BS, 0,9 pp) de *M. aff. didelphoides* apresenta o haplótipo de Santa Isabel do Rio Negro separado do clado (67% BS, 0,9 pp) com os haplótipos do rio Aracá. No clado do complexo Macrura a única amostra de *M. macrura* fica como grupo irmão do clado (96% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro e um haplótipo de *M. aff. didelphoides* de Caracarái.

Tabela 16. Lista de haplótipos de *éxon 28-Vwf* (Hv) de *Makalata*, discriminando o táxon, número de campo ou de museu (ID) e localidade. Os estados brasileiros são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig.= igarapé, I.= Ilha do rio Negro.

Hap	Táxon	ID	Localidade
Hv1	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
Hv2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Itamaraty
Hv3	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, ilha do rio Negro
Hv6	<i>M. aff. macrura.</i>	CRB2569	AM, Barcelos, rio Negro, I.
Hv7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
Hv9	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, I. Tigre
Hv10	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
Hv11	<i>M. macrura</i>	JLP15214	AM, Miranda, rio Juruá
Hv12	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hv13	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hv14	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
Hv15	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	RR, Caracaraí, PARNA Viruá
Hv16	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	RR, Caracaraí, rio Anauá
Hv17	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv18	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv19	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv20	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	TO, São Valério da Natividade
Hv21	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	PA, Altamira, rio Xingu
Hv22	<i>M. didelphoides</i>	UFMG3012	TO, rio Santa Teresa

Tabela 13. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre os haplótipos de *Makalata* com o marcador *éxon 28-Vwf*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Veja tabela 13 para identificação dos haplótipos.

Hap	Amostras	Hv5	Hv7	Hv2	Hv8	Hv1	Hv15	Hv9	Hv3	Hv6	Hv10	Hv4	Hv11	Hv14	Hv12	Hv13	Hv16	Hv19	Hv18	Hv20	Hv17	Hv22	
Hv5	CRB2568																						
Hv7	CRB2626	0,1																					
Hv2	CRB2466	0,2	0,1																				
Hv8	CRB2839	0,4	0,3	0,2																			
Hv1	CRB2841	0,5	0,4	0,3	0,2																		
Hv15	JAO2273	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6																	
Hv9	CRB2832	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,9																
Hv3	CRB2627	0,6	0,5	0,4	0,6	0,7	0,9	0,4															
Hv6	CRB2569	0,6	0,6	0,7	0,9	0,8	1,1	0,8	0,7														
Hv10	CRB2840	0,9	0,8	0,7	0,6	0,6	0,9	0,6	0,6	1,3													
Hv4	CRB2628	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8	1,3	0,7	0,7	1,5	0,7												
Hv11	JLP15214	1,2	1,1	1,0	0,9	0,9	1,2	1,2	1,1	1,8	1,0	1,4											
Hv14	CRB2496	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,8	1,6	1,6	1,9	1,6	1,8	1,2										
Hv12	CRB1793	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	2,0	1,6	1,8	2,1	2,0	2,1	1,5	1,1									
Hv13	CRB1801	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,9	1,9	1,9	2,4	1,7	2,0	1,2	1,0	0,8								
Hv16	JAO2291	1,4	1,3	1,2	1,1	1,1	1,4	1,4	1,4	1,9	1,2	1,6	0,8	0,9	1,1	0,8							
Hv19	JAO2311	1,5	1,4	1,3	1,2	1,2	1,5	1,5	1,5	2,0	1,3	1,7	0,9	1,0	1,2	0,9	0,1						
Hv18	JAO2297	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,6	1,6	1,6	2,1	1,4	1,8	1,0	1,1	1,3	1,0	0,2	0,3					
Hv20	CRB3717	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,6	1,6	1,6	2,1	1,4	1,8	1,1	1,1	1,4	1,1	0,3	0,4	0,5				
Hv17	JAO2295	1,9	1,8	1,7	1,5	1,6	2,0	1,9	1,9	2,4	1,6	2,0	1,4	1,4	1,6	1,4	0,6	0,6	0,4	0,6			
Hv22	UFMG3012	2,0	2,0	1,9	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	2,6	1,9	2,2	1,5	1,6	1,8	1,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,2		
Hv21	LHE600	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	2,2	2,1	2,1	2,7	2,0	2,3	1,5	1,6	1,8	1,6	0,8	0,8	0,9	1,0	1,2	0,2	

M. aff. macrura

M. macrura

M. aff. didelphoides

M. didelphoides

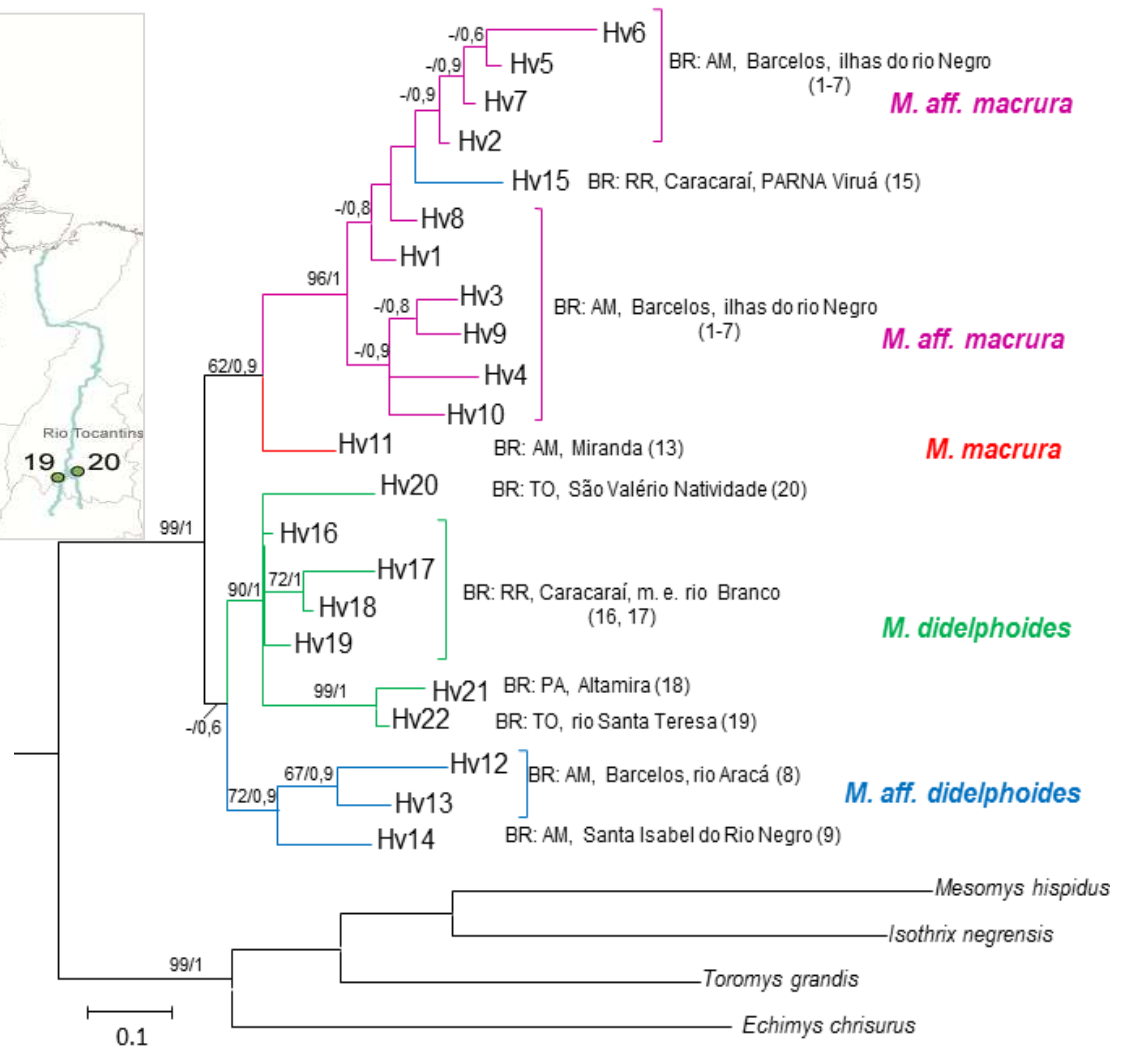
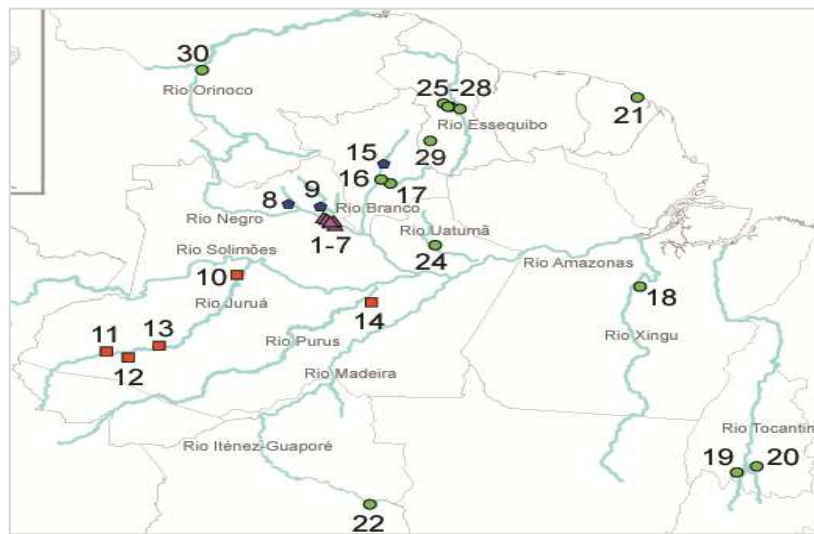


Figura 12. Topologia para o gênero *Makalata* com o éxon 28-Vwf. Os números nos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos veja tabela 13. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia. Os números entre parêntesis são referentes as localidades do mapa.

4.2.5. Análise concatenada de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf*

Para a análise concatenada utilizou-se apenas um marcador mitocondrial e um nuclear no intuito de manter na análise o máximo de haplótipos por linhagens. Para o marcador *mt-Co1* grande parte das amostras não foram sequenciadas para os outros marcadores, e não possuímos sequências de *M. macrura* para este marcador.

A análise das sequências concatenadas do *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* foi realizada para 22 amostras de *Makalata*, sendo sete *M. didelphoides* e destas duas são do GenBank, quatro de *M. aff. didelphoides*, e 10 de *M. aff. macrura*, e uma de *M. macrura* disponível no GenBank e todas revelaram haplótipos exclusivos (Tabela 14).

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências concatenadas de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* de *Makalata* foi o GTR - General Time Reversible (Rodríguez *et al.*, 1990) + G (distribuição *gamma*) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança (Figura 13) foram feitas usando esse mesmo modelo. As topologias de MV e IB foram semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* (100% BS, 1 pp), dividido em dois clados, um com os haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides* (97% BS, 1 pp), e o outro (100% BS, 1 pp) com um haplótipo de *M. macrura* como grupo irmão do clado (100% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura*. O clado com haplótipos de *M. didelphoides* (99% BS, 1 pp) se divide em um clado com haplótipos de TO e PA (100% BS, 1 pp), e outro com os haplótipos de Caracaraí da margem esquerda do rio Branco (100% BS, 1 pp).

Tabela 14. Lista de haplótipos das sequências concatenadas de *mt-Cytb* e do *éxon 28-Vwf* de *Makalata*, discriminando o táxon, número de campo ou de museu (ID) e localidade. Os estados brasileiros são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig.= igarapé, I.= Ilha do rio Negro.

Hap	Táxon	ID	Localidade
H1	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Itamaraty
H2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, ilha do rio Negro
H3	<i>M. aff. macrura.</i>	CRB2569	AM, Barcelos, rio Negro, I.
H4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, I. Tigre
H8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
H9	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
H10	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
H11	<i>M. macrura</i>	JLP15214	AM, Miranda, rio Juruá
H12	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
H13	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
H14	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
H15	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	RR, Caracaraí, PARNA Viruá
H16	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	RR, Caracaraí, rio Anauá
H17	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	RR, Caracaraí, rio Branco
H18	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297	RR, Caracaraí, rio Branco
H19	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco
H20	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	PA, Altamira, rio Xingu
H21	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	TO, São Valério da Natividade
H22	<i>M. didelphoides</i>	UFMG3012	TO, rio Santa Teresa

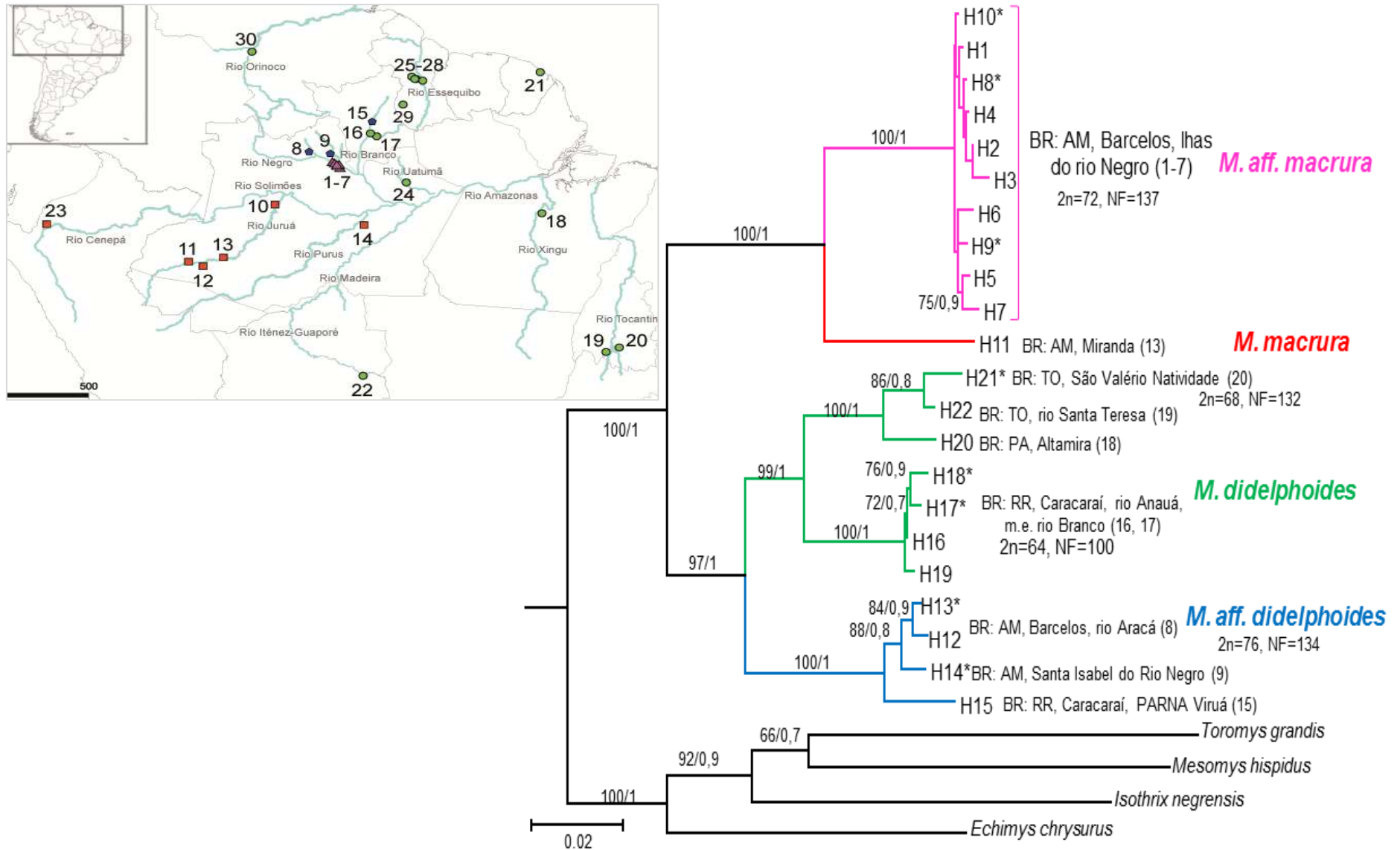


Figura 13. Topologia para *Makalata* com dados concatenado de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf*. Os números nos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos espécimes veja tabela 15. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia. 2n= número diploide e NF = número fundamental. Os valores entre parênteses são referentes às localidades do mapa e os asteriscos são referentes aos haplótipos cariotipados.

4.3. Análises de rede de haplótipos

A análise de Median-Joining com o *mt-Cytb* (Figura 14) foi realizada com 39 sequências de *Makalata*, sendo 15 de *M. didelphoides*, 4 de *M. aff. didelphoides*, 10 de *M. macrura* e 10 de *M. aff. macrura*. Foram feitas três análises, uma com todos os haplótipos do gênero, uma com o complexo de espécie *Didelphoides*, e uma com o complexo de espécies *Macrura*. A análise com todo o gênero mostrou os complexos *Didelphoides* e *Macrura* separados por pelo menos 87 passos mutacionais e quatro vetores médios (Figura 14).

A análise com o complexo de espécie *Didelphoides* (Figura 15) apresentou dois grupos: (A) o primeiro com haplótipos de *M. aff. didelphoides* distantes por pelo menos 66 passos mutacionais do segundo (B) grupo com haplótipos de *M. didelphoides*. O grupo B se divide em cinco subgrupos separados por vários vetores médios e passos mutacionais: (B1) haplótipos da Bolívia separados por pelo menos 74 passos mutacionais dos demais haplótipos do complexo, (B2) com haplótipo do Cerrado e do Pará, (B3) com o haplótipo HAA do Pará separado por pelos menos 55 passos mutacionais dos demais, (B4) com haplótipos da margem esquerda do Rio Branco separados por pelo menos 43 passos mutacionais, e (B5) com haplótipos das Guianas. O centro da rede é composto por diversos vetores médios interligados entre si e entre cada grupo de haplótipos.

A análise com o complexo de espécies *Macrura* (Figura 16) mostrou dois grupos, o primeiro com haplótipos de *M. aff. macrura* separados por 61 passos mutacionais do segundo com haplótipos de *M. macrura*. O grupo de *M. macrura* possui muitos vetores médios no eixo central de onde se ramificam os haplótipos. O haplótipo de Beruri, AM (rio Purus) é o que mais se afasta dos demais haplótipos do grupo, com 39 passos mutacionais.

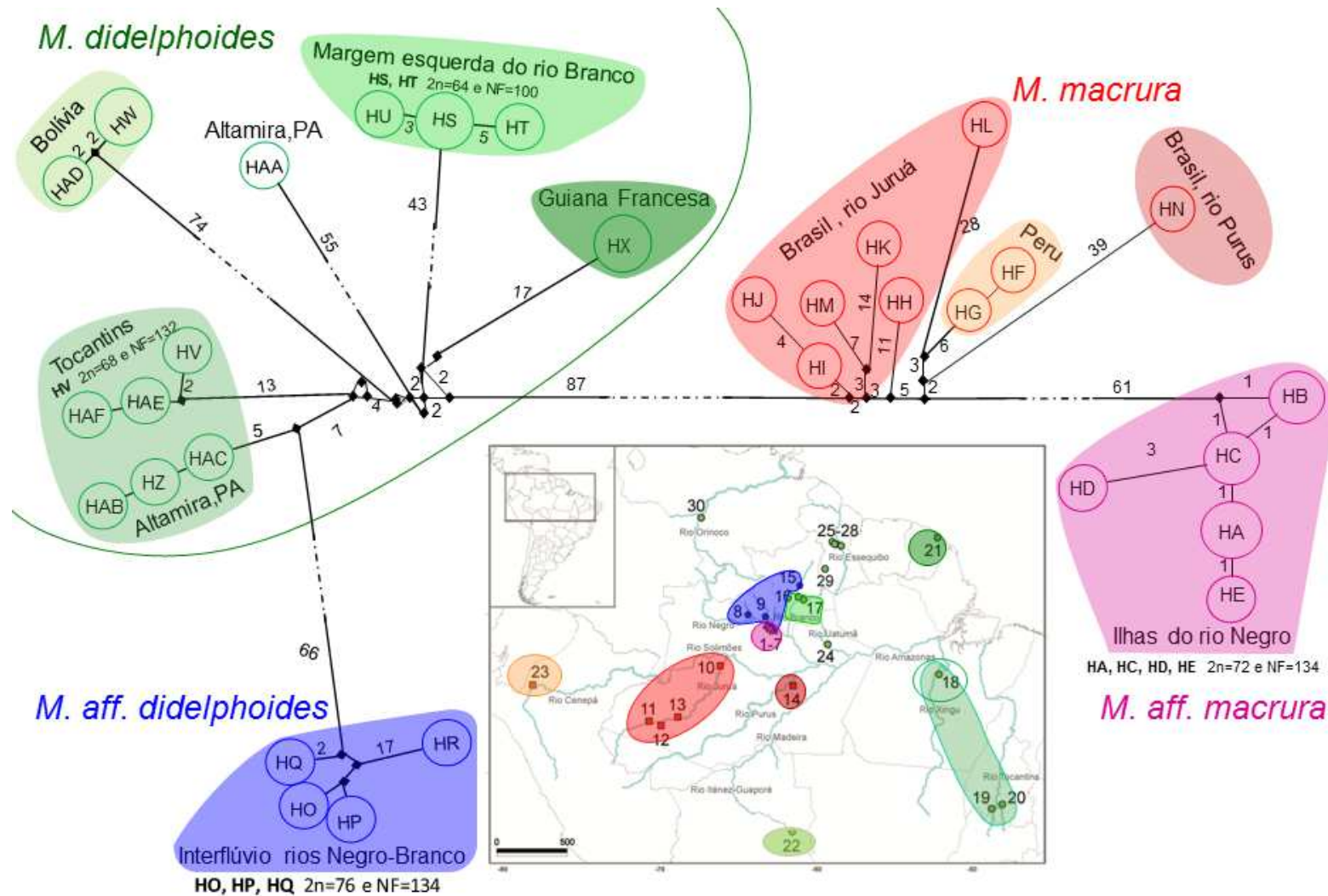


Figura 14. Análise de median-joining para *Makalata* com *mt-Cytb*. Círculos representam haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de seqüências que compartilham. Lozangos representam vetores médios. Números próximos as linhas representam os passos mutacionais. Azul *M. aff. didelphoides*, verde *M. didelphoides*, vermelho *M. macrura*, roxo *M. aff. macrura*. Para identificação dos haplótipos ver tabela 7. 2n= número diplóide e NF = número fundamental. **BRASIL: Amazonas**, Barcelos (1-7) ilhas do rio Negro, (8) rio Aracá; (9) Santa Isabel do Rio Negro; rio Juruá: (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda; rio Purus (14) Beruri. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa; (20) São Valério da Natividade. **GUIANA FRANCESA**: (21) Cayenne. **BOLIVIA**: Santa Cruz (22) Flor de Oro. **PERU**: (23) Huampami.

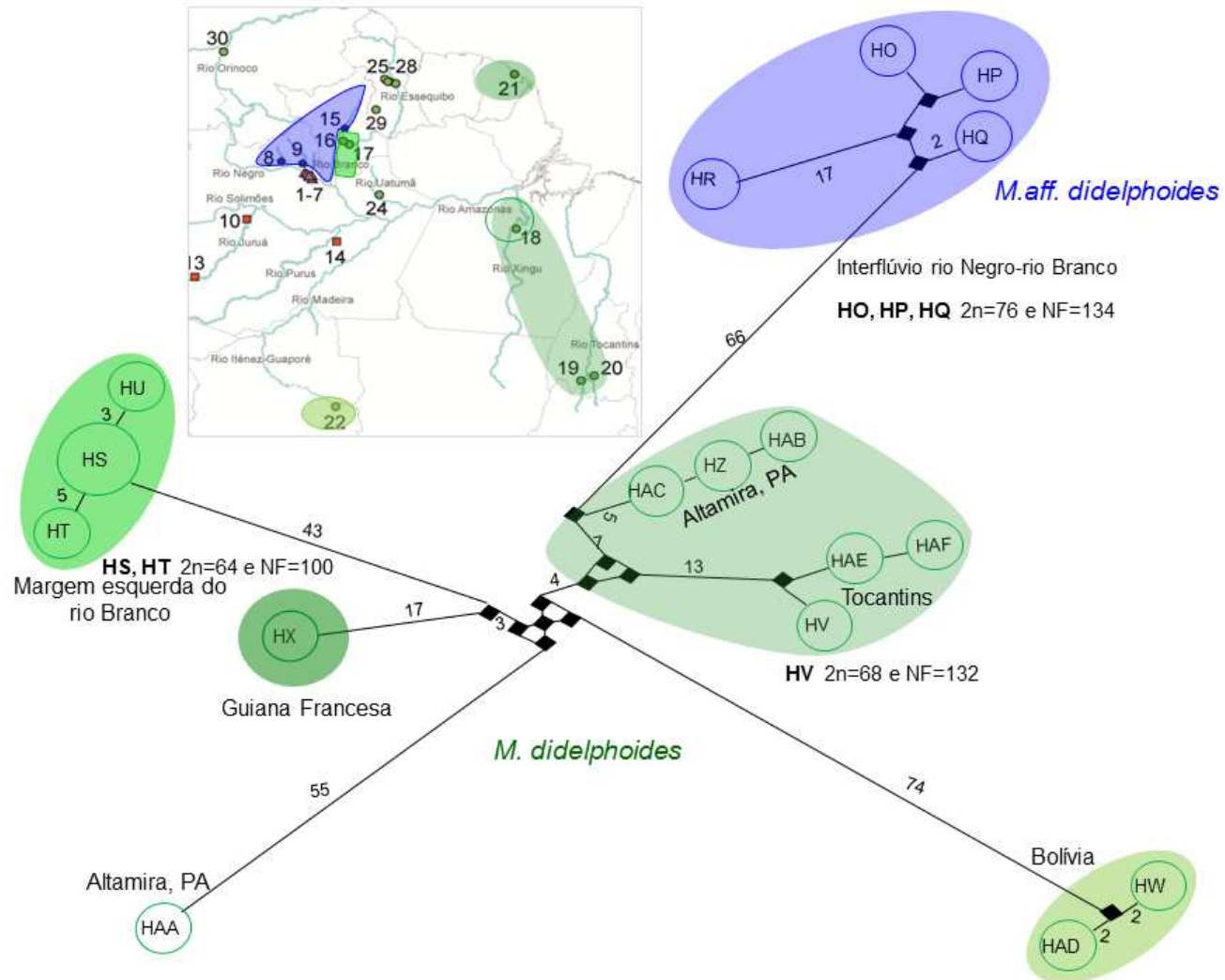


Figura 15. Análise de *Median-Joining* do complexo *Didelphoides* com haplótipos com *mt-Cytb*. Círculos representam os haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de sequências que compartilham cada haplótipo. Lozangos representam vetores médios. Números próximos às linhas representam os passos mutacionais maiores que 1. Em Azul *M. aff. didelphoides*, verde *M. didelphoides*. Para identificação dos haplótipos ver tabela 7. 2n= número diplóide e NF = número fundamental. BRASIL: **Amazonas**, Barcelos (8) rio Aracá; (9) Santa Isabel do Rio Negro. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa; (20) São Valério da Natividade. GUIANA FRANCESA: (21) Cayenne. BOLÍVIA: **Santa Cruz** (22) Flor de Oro.

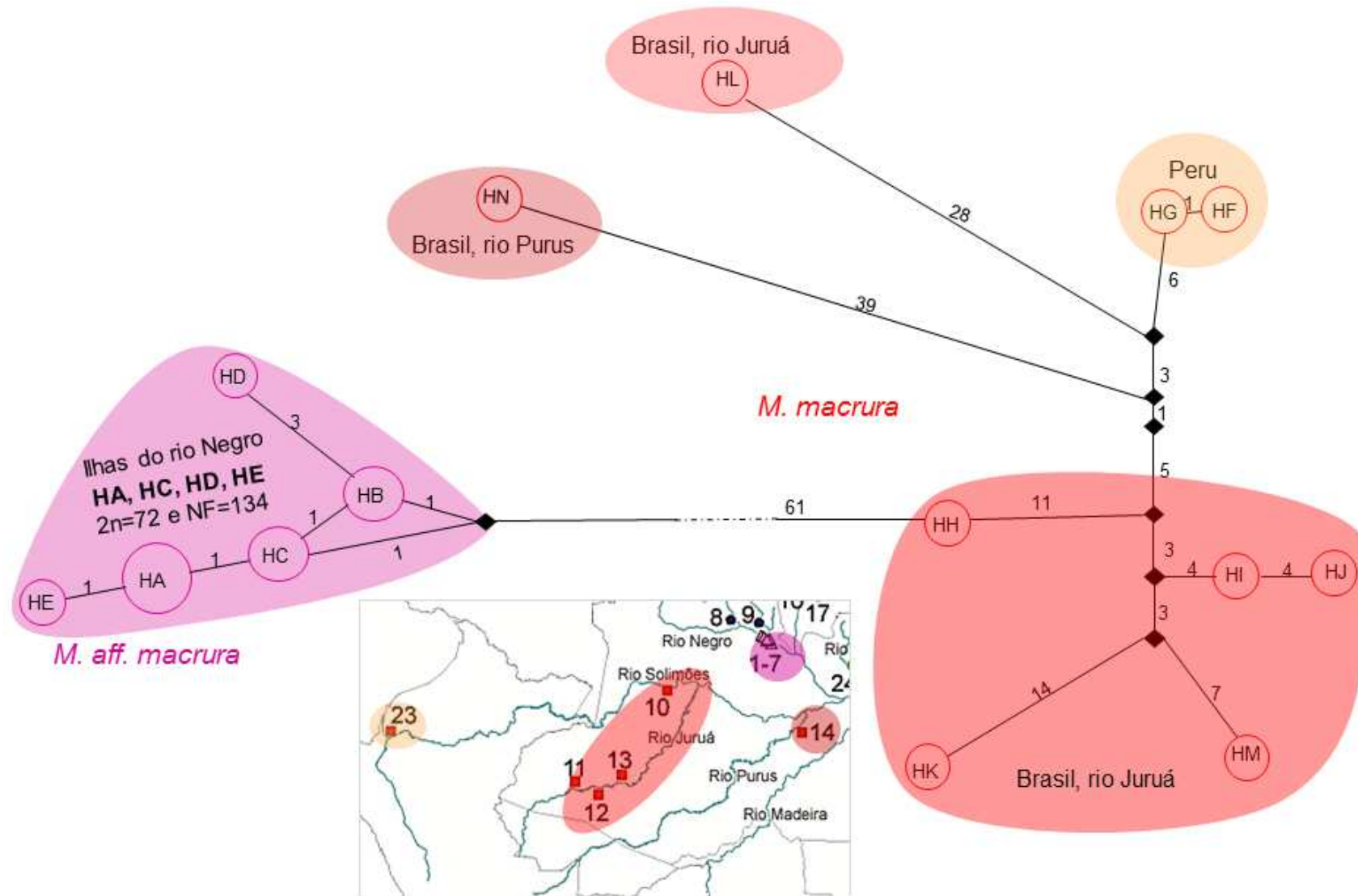


Figura 16. Análise de *Median-Joining* do complexo Macrura com haplótipos de *mt-Cytb*. Círculos representam os haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de indivíduos que compartilham cada haplótipo. Lozangos representam vetores médios. Números próximo as linhas representam os passos mutacionais. Vermelho *M. macrura*, rosa *M.aff. macrura*. Para identificação dos haplótipos veja tabela 7. $2n$ = número diploide e NF = número fundamental. BRASIL: Amazonas, e Barcelos (1-7) ilhas do rio Negro; rio Juruá: (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, (14) Beruri, rio Purus. PERU: (23) Huampami.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variação cariotípica

Existem apenas dois cariótipos descritos para *Makalata*, um com $2n=70$ e $NF=120$ atribuído a *Makalata armata* (Leal-Mesquita, 1991), e outro com $2n=66$ e $NF=106$ atribuído a *M. didelphoides* (Lima *et al.*, 1998). *Makalata armata* é sinônimo júnior de *M. didelphoides* (Emmons 1993). Aqui descrevemos quatro outros cariótipos, diferentes dos já descritos para o gênero (Figuras 11, 12, 13, 16). Espécimes identificados como *M. aff. didelphoides* do interflúvio dos rios Negro-Branco, mostraram $2n=76$ e $NF=134$, sendo este o maior número diplóide para o gênero, mas compartilhando o mesmo número fundamental com o cariótipo com $2n=72$ e $NF=134$ aqui descrito para *M. aff. macrura*, apesar de diferirem na morfologia dos cromossomos como mostram as figuras 12 e 13. Vale salientar que estes dois táxons tem distribuição parapátrica.

Neste trabalho foram encontrados dois cariótipos para espécimes indetificados como *M. didelphoides*. O espécime de *M. didelphoides* do Cerrado de Tocantins possui $2n=68$ e $NF=132$, e os espécimes de Caracaraí da margem esquerdo do rio Branco possuem $2n=64$ e $NF=100$, ambos com os cromossomos apresentando morfologia distinta do cariótipo ($2n=66$ e $NF=106$, Lima *et al.*, 1998) associado a esta espécie. O cariótipo de *M. didelphoides* do Tocantins não apresenta cromossomos acrocêntricos, enquanto o de Balbina (Lima *et al.*, 1998) e o aqui descrito para Caracaraí apresentam de 22 a 24 cromossomos acrocêntricos, respectivamente. Os espécimes de Balbina apresentaram $2n=66$ e $NF=106$, e os espécimes de Caracaraí apresentaram $2n=64$ e $NF=100$, sendo que os espécimes de Caracaraí apresentam maior número de cromossomos acrocêntricos e o primeiro par destes é muito maior que os demais acrocêntricos e não possui homólogos na composição de Balbina.

O cariótipo apresentado por Leal-Mesquita (1991), atribuído a *Makalata armata* da UHE Samuel estado de Rondônia, apresenta $2n=70$ e $NF=120$, embora não possua a morfologia publicada para comparação, podemos supor, pelos números diplóide e fundamental apresentados pela autora, que se trata de um quinto arranjo cariotípico para o gênero. A comparação dos dados citogenéticos mostra a existência de seis cariótipos distintos. Quatro destes cariótipos tiveram representantes sequenciados e utilizados nas análises filogenéticas que mostraram quatro linhagens correspondendo aos quatro cariótipos: um de *M. aff. didelphoides*,

um de *M. aff. macrura* e dois de *M. didelphoides*, que analisando juntamente com os dados moleculares, sugere que *M. didelphoides* pode ser um complexo de espécies.

A figura 19 mostra o mapa das localidades de coleta dos espécimes de *Makalata* e os arranjos cariotípicos disponíveis até o momento. À linhagem de *M. aff. macrura* (triângulos de 1-7) das ilhas do rio Negro foi atribuído o cariótipo A (em rosa) embora geograficamente próxima da linhagem de *M. aff. didelphoides* (pentágonos 8, 9 e 15) com o cariótipo B (em azul), essas linhagens estão separadas pelo rio Negro, e os cariótipos são distintos no $2n$ e NF e na morfologia dos cromossomos (Tabela 14). O cariótipo C (em verde claro) atribuído à linhagem de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco das localidades 16 e 17, possui arranjo distinto do cariótipo E (em verde) encontrado por Lima *et al.* (1998) atribuído a um espécime de *M. didelphoides* coletado em Balbina, AM (localidade 24). A figura permite melhor comparação das proporções de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (maior quantidade em E do que em C) e acrocêntricos (maior quantidade em C do que em E). Alguns pares de cromossomos de C não possuem homólogos em E, deixando claro que são arranjos distintos (valores de $2n$ e NF na tabela 14).

O cariótipo D (em verde mais escuro) atribuído à linhagem de *M. didelphoides* do Cerrado de TO (localidade 20, Figura19), mostra apenas cromossomos metacêntricos/submetacêntricos ($2n$ e NF na tabela 14), e a morfologia deste cariótipo é diferente da morfologia dos cariótipos C e E atribuídos à *M. didelphoides* que possui cromossomos acrocêntricos.

As análises cariotípicas e filogenéticas são concordantes em mostrar *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* como linhagens distintas das demais, e apontam mais uma espécie dentro do que foi identificado como *M. didelphoides*. Apesar de apresentarem o mesmo número fundamental, os cariótipos de *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* apresentam número diplóide e a morfologia dos cariótipos distintos, permitindo sua separação em linhagens distintas. Aliado a isso, *M. aff. didelphoides* apresentou maior relação filogenética com *M. didelphoides*, reforçando a separação de *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Os dois cariótipos aqui atribuídos a espécimes identificados como *M. didelphoides* diferem nos números diplóide e fundamental, sendo impossível derivar um cariótipo do outro sem rearranjos citogenéticos complexos. Aliado a isso, as análises com marcadores mitocondriais e nucleares colocam estes dois cariomorfotipos em grupos distintos, mostrando que pertencem a linhagens distintas.

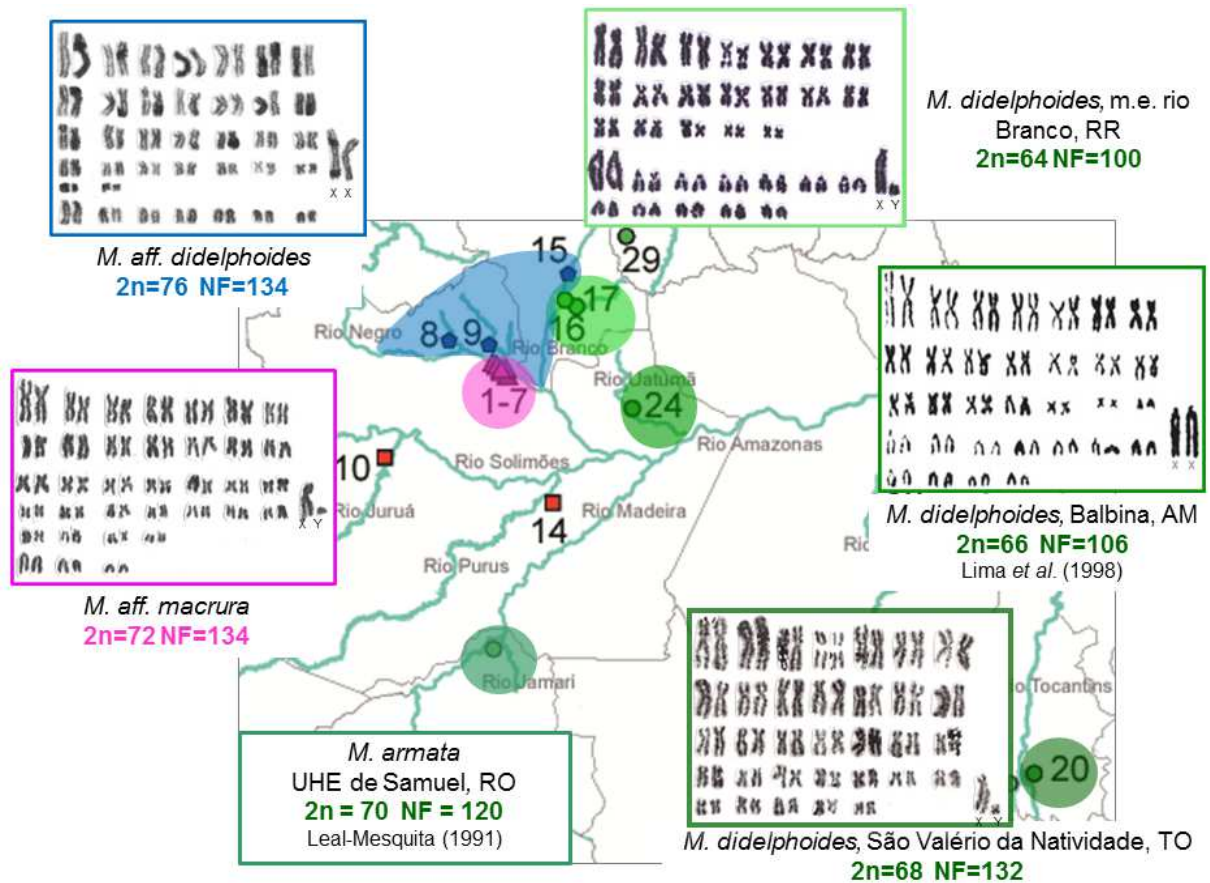


Figura 17. Mapa com os pontos de coleta de *Makalata* e os cariótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, AM das localidades 1-7, de *M. aff. didelphoides* do interflúvio entre os rios Negro e Branco das localidades 8 e 9, de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco, RR das localidades 16 e 17, *M. didelphoides* de São Valério da Natividade, TO da localidade 20, *M. didelphoides* da UHE de Balbina, AM, retirado de Lima *et al.* (1998), localidade 24 e *M. armata* = *M. didelphoides* da UHE de Samuel, RO, de Leal-Mesquita (1991).

Tabela 15. Dados citogenéticos disponíveis para *Makalata*, discriminando o táxon, localidade, números diploide (2n) e fundamental (NF), e referência: 1 = este estudo, 2 = Lima *et al.* (1998), 3 = Leal Mesquita (1991). Os estados brasileiro são: AM = Amazonas, RR = Rorôima, RO = Rondônia.

Taxon	Localidade	2n	Nf	Ref.
<i>M. aff. macrura</i>	AM, Barcelos, Ilhas do Rio Negro	72	134	1
<i>M. aff. didelphoides</i>	AM, Sta Isabel do Rio Negro, interflúvio dos Rios Negro e Branco	76	134	1
<i>M. didelphoides</i>	RR, Caracaraí, m. E. Rio Branco	64	100	1
<i>M. didelphoides</i>	TO, São Valério da Natividade	68	132	1
<i>M. didelphoides</i>	AM, Balbina	66	106	2
<i>M. armata</i>	RO, Rio Jamari	70	120	3

5.2. Relações filogenéticas

O monofiletismo encontrado nas análises filogenéticas para o gênero *Makalata*, corrobora estudos anteriores com os marcadores *mt-Cytb* (Patton *et al.*, 2000; Galewski *et al.*, 2005), *exon 28-Vwf* (Galewski *et al.*, 2005), e com os marcadores *mt-Cytb* e *RAG1* (Patterson & Velazco, 2008). Entretanto, neste último trabalho a análise com o marcador mitocondrial *D-loop* mostrou o gênero *Makalata* sendo parafilético com *Isothrix*; os autores discutem que esta dissonância no *D-loop* seja devido às homoplasias existentes nesta sequência não codificante.

As estimativas de distância genética intraespecífica encontradas no presente estudo foram bem amplas para *M. didelphoides* (0,1 a 12,2%), concordando com o trabalho anterior em que os autores sugeriram a espécie como complexa e variável (Emmons, 2005). Apesar do maior número de haplótipos utilizados, a topologia aqui apresentada para *mt-Cytb* foi semelhante às geradas em outros trabalhos com o mesmo gene (Patton *et al.*, 2000; Patterson & Velazco, 2008). As topologias mostram *Makalata* como monofilético, *M. didelphoides* e *M. macrura* formando clados separados e com alto suporte nos três trabalhos (Figuras 9 e 18).

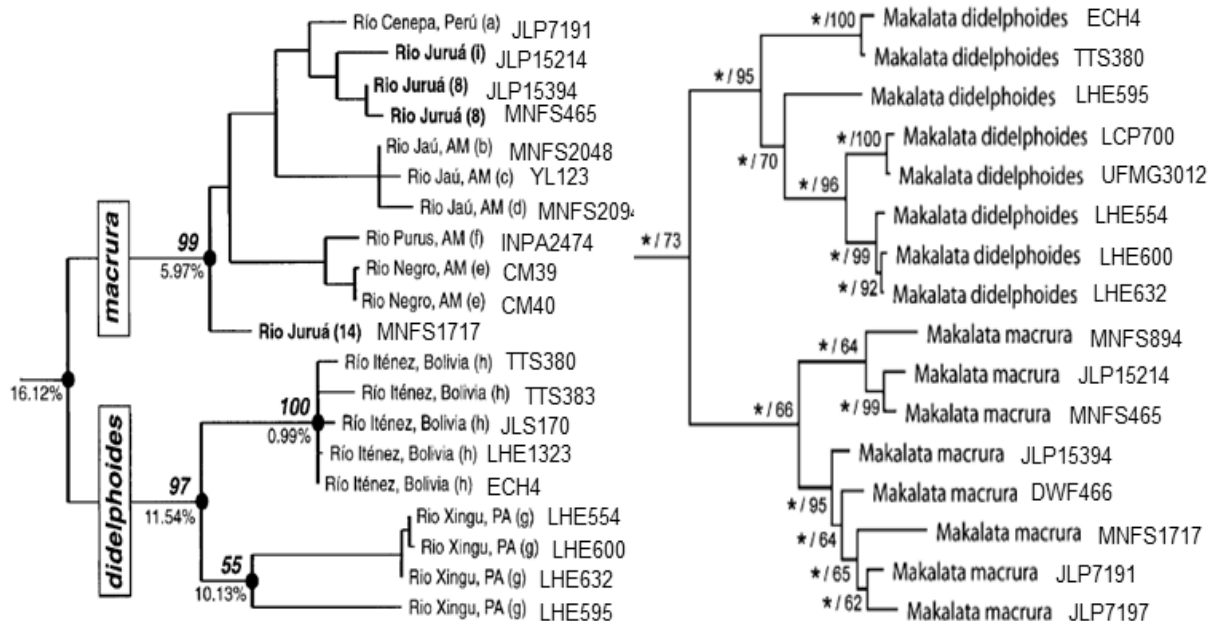


Figura 18. Topologias com *mt-Cytb* publicadas por Patton *et al.* (2000) e Patterson & Velazco (2008), com modificações

Tanto trabalhos anteriores (Patton *et al.*, 2000; Patterson & Velazco, 2008) como o presente estudo, mostram a monofilia de *M. didelphoides* com alto suporte (97% e 95% BS, respectivamente) e divididos em dois clados, um com haplótipos da Bolívia (ambos com bootstrap 100%), e o outro com o restante dos haplótipos. Neste segundo clado, o espécime LHE595 de Altamira, PA, ficou separado dos demais,

não se agrupando com os haplótipos da mesma localidade. Na análise de rede esta amostra (LHE595) também aparece separado dos demais, sugerindo que seja uma linhagem distinta.

Para a espécie *M. macrura* o trabalho de Patton *et al.* (2000) apresenta dois clados. O primeiro, apresenta apenas uma sequência (MNFS1717), do rio Juruá (localidade 10, Figura 2) e o segundo está dividido em dois subgrupos, um com os haplótipos do Arquipélado de Anavilhas, no rio Negro e do rio Purus (INPA 2474, localidade 14, Figura 2), como grupo irmão dos clados com os haplótipos do rio Jaú, AM, e segundo com amostras do Peru (JLP7191, localidade 23, Figura 2) e do rio Juruá, AM (localidades de 12 e 13, Figura 2). No trabalho de Patterson e Velazco (2008), o clado *Macrura* é composto apenas por haplótipos do rio Juruá, AM e do Peru, não recuperando, portanto, a estruturação apresentada por Patton *et al.* (2000). As sequências de Anavilhas, rio Negro e do rio Jaú, não estão disponíveis no GenBank ou em outro banco de dados, sendo apresentadas apenas no trabalho de Patton *et al.* (2000). No presente estudo incluímos todas as sequências utilizadas por Patterson & Velazco (2008), a sequência INPA2474 do trabalho de Patton *et al.* (2000), além das sequências geradas neste trabalho. Neste estudo, o haplótipo de Beruri, AM, rio Purus (INPA2474, localidade 14, Figura 2), aparece separado dos demais, que formam um clado dividido em outros dois clados, um com os haplótipos de Altamira, Miranda e Nova Empresa, todas localidades próximas ao rio Juruá no estado do Amazonas (localidades 11,12 e 13, Figura 2), como grupo irmão do clado com o haplótipo de Colocação do Vira – Volta, AM (localidade 10, Figura 2) e os haplótipos do Peru (JLP 7191 e JLP7197, localidade 23, Figura 2).

As análises filogenéticas com *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* e com estes genes concatenados, apontam pelo menos quatro linhagens evolutivas distintas: (1) *M. macrura*, (2) *M. aff. macrura*, (3) *M. didelphoides*, e (4) *M. aff. didelphoides*. Na análise com *mt-Cytb* a linhagem *M. didelphoides* apresentou maior distância genética em relação as outras linhagens, e para o *éxon 28-Vwf* as maiores distâncias estão entre *M. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Apesar da proximidade geográfica das linhagens *M. aff. macrura* (das ilhas do rio Negro) e *M. aff. didelphoides* (de Santa Isabel do Rio Negro, parte de Barcelos e parte de Caracaraí), elas não são linhagens irmãs e possuem estimativas de distância genética variando entre 17,1 a 18,2% para *mt-Cytb* e 1,3 a 2,4% para *éxon 28-Vwf*. Os espécimes das ilhas do rio Negro (*M. aff. macrura*) agrupam em um clado tendo como grupo irmão os espécimes de *M. macrura*, formando o grupo “*Macrura*”. Os

espécimes de *M.aff. didelphoides* da margem esquerda do rio Negro e margem direita do rio Branco se agruparam com espécimes de *M. didelphoides*, formando o grupo “Didelphoides”. Em estudos anteriores *M. macrura* foi o nome utilizado para designar as *Makalatas* da porção oeste da floresta amazônica e *M. didelphoides* os espécimes a leste (Lara *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 2000; Emmons, 2005; Emmons & Patton, 2015). Nosso estudo mostra que a diversidade de *Makalata* é maior do que esse arranjo, quando consideramos as linhagens *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*.

A análise de rede mostra a linhagem de *M. aff. macrura* quase tão distante de *M. macrura* quanto a linhagem *M. didelphoides*. A linhagem *M. aff. didelphoides* também apresenta uma distancia significativa da linhagem *M. didelphoides*. É importante ressaltar a existência de grupos bem distintos entre o que chamamos de *M. didelphoides* corroborando a hipótese de Emmons (2005) de que se trata de um complexo de espécies.

Na topologia do marcador nuclear *éxon 28-Vwf* o haplótipo *M. aff. didelphoides* (Hv15 que corresponde ao JAO2273) do PARNA Viruá, margem direita do rio Branco (localidade 15, Figura 2 ou 12), aparece agrupado com os haplótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, AM. Levantamos algumas hipóteses para esta situação: (1) contaminação com material de *M. aff. macrura*, descartada após refeito, apenas para esta amostra em separado, todos os passos desde o isolamento do DNA até o sequenciamento. (2) presença de pseudogene (cópia de um gene que perdeu sua função - Bensasson *et al.*, 2001), embora o cromatograma não apresente picos duplos e a sequência não tenha *stop codon*, que são os passos para checar a possibilidade de pseudogene (Leite, 2012), esta hipótese não pode ser de toda descartada. (3) presença de polimorfismo ancestral - embora não sejam simpátricas, as espécies *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* estão geograficamente próximas e é possível que em um passado não muito distante, estas espécies tivessem fluxo gênico ou que tenham derivado de uma mesma população (cladogênese), mantendo informações genéticas ancestrais recuperadas no *exon 28-Vwf*. Os genes mitocondriais por terem uma taxa de substituição de bases maior que os gene nucleares, já diferenciaram a ponto de não mais mostrarem conexões entre estas linhagens (Loss, 2014).

A topologia do marcador *mt-Co1* (Figura10) mostrou uma linhagem da reserva de Iwokrama, ao norte do escudo das Guianas (localidades 25 a 28) em um clado bem separado das demais amostras de *Makalata*, embora com baixo valor de

suporte. Estas sequências foram retiradas do GenBank, não foram publicadas e as amostras não foram sequenciadas para outros marcadores, para comparação. Cogitando a possibilidade de pseudogene chegamos a presença de *stop codons* e possíveis mudanças no *frame* de leitura, não sendo encontrada nenhuma alteração. Sugerimos então uma hipótese biogeográfica para a topologia encontrada, os haplótipos da Guiana que ficaram agrupados em um clado separado dos demais haplótipos de Makalata são da reserva de Iwokrama (localidade 25 a 28, Figura 19 e 20) que está ao norte das terras altas do escudo das Guianas, ficando isolada das demais localidades. Este isolamento geográfico pode ter impedido o fluxo gênico com os demais espécimes das localidades da planície ao sul da elevação. O outro haplótipo da Guiana (Haplótipo Hc18 da localidade 29, Figura 19 e 20), não agrupou ao clado com os demais haplótipos da Guiana, agrupando com outros haplótipos identificados como *M. didelphoides*. O haplótipo Hc18 é da localidade de Alto Takutu-Alto Essequibo, que está ao sul das terras altas do escudo das Guianas, isolada dos demais haplótipos deste país pelas terras mais altas, este haplótipo está em terras baixas da formação do Graben de Takutu, o que possibilita o deslocamento de indivíduos dessa localidade para as outras localidades nas terras baixas do Brasil e Venezuela. A possibilidade de conexão entre as terras baixas da Guiana e da bacia amazônica, ajuda a compreender a proximidade das haplótipos destas regiões (Haplótipos Hc10, Hc18, Hc20 e Hc21, localidades 16 e 17, 29, 30 e 19 respectivamente, Figura 19). Apesar das distâncias geográficas, os haplótipos da Venezuela, sul da Guiana, Norte de Roraima e do sul do Tocantins estão todos na planície da bacia amazônica.

O outro clado da topologia do *mt-Co1* mostrou uma politomia na base, mas as linhagens estão agrupadas de forma parecida com a encontrada com o *mt-Cytb*: um clado com a linhagem de *M. aff. macrura*, outro com a linhagem de *M. didelphoides*, e um terceiro com a linhagem de *M. aff. didelphoides*.

Um resultado discordante na topologia do *mt-Co1* em relação aos outros marcadores, foi a sequência de São Valério da Natividade, TO (da linhagem *M. didelphoides*). Este haplótipo aparece agrupado com os haplótipos de *M. aff. macrura*, na topologia do *mt-Co1* e nas análises dos outros marcadores, aparece agrupado com *M. didelphoides*. As análises da amostra de São Valério da Natividade foram refeitas desde o isolamento do DNA até o sequenciamento, isoladamente, para descartar a hipótese de contaminação. Também foi descartada a hipótese de pseudogene, uma vez que o *frame* de leitura foi conferido, os *stop*

codons não foram encontrados, o cromatograma não apresenta picos duplos, e o gel da PCR apresentou apenas uma banda (Anexo 2). No entanto, a possibilidade de pseudogene não pode ser totalmente descartada sem a realização da clonagem desse produto.

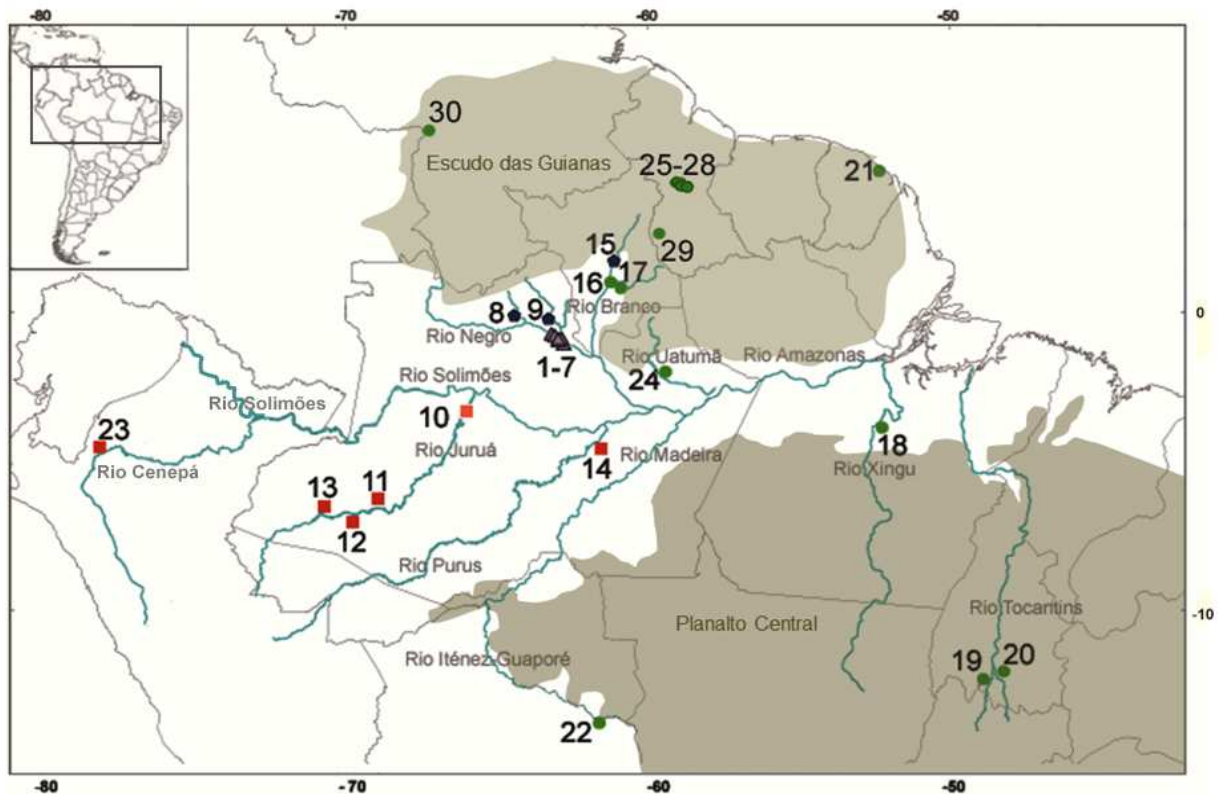


Figura 19. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios e relevo próximos. **Brasil:** Amazonas, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima,** Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará,** (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins,** (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa:** (21) Cayenne. **Bolívia:** Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru:** (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana:** Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela:** Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado = *M. macrura*, triângulos = *M. aff. macrura*, círculos= *M. didelphoides*, pentágono= *M. aff. didelphoides*. Relevo do escudo das Guianas baseado no mapa de Tom Hollowell, NMNH e do Planalto central foi gerado através do programa ArcView.



Figura 20. Mapa mostrando o relevo da Guiana evidenciando os pontos amostrados. Retirado do Google com relevo. **Guiana**: Potaro-Siparuni, **reserva Iwokrama** (25) Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) **Alto Takutu-Alto Essequibo**, sítio Dadanawa.

A topologia gerada pelo marcador *íntron 7-Fgb* mostrou uma politomia, não separando as espécies como os outros três marcadores utilizados, e os suportes para as análises apresentaram valores baixos ($\leq 60\%$). Novamente temos duas hipóteses: (1) pseudogene, mas no cromatograma não aparece picos duplos para as sequências obtidas (Figura 1 do Anexo 3), e como íntron não codifica, não existe stop códons. No entanto, a falha no sequenciamento de um dos iniciadores pode indicar que o amplicon seja um pseudogene e não o gene alvo, dificultando ou impossibilitando a obtenção da sequência (Leite, 2003). Tivemos dificuldades para sequenciar a fita reversa de muitas amostras (não sequencia nada, ou somente poucos pares de base) motivo pelo qual a árvore do *íntron 7-Fgb* possui menor número de sequências para análise, apesar da amplificação ter ocorrido com sucesso. No entanto, isso pode apenas indicar que os iniciadores utilizados não eram adequados para todos os espécimes; (2) irradiação adaptativa - o íntron 7 do *Fgb* é conservado entre vertebrados, mas de evolução rápida e alta variabilidade,

sendo muito usado para análises de grupos recentes (Prychitko & Moore,1997). Prychitko & Moore (2000) propõe que o íntron 7- Fgb tem melhor sinal filogenético para estudos com grupos que divergiram entre 4 e 7 milhões de anos. Segundo Galewski et al.,(2005), a divergência entre as espécies conhecidas de *Makalata* (*M. macrura* e *M. didelphoides*), para o marcador nuclear éxon 28-Vwf, é de 2,3 milhões de anos com variação de (0,2 a 6,6). Portanto, é possível que o gênero possua taxa de substituição nucleotídica maior que a taxa de substituição deste íntron, por isso a topologia para o marcador íntron 7 –Fgb mostra uma politomia.

As análises de rede utilizando o *mt-Cytb*, assim como as árvores filogenéticas apresentaram quatro, ou mais, linhagens evolutivas distintas, cada qual separada por pelo menos 60 passos mutacionais. A maior distância é a que separa as linhagens de *M. macrura* e *M. didelphoides* (87 passos). Assim como estudos anteriores (Patton *et al.*, 2000; Emmons, 2005; Patterson & Velazco, 2008;), os dados da análise de rede sugerem fortemente que *M. didelphoides* é um complexo com linhagens distintas: (1) grupo *M. aff. didelphoides* com $2n=76$ e $NF=134$ e 66 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (2) grupo Bolívia com cariótipo desconhecido e 71 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (3) haplótipo Altamira, PA com cariótipo desconhecido e 55 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (4) Caracaraí na margem esquerda do rio Branco com $2n=74$ e $NF=100$ e 43 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (5) grupo Tocantins com $2n=68$ e $NF=132$, e o restante das amostras (Guiana Francesa, PA). Em toda a rede há diversos vetores médios que sugerem a presença de haplótipos ainda não amostrados ou extintos, mostrando que esse complexo de espécies tem uma alta diversidade haplotípica.

As linhagens de *M. macrura* também apresentam uma alta diversidade e altas estimativas de distância genética, ficando clara a separação de *M. aff. macrura* com $2n=72$ e $NF=134$ por 61 passos mutacionais de *M. macrura* (Figura 12), mas não temos dados de cariótipo e acesso aos crânios desse último táxon.

5.3. Variação geográfica

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permite uma correlação com a hipótese de barreira ribeirinha inferida por Wallace (1854) para o gênero de roedor arborícola *Makalata*, já que alguns rios da bacia Amazônica parecem funcionar como barreira para o fluxo gênico entre algumas linhagens deste gênero. A linhagem de

M. aff. macrura (localidade destacada em rosa na figura 21) é restrita às ilhas do rio Negro, próximas a Barcelos, AM e de acordo com os resultados obtidos mostrou-se distinta das demais linhagens analisadas nos marcadores moleculares e citogenéticos. Para a linhagem de *M. aff. didelphoides* (das localidades destacadas em azul na figura 21) os rios Negro e Branco e o escudo das Guianas parecem funcionar como barreiras geográficas, visto que indivíduos desta linhagem foram encontrados apenas na área do interflúvio destes rios, e essa linhagem divergiu das demais linhagens nos marcadores citogenéticos e moleculares aqui utilizados.

A linhagem de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco (localidades 16, 17) aparece isolada das demais por este rio e pelas terras altas do escudo da Guiana (Figura 21). Esta linhagem diverge nas análises cariotípicas e moleculares. A linhagem de *M. didelphoides* de Balbina está na planície amazônica mas é separada das demais linhagens pelo Escudo das Guianas e pelos rios Amazonas e Negro e também mostrou cariótipo distinto. A linhagem de *M. didelphoides* da Guiana Francesa está isolada das demais linhagens pelo Escudo das Guianas. A linhagem de *M. didelphoides* do planalto central, próximo ao rio Tocantins na região de Cerrado também é geneticamente distinta das demais linhagens, e inserida em um bioma totalmente distinto. A linhagem de *M. didelphoides* da Bolívia localizada ao sul do planalto central, na margem esquerda do rio Iténez-Guaporé, também aparece separada das demais linhagens nas análises filogenéticas.

Resumindo (Figura 21), dentro de *M. didelphoides* (localidades destacadas em tons de verde), algumas possíveis barreiras atuais para as linhagens são os rios Branco, Negro e Itinerez-Guaporé e o escudo das Guianas: (A) espécimes da margem esquerda do rio Branco estão separados dos demais pelo rio Branco e pelas terras altas do escudo das Guianas, (B) espécimes da Guiana Francesa estão separados dos demais pelas terras altas formadas por várias serras, (C) a linhagem do Tocantins é a única a ocupar terras do Cerrado, no alto rio Tocantins, (D) a linhagem da Bolívia está separada das demais pelo rio Itinerez (Guaporé no território brasileiro). Estes dados se somam aos dados citogenéticos e moleculares em mostrando a diversidade subestimada de *Makalata*.

A oeste do rio Madeira e sul do rio Solimões estão distribuídos os espécimes da linhagem de *M. macrura* (Figura 21, localidades destacadas em vermelho). Até o presente momento nenhum cariótipo foi publicado sendo atribuído a esta linhagem, impossibilitando inferências citogenéticas. Patton *et al.* (2000) inferiu que o rio Juruá

não é barreira efetiva para os espécimes de *Makalata* encontrados nas margens deste rio, possivelmente porque o rio Juruá é um rio de meandros, e já os rios Negro e Branco são rios de águas escuras ou barrentas e não são rios de meandro, apresentando maior eficiência como barreira geográfica.

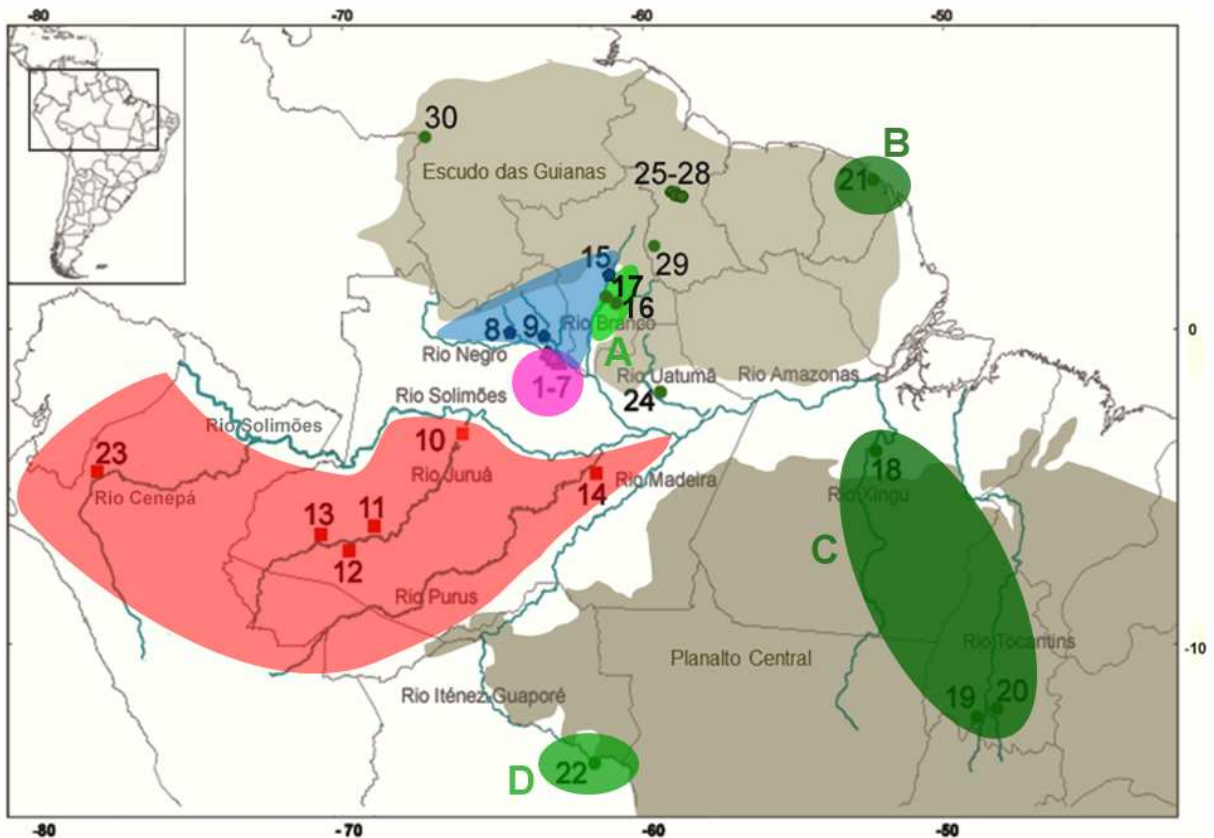


Figura 21. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados, destacando os rios e relevo próximos e as linhagens de *Makalata*. **Brasil: Amazonas**, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa**: (21) Cayenne. **Bolívia**: Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru**: (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana**: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela**: Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado/vermelho = *M. macrura*, triângulos/rosa = *M. aff. macrura*, círculos/verde= *M. didelphoides*, pentágono/azul= *M. aff. didelphoides*. Relevo do escudo das Guianas baseado no mapa de Tom Hollowell, NMNH e do Planalto central foi gerado através do programa ArcView.

6. CONCLUSÃO

O íntron 7 do Beta-fibrinogênio foi testado mas não apresentou sinal filogenético.

Os dados filogenéticos obtidos no presente estudo utilizando sequências de DNA do citocromo *b*, citocromo oxidase subunidade I, e éxon 28 do Fator de Von Willebrand mostram diferentes linhagens evolutivas dentro do gênero *Makalata*, sendo elas *M. macrura*, *M. aff. macrura*, *M. aff. didelphoides* das ilhas do rio Negro, e *M. didelphoides* dividida em: linhagem de Roraima à esquerda do rio Branco, linhagem do escudo das Guianas, linhagem do Cerrado de Tocantins e da Amazônia Paraense, linhagem da Bolívia, além de outros haplótipos disjuntos.

Foram descritos quatro novos cariótipos para espécimes identificados como *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro com $2n=72$ e $FN=134$, *M. aff. didelphoides* do interflúvio rios Negro-Branco com $2n=76$ e $NF=134$, linhagem *M. didelphoides* do Cerrado do Tocantins com $2n=68$ e $FN=132$, linhagem *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco com $2n=64$ e $NF=100$.

A partir dos padrões filogeográficos dos espécimes estudados, podemos inferir que os rios da bacia Amazônica possuem grande importância na distribuição das linhagens de *Makalata*: (1) os rios Negro e Branco parecem funcionar como barreira ao fluxo gênico entre a linhagem de *M. aff. didelphoides* e as demais linhagens, (2) o rio Negro interfere também no fluxo de genes entre a linhagem de *M. aff. macrura* que é restrita às suas ilhas, (3) o rio Branco separa a linhagem de *M. didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$, das demais, (4) o rio Iténez-Guaporé separa a linhagem da Bolívia das demais, (5) e o escudo da Guiana contém a linhagem da Guiana Francesa.

Os dados filogenéticos e citogenéticos apontam para a presença de pelo menos 5 linhagens evolutivas distintas, que necessitam ser descritas.

7. REFERÊNCIAS

- Aleixo A. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: A case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2006;89(2):383–95.
- Andrade AFB, Bonvicino CR, Briani D, Kasahara S. Karyologic diversification and phylogenetic relationships of the genus *Thalpomys* (Rodentia, Sigmodontinae). *Acta Theriologica*. 2004;49(2): 181-190.
- Astúa DM. Análise morfométrica do crânio e da mandíbula de marsupiais Didelfídeos: implicações ecológicas e funcionais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais. 1998;154p.
- Astúa D, Bandeira I, Geise L. Cranial morphometric analyses of the cryptic rodent species *Akodon cursor* and *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae). *Oecologia Australis*. 2015;19(1):143–57.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999;16:37-48.
- Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM. Mitochondrial pseudogenes : evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001;16(6):314–21.
- Bonvicino CR, Menezes AREAN, Oliveira JA. Molecular and karyologic variation in the genus *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae). *Hereditas* 2003;139:206-211.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. OPAS, Rio de Janeiro. 2008.
- Bonvicino CR, Weksler M. Speciation in Amazonia: Patterns and predictions of a network of hypotheses. In: Patterson BD, Costa LP (eds). *Bones, clones and Biomes: the history and geography of Recent Neotropical mammals*. University of Chicago Press, Chicago. 2012;259-282.
- Burnham K, Anderson D. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2003. Springer-Verlag, New York, NY
- Carleton MD, Musser GG. Order Rodentia. In: Wilson DE, Reeder DM (eds). *Mammal Species of the World: Third Edition*. The Johns Hopkins University Press. 2005;745-752.
- Casado F, Bonvicino CR, Nagle C, Comas B, Manzur TD, Lahoz MM, Seuánez HN. Mitochondrial divergence between 2 populations of the Hooded Capuchin, *Cebus* (*Sapajus*) *cay* (Platyrrhini, Primates). *Journal of Heredity* 2010;101:261–269.

- Cassens I, Vicario S, Waddell VG, Balchowsky H, Belle DV, Ding W, Fan C, Mohan RSL, Simões-Lopes PC, Bastida R, Meyes A, Stanhope MJ, Milinkovitch MC. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(21):11343-11347.
- Chevirena ZA, Hackett SJ, Capparella AP. Complex Evolutionary History of a Neotropical Lowland Forest Bird (*Lepidothrix coronata*) and Its Implications for Historical Hypotheses of the Origin of Neotropical Avian Diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005;36:338-357.
- Da Silva MNF, Patton JL. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in Arboreal Echimyid Rodents (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1993;2(3):243–55.
- Da Silva MNF, Patton JL. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 1998;7:475–86.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012;9(8):772. doi:10.1038/nmeth.2109.
- Dobigny G, Aniskin V, Volobouev V. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two cryptic species. *Cytogenetics and Genome Research*. 2002;96:117-124.
- Eler ES, Da Silva MNF; Silva CEF, Feldberg E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. *Genetics and Molecular Research*. 2012;11(2):830-846.
- Emmons LH. On the identity of *Echimys didelphoides* Desmarest, 1817 (Mammalia: Rodentia: Echimyidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 1993;106:1–4.
- Emmons LH, Leite YLR, Kock D, Costa LP. A review of the named forms of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) with the Description of a new species from coastal Brazil. *American Museum Novitates*. 2002;3380.
- Emmons LH. A Revision of the genera of Arboreal Echimyidae (Rodentia: Echimyidae, Echimyinae), with descriptions of two new genera. *Mammalian diversification: from Chromosomes to Phylogeography (A celebration of the career of James L. Patton)*. University of California Publications in Zoology 2005;133:247-381.

- Emmons LH, Leite Y, Patton JL. Echimyidae In:Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2716-2724.
- Emmons LH, Patton JL. *Makalata* In: Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2803-2817.
- Emmons LH, Leite Y, Patton JL. Echimyinae In:Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2749-53.
- Endler JA. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press. 1977,10.
- Endler JA. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. American Zoologist. 1982;22(2), 441-452.
- Faria MB, Nascimento FF, Oliveira JA, Bonvicino CR. Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). Journal of Heredity, publish on line doi:10.1093/jhered/est039.
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, Riva I De la, Cannatella DC. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007;44(2):825-837.
- Galewski T, Mauffrey JF, Leite YRL, Patton JL, Douzery EJP. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. Molecular and Phylogenetic Evolution 2005;34:601-615.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, da Silva MN, Bogart JP, Loughheed SC, et al. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(25):13672–7.
- Guindon S., Gascuel O. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 2003;52(5):696-704.
- Hasegawa M. Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal Molecular Evolution. 1985;22(2):160-74
- Hice CL, Velazco PM. The Non-volant Mammals of the Reserva National Allpahuayo-Mishana, Loreto, Peru. Special Publications Museum of Texas Tech University. 2012;(60):142.

- Huchon D, Catzeflis FM, Douzery EJP. Molecular Evolution of the Nuclear von Willebrand Factor Gene in Mammals and the Phylogeny of Rodents. *Molecular Biology and Evolution* 1999;16(5):577–589.
- Huchon D, Douzery EJP. From the Old World to the New World: A Molecular Chronicle of the Phylogeny and Biogeography of Hystricognath Rodents. *Molecular Biology and Evolution*. 2001;20(2):238–51.
- Hurvich, C, Tsai, C. Regression and Time Series Model Selection. In: *Small Samples*. *Biometrika*. 1989;76(2):297–307.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* 1991;32:128–44.
- lack-ximenes GE, Vivo M de, Percequillo AR. A new species of *Echimyus* Cuvier, 1809 (Rodentia, Echimyidae) from Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia Museu de Zoologia da USP*. 2005a;45(5):51–60.
- lack-ximenes GE, Vivo MDE, Percequillo AR. A new genus for *Loncheres grandis* Wagner, 1845, with taxonomic comments on other arboreal echimyids. *Arquivos do Museu Nacional* 2005b;63:89–112.
- Kasahara, S. *Introducao a Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética. 2009,160p.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980;16:111-120.
- Lara MC, Patton JL, da Silva MNF. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution* 1996;5:403–413.
- Leal-Mesquita ERRBP. *Estudos citogenéticos em dez espécies de roedores brasileiros da família Echimyidae*. São Paulo. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 1991.
- Leite YLR, Patton JL. Evolution of South American spiny rats (Rodentia , Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002;25:455–64.
- Leite YLR. *Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats, Genus Phyllomys (Rodentia, Echimyidae), with Description of Two New Species*. Zoology University of California Press 2003;132:1-118.
- Leite RN, Rogers DS. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity and*

- Evolution [Internet]. 2013;13(4):639–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13127-013-0140-8>
- Leite ALR. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue DNA Barcoding in Entomology. *Biota Neotropica* 2012;12(3):301-308.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009;25:1451-1452.
- Lima JF de S, Langguth A, Sousa LC. The Karyotype of *Makalata didelphoides* (Rodentia, Echimyidae). *Journal of Mammalogy* 1998;63:315–318.
- Loss AC. Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, ES. 2014, 139.
- Matocq MD, Shurtliff QR, Feldman CR. Phylogenetics of the woodrat genus *Neotoma* (Rodentia: Muridae): implications for the evolution of phenotypic variation in male external genitalia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007;42(3), 637-652.
- Mccarthy C. Chromas v1.45. School of Health Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia. 1998.
- Nagamachi CY, Feldberg E, Pieczarka JC, Pereira AL, Feresin e Silva CE, Rosa CC, et al. Citogenética de pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira. *Pequenos Mamíferos não-voadores da Amazônia Brasileira*. Capítulo 9. 2015;275-307.
- Nascimento FF, Pereira LG, Geise L, Bezerra AMR, D’Andrea PS, Bonvicino CR. Colonization process of the brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): A biogeographic hypothesis. *Journal of Heredity*. 2011;102(3):260–8. doi:10.1093/jhered/esr012
- Nascimento FF, Lazar A, Menezes AN, Durans M. The Role of Historical Barriers in the Diversification Processes in Open Vegetation Formations during the Miocene / Pliocene Using an Ancient Rodent Lineage as a Model. *PLoS ONE* 2013;8(4) e61924.
- Patton JL, Da Silva MNF, Malcolm JR. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia, Echimyidae) of the amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution (N Y)*. 1994;48(4):1314–23.
- Patton JL, da Silva MNF, Malcolm JR. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2000;244:1-306.

- Patterson BD, Velazco PM. Phylogeny of the Rodent Genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its Diversification in Amazonia and the Eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution* 2008;15:181–201.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 2008;25(7): 1253-1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Prance GT. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1982;594-624.
- Prychitko TM, Moore WS. The utility of DNA sequences of an intron from the β -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997;8(2): 193-204.
- Prychitko TM, Moore WS. Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear β -fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*. 2000;17(7): 1101-1111.
- Ribeiro NAB. Análises cromossômicas e filogenia de roedores do gênero *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia). Tese de doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. 2006.
- Rodríguez F, Oliver JL, Marín A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. 1990;142(4):485-501.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003;19:1572-1574.
- Sambrook J, Russel D W. *Molecular Cloning*. 3rd edition 3 vol cold spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- Seabright MA. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971;2: 971-972.
- Smith M, Patton JL. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1993;50:149-177.
- Springer MS, Debry RW, Douady C, Amrine HM, Madsen O, Jong WW De, et al. Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Mol Biol Evol*. 2001;18(2):132-43.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 1972;75:304-306.

- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993;10(3):512-26.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2013;28:2731-2739.
- Upham NS, Patterson BD. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 2012;63:417–429.
- Upham NS, Ojala-Barbour R, Brito JM, Velazco PM, Patterson B. Transitions Between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *Evolutionary Biology* 2013;13:191.
- Upham NS, Patterson BD. Evolution of Caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. In: Vassallo AI & Antenucci D (Eds), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. *Mammalogical Research*. 2015;1: 63-120
- Vanzolini PE, Williams EE. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*. 1970;19(1-2), 1-176.
- Vassallo AI, Antenucci D Caviomorph Rodents: An Introduction. In: Vassallo AI & Antenucci D (Eds), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. *Mammalogical Research*. 2015;1: 1-11
- Wallace AR. On the monkeys of the Amazon. *Journal of Natural History*. 1854;14 (84):451-454.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert, PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2005;360(1462), 1847-1857.
- Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. Johns Hopkins University Press. 2005;2142.

8 Anexos

Anexo 1 – Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook & Russel (2001).

Nomear dois tubos de 1,5µl (Tipo Eppendorf) para cada amostra a ser extraída.

1ª Parte

- 1 Cortar o tecido com o bisturi em pedaços bem pequenos e macerar.
- 2 Acrescentar
 - 500µl de tampão de Lise (100mM de NaCl; 10mM de Tris pH7,5; 5mM de EDTA)
 - 50µl de SDS 10%
 - 5µl de Proteinase K
 - 2µl de RNase
- 3 Colocar no agitador e deixar de um dia para o outro.

2ª Parte

- 1 Adicionar 500µl de Fenol,
- 2 Vortexar e centrifugar por 10min a 13000rpm,
- 3 Retirar a fase de baixo, deixando um pellet,
- 4 Adicionar 400µl de Clorofórmio,
- 5 Vortexar e centrifugar por 8min a 13000rpm.
- 6 Retirar a fase de baixo deixando um pellet,
- 7 Adicionar 400µl de Clorofórmio,
- 8 Retirar a fase de baixo deixando um pellet,
- 9 Centrifugar por 8min a 13000rpm
- 10 Retirar o SOBRENADANTE e colocar em outro tubo
 - No novo tubo:
 - 1 Adicionar 800µl de **Etanol Absoluto** GELADO.
 - 2 Centrifugar a 4°C por 30min a 13000rpm.
 - 3 Descartar o Etanol.
 - 4 Adiciona 800µl de **Etanol 70%** GELADO.
 - 5 Centrifugar a 4°C por 30min a 13000rpm.
 - 6 Descartar o Etanol.
 - 7 Deixar o tubo aberto na estufa a 37°C, ou na bancada de um dia para o outro para secar.
 - 8 Adicionar 30 a 50µl de tampão de eluição.

Anexo 2 – Gel de PCR e cromatograma do marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1

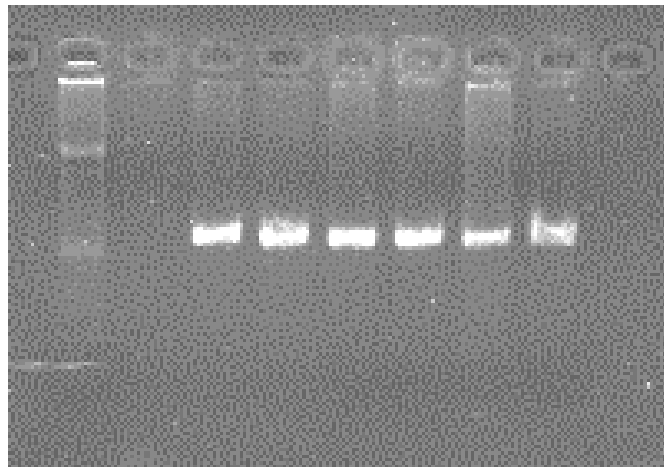


Figura 1. Resultado da PCR com o marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1, evidenciando a presença de uma única banda bem marcada.

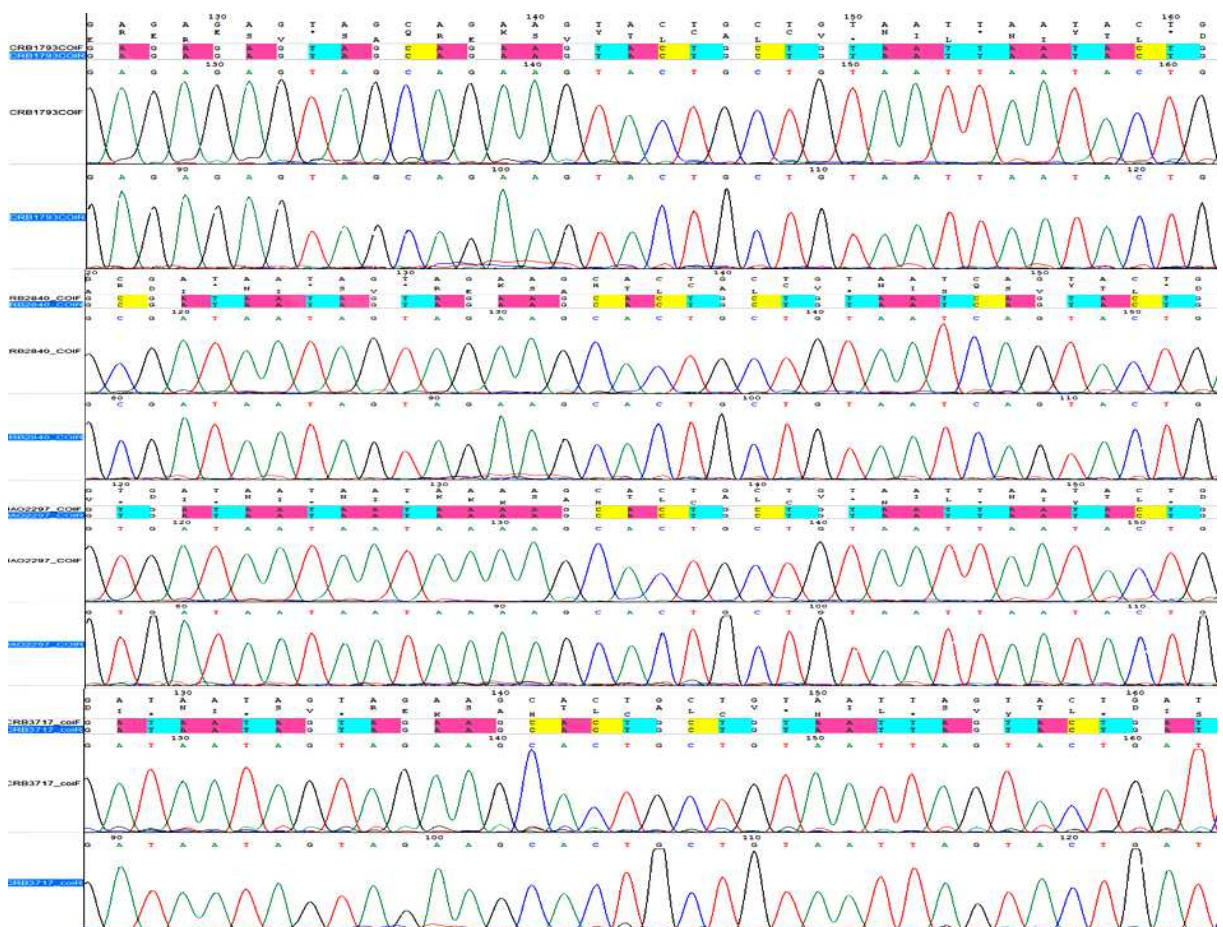


Figura 2. Cromatogramas para o marcador *mt-Co1*, a primeira fita é a senso a segunda é a anti-senso das sequências de CRB1793, CRB 2840, JAO2297 e CRB3717, respectivamente, evidenciando o fragmento 5' AAGCACTGCTGTAATT 3'.

Anexo 3 – Gel de PCR e cromatograma do marcador nuclear *íntron 7- Fgb*

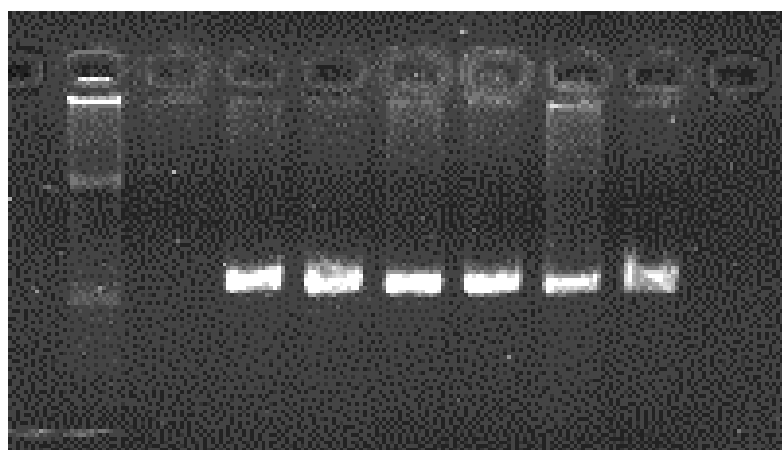


Figura 1. Resultado da PCR com o marcador nuclear *íntron 7- Fgb*, evidenciando a presença de uma única banda bem marcada

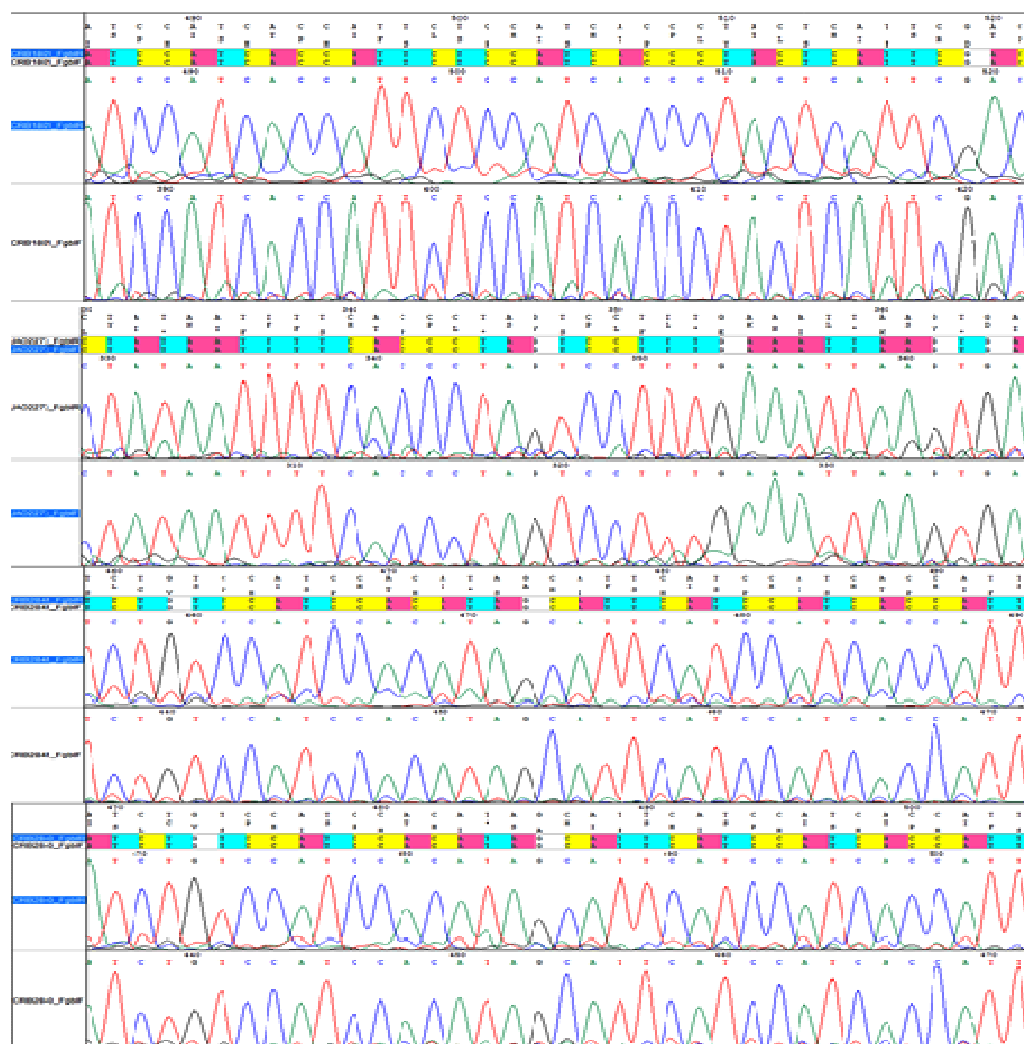


Figura 2. Cromatogramas para o marcador *íntron 7- Fgb*, a primeira fita é a senso a segunda é a anti-senso das sequências de CRB1801, JAO2273, CRB 2466, e CRB2840, respectivamente.

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

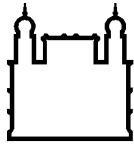
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE
DISTRIBUIÇÃO DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO
LESTE DA AMAZÔNIA E DO NORDESTE DO CERRADO

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES



Rio de Janeiro
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES

Estudos citogenéticos, filogenéticos e padrão de distribuição de *Makalata* (Rodentia: Echimyidae) do leste da Amazônia e do nordeste do cerrado

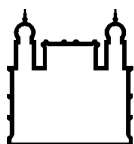
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde

Orientadora: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Co-orientadora: Dra. Ana Lazar Gomes e Souza

RIO DE JANEIRO

Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARINA PACHECO MAGALHÃES LOPES

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO
DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO LESTE DA AMAZÔNIA E DO
NORDESTE DO CERRADO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

CO-ORIENTADORA: Dra. Ana Lazar Gomes e Souza

Aprovada em: ____/____/____

Examinadores:

Prof. Dr. Marcelo Weksler (Museu Nacional) presidente

Prof. Dr. Leila Maria Pessôa (UFRJ)

Prof. Dr. Michel Barros Faria (UEMG)

Prof. Dr. Salvatore Siciliano (FIOCRUZ) suplente

Prof. Dr. Paulo Sérgio D'andrea (IOC / FIOCRUZ) suplente

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2016

Cópia da ata

À minha avó materna (*in memoriam*),
minha irmã Naina e
meus pais Nelma e Roberto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cibele Bonvicino, por ter aceitado me orientar, pelas oportunidades que me concedeu nestes dois anos, pela atenção, paciência e carinho maternal.

À minha co-orientadora Ana Lazar, pelo auxílio constante no decorrer de todo o trabalho.

Ao Dr. Héctor Seuáñez por me permitir frequentar e utilizar as dependências do laboratório do INCA, possibilitando a execução do projeto e grande aprendizado.

Ao Dr. François Catzeflis, Dr. João Alves e Dr. Michel Faria, pelas amostras gentilmente cedidas.

À Fiocruz por fornecer um campus amplo com pesquisadores e docentes experientes e receptivos, disciplinas esclarecedoras e pessoal técnico bem preparado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Jeiel Gabrir pelo auxílio na parte teórica, pela atenção, dedicação e apoio nas horas difíceis.

À Cintia Povill que me recebeu no laboratório desde o começo do mestrado com muito carinho, auxiliando na bancada, análises, trabalhos, aulas, campos... Parceira nas risadas e nas broncas, muito obrigada, Marmota.

Ao Cláudio Vieira que sempre de maneira jocosa, ajudou na bancada de citogenética, auxiliando com o microscópio e os bandeamentos.

À Camila Nacif pela ajuda com a citogenética e discussões, companheirismo e alegria contagiante.

Ao Diogo Lisbôa que me ajudou na bancada e nas análises inúmeras vezes.

Aos amigos Mirela D'arc, Sabrina Helmold e Sérgio Amaro pelo apoio na bancada, pelas inúmeras discussões e explicações genéticas regadas quase sempre à muito café, pelo apoio e incentivo, meu muito obrigada.

Ao Willian Tavares pelas ricas conversas sobre meu trabalho, pela ajuda com análises e com o texto.

Ao Dr. Miguel Moreira pelas discussões, explicações e soluções às questões que sempre apareciam.

Aos amigos do LABPMR e do INCA pelas discussões científicas e não científicas. Bom de ter dois laboratórios é poder conviver com pessoas de

especializações e visões diferentes. Aprendi muito! Em especial, com alunos da Cibele, pelas trocas de conhecimentos, convivência no dia a dia, seminários. Agradeço a todos pela paciência na reta final e colocações construtivas.

Aos amigos que ingressaram comigo no mestrado (Agostinho Pereira, Elizângela Feitosa, Fernanda Bittencourt, Karina Lopes e Jonathan Lopes), pelas trocas de experiências, apoio, pelos cafés, almoços e risadas.

Ao meus primos Sander e Marina Lacerda por me acolherem em sua casa desde os primeiros contatos no Rio de Janeiro, muito antes do mestrado.

Aos amigos Andreza Amaral e Marcus Antonius por me receberem durante minha estada na Paraíba, para congresso e visita à coleção da UFPB.

Aos amigos Régis Costa, Jorge Victor, Guilherme Fraenkel, Cintia Povill, Camila Nacif, Vanessa Mendonça, Renata Carneiro, Karina Rocha, Diego Ranzatto, Edegaro de Freitas, Eva Medeiros e Morgana Lima que muito me acolheram no Rio, dando o suporte nas horas difíceis, rindo nas horas alegres. O companheirismo de vocês foi fundamental nestes anos.

À minha família Nelma e Naina Lopes, e Roberto Jr pelo suporte financeiro, emocional e científico. Pela compreensão e apoio na minha busca por conhecimento, meus sonhos e escolhas audaciosas. Eu nada seria ou teria feito na vida se não tivesse vocês ao meu lado. Agradeço a Deus todos os dias pela família que tenho, não poderia ser melhor! A minha avó Neusa Magalhães (*in memoriam*), que sempre me incentivou nos estudos, torceu muito e colaborou para que eu chegasse no mestrado.

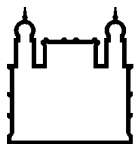
À Deus pela vida, saúde e oportunidades, pelo amparo constante na luta de cada dia!

À todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, OBRIGADA!.

Ficha catalográfica

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS CITOGENÉTICOS, FILOGENÉTICOS E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DO LESTE DA AMAZÔNIA E DO NORDESTE DO CERRADO

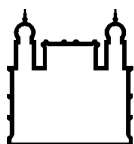
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arina Pacheco Magalhães Lopes

Makalata é um gênero de roedor arborícola encontrado predominantemente na floresta Amazônica, atualmente com duas espécies reconhecidas (*Makalata didelphoides* e *M. macrura*). Devido à dificuldade de coleta, há poucos estudos a respeito deste gênero. Existem publicados dois complementos cromossômicos atribuídos a *M. didelphoides* e nenhum para *M. macrura*. Existem vários estudos filogenéticos com *Makalata* mas apenas dois focando no gênero especificamente. No presente estudo foram realizadas análises citogenéticas e filogenéticas com quatro marcadores moleculares, citocromo *b*, citocromo oxidase subunidade I, éxon 28 do fator de Von Willebrand e o íntron 7 do Beta-fibrinogênio. As análises mostraram quatro diferentes linhagens evolutivas dentro do gênero *Makalata*: (1) *M. macrura* do Brasil e Peru, com estruturação geográfica, (2) *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, (3) *M. aff. didelphoides* do interflúvio entre o rio Branco e o rio Negro e, (4) *M. didelphoides* dividida em linhagem à esquerda do rio Branco, linhagem do escudo das Guianas, linhagem da Amazônia Paraense e do cerrado do Tocantins, e linhagem da Bolívia. O íntron 7 do Beta-fibrinogênio apresentou politomia para os dados analisados. Foram descritos dois novos cariótipos um atribuído a *M. aff. macrura*, outro a *M. aff. didelphoides* e dois novos cariótipos para *M. didelphoides*. Os padrões filogeográficos encontrados sugerem que alguns rios da bacia amazônica e o escudo das Guianas possuem importância na distribuição das linhagens de *Makalata* e que podem estar funcionando como barreiras geográficas. Os dados filogenéticos e citogenéticos são congruentes e indicam a presença de pelo menos quatro linhagens evolutivas distintas além das linhagens já conhecidas, e que necessitam ser descritas.

Palavras chave: gene mitocondriais e nucleares, cariótipo, rato de espinho arborícola do fucinho vermelho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CYTOGENÉTICS, PHYLOGENETICS AND DISTRIBUTION PATTERNS STUDIES OF *MAKALATA* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) FROM EAST OF AMAZÔNIA AND NORTHEAST OF CERRADO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arina Pacheco Magalhães Lopes

Makalata is an arboreal rodent genus predominantly found in the Amazon forest, currently two recognized species (*Makalata didelphoides* and *M. macrura*). Due of the difficulty of collecting these specimens, there are few studies of this kind. In the literature there are two karyotypes attributed to *M. didelphoides* and neither for *M. macrura*. There are a lot of phylogenetics studies with *Makalata*, nevertheless there are only two studies about the genus specifically. In this study were performed cytogenetic and phylogenetic analyzes with four molecular markers, cytochrome *b*, cytochrome oxidase subunit I, exon 28 of the von Willebrand factor and intron 7 Beta-fibrinogen. These analyzes showed different evolutionary lineages within the genus *Makalata*: (1) *M. macrura* in Brazil and Peru, with geographic structure, (2) *M. aff. macrura* in the islands of the Rio Negro, (3) *M. aff. didelphoides* in the interfluve between the Branco River and the Negro River, and (4) *M. didelphoides* divided in lineage to the left of the Branco River, lineage of the Guianas Shield, lineage the Amazon of Pará and cerrado of Tocantins, and lineage of Bolivia. The intron 7 of Beta-Fibrinogen polytomy presented to the analyzed data. Were we described two new karyotypes assigned to one for *M. aff. macrura*, another *M. aff. didelphoides* and two new karyotypes of *M. didelphoides*. The found phylogeographic patterns suggest that some rivers of the Amazon basin and the Guianas shield have importance in the distribution of *Makalata* lineages and can be functioning as geographic barriers. The phylogenetic and cytogenetic data are consistent and indicate the presence of at least four distinct evolutionary lineage addition to already known strains, and need be described.

Keywords: mitochondriais and nuclear genes, karyotype, red nosed rat

ÍNDICE

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Gênero <i>Makalata</i>	2
1.2 Estudos cariológicos e filogenéticos.....	4
1.3 Estudos biogeográficos.....	5
2 OBJETIVOS.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Amostras.....	7
3.2 Análises Citogenéticas.....	8
3.2.1 Coloração convencional e bandeamento.....	9
3.3 Análise Filogenéticas.....	10
3.3.1 Isolamento do DNA, amplificação e purificação.....	10
3.3.2 Sequenciamento e alinhamento.....	12
3.3.3 Filogenia e Filogeografia.....	13
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Análises Cariotípicas.....	17
4.2 Análises Filogenéticas.....	21
4.2.1 Gene mitocondrial citocromo <i>b</i> – <i>mt-Cytb</i>	21
4.2.2 Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 – <i>mt-Co1</i>	26
4.2.3 Íntron sete do gene Beta-fibrinogênio – <i>íntron 7-Fgb</i>	31

4.2.4	Éxon 28 do fator de Von Willebrand – <i>éxon 28-Vwf</i>	34
4.2.5	Análise concatenada de <i>mt-Cytb</i> e <i>éxon 28-Vwf</i>	38
4.3	Análises de rede de haplótipos.....	41
5	DISCUSSÃO.....	45
5.1	Variação Cariotípica.....	45
5.2	Relações Filogenéticas.....	48
5.3	Variação Geográfica.....	54
6	Conclusão.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58
8	ANEXOS.....	65
	Anexo 1 – Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook & Russel (2001).....	65
	Anexo 2 - Gel de PCR e cromatograma do marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1.....	66
	Anexo 3 - Gel de PCR e cromatograma do marcador nuclear íntron 7 do Beta-fibrinogênio.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com a distribuição das espécies de <i>Makalata</i> , segundo Emmons & Patton (2015).	3
Figura 2. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios próximos.	7
Figura 3. Cariótipo de <i>M. aff. macrura</i> das ilhas do rio Negro, AM, em coloração convencional com $2n=72$ e $NF=134$.	18
Figura 4. Cariótipo de <i>M. aff. didelphoides</i> do interflúvio dos rio Negro e Branco, em coloração convencional com $2n=76$ e $NF=134$.	19
Figura 5. Cariótipos de <i>M. didelphoides</i> em coloração convencional com $2n=64$ e $NF=100$, de Caracaraí, RR.	19
Figura 6. Cariótipo de <i>Makalata didelphoides</i> com $2n=64$ e $NF=100$ da margem esquerda do rio Branco, RR, com bandeamento GTG.	19
Figura 7. Cariótipo de <i>Makalata didelphoides</i> com $2n=64$ e $NF=100$ da margem esquerda do rio Branco, RR, com bandeamento GTG.	20
Figura 8. Cariótipo de <i>M. didelphoides</i> em coloração convencional com $2n=68$ e $NF=132$, de São Valério da Natividade, TO.	20
Figura 9. Topologia de MV para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>mt-Cytb</i> .	25
Figura 10. Topologia de ML para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>mt-Co1</i> .	30
Figura 11 Topologia de MV a esquerda e de IB a direita, para <i>Makalata</i> com <i>íntron 7-Fgb</i> .	33
Figura 12. Topologia para o gênero <i>Makalata</i> com o <i>éxon 28-Vwf</i> .	37
Figura 13. Topologia para <i>Makalata</i> com dados concatenado de <i>mt-Cytb</i> e <i>éxon 28-Vwf</i> .	40
Figura 14. Análise de median-joining para <i>Makalata</i> com <i>mt-Cytb</i> .	42
Figura 15. Análise de <i>Median-Joining</i> do complexo <i>Didelphoides</i> com haplótipos com <i>mt-Cytb</i> .	43
Figura 16. Análise de <i>Median-Joining</i> do complexo <i>Macrura</i> com haplótipos de <i>mt-Cytb</i> .	44
Figura 17. Mapa com os pontos de coleta e os cariótipos para o gênero <i>Makalata</i> .	47
Figura 18. Topologias com <i>mt-Cytb</i> publicadas por Patton <i>et al.</i> (2000) e Patterson & Velazco (2008), com modificações.	48

Figura 19. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios e relevo próximos.....	52
Figura 20. Mapa com as localidades dos espécimes de <i>Makalata</i> evidenciando os acidentes geográficos que separam as linhagens.....	53
Figura 21. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados, destacando os rios e relevo próximos e as linhagens de <i>Makalata</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das amostras de <i>Makalata</i> sequenciadas neste trabalho.....	8
Tabela 2. Iniciadores usados para amplificação e sequenciamento dos marcadores <i>mt-Cytb</i> , <i>mt-Co1</i> , <i>íntron 7-Ffg</i> e <i>éxon 28-Vwf</i>	11
Tabela 3. Ciclagens utilizadas para os marcadores mitocondriais (<i>mt-Cytb</i> , <i>mt-Co1</i>) e nucleares (<i>íntron 7-Fgb</i> , <i>éxon 28-Vwf</i>), especificando as temperaturas e os tempos em segundos ou minutos.....	12
Tabela 4. Amostras do complexo Didelphoides utilizadas nas análises moleculares, com números de campo ou de museu, números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidade e referências.....	14
Tabela 5. Amostras do complexo de espécies <i>Macrura</i> utilizadas nas análises moleculares, números de campo e/ou museu, números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidades e referências.....	16
Tabela 6. Lista de haplótipos do <i>mt-Cytb</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	23
Tabela 7. Estimativas das distâncias genéticas (em porcentagem) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com <i>mt-Cytb</i>	24
Tabela 8. Lista de haplótipos de <i>Makalata</i> com <i>mt-Co1</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	27
Tabela 9. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>mt-Co1</i>	29
Tabela 10. Lista de haplótipos do <i>íntron 7-Fgb</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	32
Tabela 11. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>íntron 7-Fgb</i>	32
Tabela 12. Lista de haplótipos do <i>éxon 28-Vwf</i> , discriminando o táxon, número de campo ou museu, número do GenBank e localidade de coleta.....	35
Tabela 13. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre os haplótipos de <i>Makalata</i> com o marcador <i>éxon 28-Vwf</i>	36
Tabela 14. Lista de haplótipos das sequências concatenadas de <i>mt-Cytb</i> e do <i>éxon 28-Vwf</i> de <i>Makalata</i>	39
Tabela 15. Dados citogenéticos disponíveis para <i>Makalata</i> , discriminando o táxon, localidade, números diplóide e fundamental, e referência.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2n: número diplóide

M3: terceiro molar

ACP: análises de componentes principais

Aff: affinis

AICc: akaike information criterion correction

AM: Amazonas

BO: Bolívia

BR: Brasil

cm: centímetros

CP1: componente principal 1

CP2: componente principal 2

CRB: Cibele Rodrigues Bonvicino

CVA: análise de variáveis canônicas

D-loop: gene mitocondrial não codificante

DNA: ácido desoxirribonucléico

éxon 28-VWF: éxon 28 do gene nuclear fator de von willebrand

et al.: e colaboradores

G: distribuição gamma

GenBank: banco de dados de sequências de livre acesso

GF: Guiana Francesa

GTR: modelo de substituição nucleotídica “generalised time-reversible”

GY: Guiana

Hap: haplótipos

HCL: ácido clorídrico

HKY: modelo de substituição nucleotídica hasegawa- kishino -yano

I: sítios invariáveis

íntron7-FGB: íntron 7 do gene nuclear Beta-fibrinogênio

IB: Inferência Bayesiana

Id: identificação

INPA: Instituto de Pesquisa da Amazonia

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

JAO: João Alves de Oliveira

JLP: James L Patton

K2p: Kimura 2 parâmetros

Km: quilômetro

Labpmr: laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios Silvestres

LHE: Louise H Emmons
MBF: Michel Barros Faria
Md: margem direita
Me: margem esquerda
Min: minuto
Ml: mililitro
Mm: milimolar
MN: museu nacional
MNFS: Maria Nazareth F da Silva
mt-Co1: citocromo oxidase unidade 1
mt-Cytb: mitocondrial- citocromo *b*
MV: máxima verossimilhança
N: tamanho da amostra
NF: número fundamental
ng: nanograma
°C: graus celsius
PA: Pará
PARNA: parque nacional
PCR: do inglês polimerase chain reaction
PE: Peru
pp: probabilidade posterior
Prq: parque
RAG1: gene nucleaar de ativação recombinante
Ref.: referência
RO: Rondônia
rpm: rotações por minutos
RR: Roraima
seg: segundos
Taq: *thermus aquaticus*
TO: Tocantins
TrN: modelo de substituição nucleotídica, Tamura Ney
UFPB: Universidade Federal da Paraíba
Uv: ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia é a radiação que obteve o melhor sucesso adaptativo dentre os mamíferos, presente em todos os continentes e representando cerca de 40% da diversidade dos mamíferos vivos (Musser & Carleton, 2005; Upham & Patterson, 2012). Dividida em cinco subordens e aproximadamente 34 famílias, apresenta ampla diversidade ecológica, morfológica e taxonômica (Wilson & Reeder, 2005). Devido a essa grande diversidade, os roedores são bons representantes para estudos biogeográficos, ecológicos e evolutivos (Huchon, 1999).

A família Echimyidae é uma das mais antigas da América do Sul, com registros fósseis que datam entre o médio Eoceno e o Oligoceno, um dos mais antigos para roedores (Emmons *et al.*, 2015). É a família mais abundante em espécies (91 espécies viventes) e com a maior diversidade ecológica (Upham & Patterson, 2015). Essa família possui gêneros de hábitos terrestres como *Proechimys* e *Thrichomys*, arborícolas como *Echimys*, *Makalata* e *Isothrix*, semi-fossoriais como *Clyomys*, e semi-aquático como *Myocastor* (Lara *et al.*, 1996; Upham *et al.*, 2013; Upham & Patterson, 2015). Encontrados desde a América Central até a Argentina, são conhecidos como ratos de espinho por apresentarem pelos aristiformes, flexíveis e achatados (Lara *et al.*, 1996; Emmons, 2005; Galewski *et al.*, 2005; Upham *et al.*, 2013). Os equimídeos de hábito arborícola são pouco representados nas coleções dos museus, devido a amostragem inadequada do dossel ou por serem realmente escassos na natureza (Patton *et al.*, 2000; Bonvicino *et al.*, 2003), portanto, os limites genéricos e as relações entre estes roedores ainda são poucos estudados (Patton *et al.*, 2000). A família Echimyidae é composta por quatro subfamílias: Echimyinae, Eumysopinae, Dactylomyinae e Myocastorinae (Lara *et al.*, 1996; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013; Emmons *et al.*, 2015). A subfamília Echimyinae possui representantes exclusivamente arborícolas e com pelos aristiformes, patas curtas e cauda longa (maior que o comprimento do corpo), com atualmente nove gêneros, *Callistomys*, *Diplomys*, *Echimys*, *Isothrix*, *Makalata*, *Pattonomys*, *Phyllomys*, *Santamartomys* e *Toromys* (Emmons, 2005; lack-Ximenes *et al.*, 2005a, Emmons *et al.*, 2015).

Em 1809, Cuvier descreveu o primeiro gênero de equimídeo (*Echimys*) para alocar o já descrito *Myoxus chrysurus* Zimmermann 1780, cuja nova combinação passou a ser *Echimys chrysurus*. Atribuindo a autoria a Geoffroy St.-Hilaire, Desmarest em 1817 descreveu seis novas espécies alocadas ao gênero *Echimys*:

E. hispidus, *E. spinosus*, *E. cayennensis*, *E. setosus*, *E. dactylinus*, e *E. didelphoides* (Emmons *et al.*, 2015). Nos anos de 1838 e 1840 Isidore Geoffroy St.-Hilaire dividiu o gênero *Echimys* em três gêneros: *Dactylomys*, *Echimys* e *Nelomys*, dentro deste último o autor colocou, *Nelomys cristatus*, *N. paleaceus*, *N. semivillosus*, *N. blainvillii*, *N. armatus*, *N. didelphoides* (Emmons *et al.*, 2002, 2015). Nos mesmos trabalhos, St.-Hilaire propôs a divisão da família Echimyidae em três subfamílias Echimyinae, Dactylomyinae e Eumysopinae, esta classificação continua sendo utilizada nos dias de hoje, com apenas o acréscimo da subfamília Myocastorinae (Lara *et al.*, 1996, Leite & Patton, 2002; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013; Emmons *et al.*, 2015).

1.1. Gênero *Makalata*

O gênero *Makalata* foi criado por Husson em 1978 para alocar os espécimes de *Nelomys armatus* Lichtenstein, 1830 que passaram à combinação de *Makalata armata*. O holótipo de *Echimys didelphoides* Desmarest, 1817 é um indivíduo jovem de *Makalata armata* (Emmons, 1993), como a descrição de *M. armata* data de 1838, sendo posterior à descrição de *Echimys didelphoides* em 1817, o nome válido passou a ser *Makalata didelphoides*, sendo *Makalata armata* considerada um sinônimo júnior. *Makalata* é o gênero mais complexo da subfamília Echimyinae, atualmente com apenas três espécies reconhecidas, *Makalata macrura* Wagner, 1842, *Makalata didelphoides* Desmarest, 1817 e *Makalata obscura* Wagner, 1840 (Emmons & Patton, 2015).

Makalata didelphoides Desmarest, 1817 coloração variando entre ferrugíneo e amarelado com traços pretos, parte mais posterior do corpo e começo da cauda e focinho em notalidades bem alaranjadas. Cauda menor que o comprimento do corpo com pêlo apenas na base. Ventre amarelo esbranquiçado, patas curtas e largas de coloração avermelhada. Possuem hábito noturno, solitário e arborícola, alimenta-se de frutos, sementes verdes e alguns tipos de folhas, sendo mais comum em florestas de várzea (Emmons & Patton, 2015). A espécie ocorre do norte da Venezuela, passando pela Guiana, Guiana Francesa até a Amazônia oriental, principalmente a leste dos rios Negro e Madeira, nos estados do Maranhão e Ceará, e no nordeste da Bolívia (Figura 1, Emmons & Patton, 2015). Em sua descrição Desmarest aponta a localidade tipo de *M. didelphoides* como sendo América do Sul, sem maiores especificações.

Makalata macrura Wagner, 1842 muito semelhante a *M. didelphoides*, mas com ventre marron acinzentado (Emmons & Patton, 2015). Também possui parte mais posterior do corpo e focinho alaranjados. Geralmente encontrada em planície sazonal inundada, mata de várzea ou igapó (Hice & Velazco, 2012), tendo como localidade tipo Borba, na foz do rio Madeira no Amazonas. A espécie ocorre do oeste da bacia Amazônica (margem esquerda do rio Negro até próximo ao rio Madeira), incluindo Venezuela e o sudeste da Colômbia, leste do Equador e norte e centro do Peru (Emmons & Patton, 2015; Figura1).

Makalata obscura Wagner, 1840 esta espécie foi descrita a partir de dois espécimes coletados por Spix no Brasil, a descrição não é precisa, caracterizando o espécime como de corpo robusto, patas curtas e cauda grossa, pelagem escura com tonalidades de amarelo e ventre amarelo (Emmons & Patton, 2015). Emmons (2005) após análises morfológicas infere que esta espécie é muito parecida com *M. didelphoides* e talvez seja apenas uma variação desta.

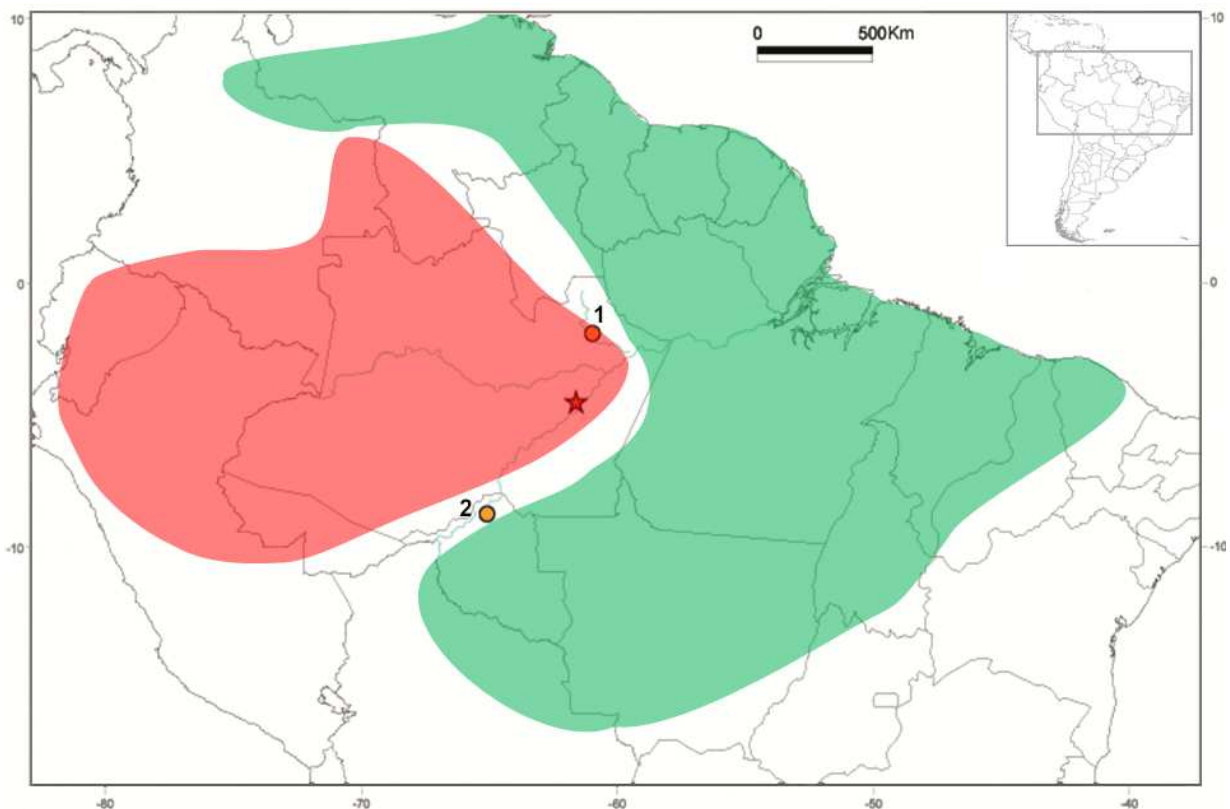


Figura 1. Mapa com a distribuição das espécies de *Makalata*, segundo Emmons & Patton (2015). Em vermelho a distribuição de *M. macrura* e em verde a distribuição de *M. didelphoides*. Os círculos representam as localidades dos espécimes já cariotipados para o gênero (1-Balbina, AM; Lima et al., 1998 e 2-Samuel, RO; Leal-Mesquita, 1991) e a estrela representa a localidade tipo de *M. macrura* (Borba, AM).

1.2. Estudos cariológicos e filogenéticos

As análises cariológicas em vertebrados auxiliam a traçar a história evolutiva de um ou vários cromossomos, podendo estabelecer relações de parentesco, principalmente quando analisados junto com sequências de DNA (Kasahara, 2009). Os rearranjos cromossômicos são eventos relativamente raros, com taxa mínima de homoplasia, o que torna a citogenética uma ferramenta importante para estudos sistemáticos (Nagamachi *et al.*, 2015).

Para os roedores, grupo com alta similaridade morfológica entre as espécies, onde variações ambientais influem na variação fenotípica (Dobigny *et al.*, 2002), a análise cariotípica tem se mostrado útil para decisões taxonômicas. Um exemplo na família Echimyidae é o gênero *Proechimys* Allen, 1899, que possui muitas espécies crípticas (morfológicamente similares) e número diplóide variando de 14 a 62 de acordo com a espécie (Ribeiro, 2006; Eler *et al.*, 2012).

Devido à dificuldade em se coletar espécimes de *Makalata*, os trabalhos citogenéticos com representantes deste gênero são raros, existindo apenas dois complementos cromossômicos já publicados até o momento. O cariótipo de um espécime do rio Jamari em Rondônia, identificado como *M. armata* mostrou $2n=70$ e $NF=120$ (Leal Mesquita, 1991), e outro de um espécime identificado como *M. didelphoides* da Hidrelétrica de Balbina, rio Uatumã, estado do Amazonas, que mostrou $2n=66$ e $NF=106$ (Lima *et al.*, 1998). Até o momento, nenhum indivíduo identificado como *M. macrura* foi cariotipado.

Análises filogenéticas são amplamente utilizadas em estudos taxonômicos e filogeográficos para avaliar áreas mais diversas, endêmicas, oferecendo meios de testar hipóteses de diversificação (da Silva & Patton, 1998). Muitos estudos filogenéticos com a família Echimyidae utilizaram sequências de *Makalata* no conjunto de dados (da Silva & Patton, 1993; Lara *et al.*, 1996; Da Silva & Patton, 1998; Galewski *et al.*, 2005; Upham & Patterson, 2012; Upham *et al.*, 2013). No entanto, existem poucos estudos com a variação dentro do gênero, com exceção do amplo estudo sobre mamíferos do rio Juruá (Patton *et al.*, 2000) onde as relações intragenéricas de *Makalata* e sua distribuição ao longo deste rio foram abordadas. Outro estudo, focado no gênero *Isothrix*, utilizou dentre outros Echimyidae, 17 sequências de *Makalata*, apresentando algumas considerações sobre este gênero (Patterson & Velazco, 2008).

1.3. Estudos biogeográficos

Existem três hipóteses que surgiram na tentativa de explicar a alta diversificação de espécies observadas nas planícies da bacia Amazônica, são elas (1) hipótese de refúgio (Vanzolini & Williams, 1970; Prance 1982), (2) hipótese de gradiente ecológico (Endler, 1977, 1982) e (3) hipótese de rios como barreira. Esta última, criada por Alfred Russell Wallace em 1854, quando observando a abundância e as relações entre as espécies de primatas ao longo do rio Amazonas, sugeriu que os grandes rios amazônicos (como os rios Negro, Madeira e Amazonas) representariam uma barreira para o fluxo gênico, promovendo a divergência genética entre as populações de cada margem. Esta hipótese tem como pressuposto a ideia de que a população inicial teria sido dividida pelo rio, interrompendo o fluxo gênico entre as populações atuais, ficando efetivamente separadas (Gascon *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2013; Leite & Rogers, 2013). Esta hipótese gerou muitos estudos que visam testar os padrões de diferenciação das espécies entre as populações de cada margem dos rios (Gascon *et al.*, 2000). Estudos sobre a fauna e a extensão desta pelos biomas ajudam a entender como as espécies se diferenciaram, a existência de endemismos e a complexidade da diversidade biológica (Nascimento *et al.*, 2013; Leite & Rogers, 2013).

Para muitas espécies de vertebrados, os rios funcionam como barreira geográfica, separando e impedindo o fluxo gênico entre as populações, provocando diversificação e especiação. Estudos com anfíbios e aves tem suportado a hipótese de que os rios amazônicos funcionam como importante barreira geográfica, separando as espécies (Aleixo, 2006; Chevirona *et al.*, 2005; Funk *et al.*, 2007). Estudos com pequenos mamíferos também mostram que os rios tem interferência no fluxo genéticos de algumas espécies (Patton *et al.*, 1994; Da Silva & Patton, 1998; Nascimento *et al.*, 2011). Entre esses estudos, destacamos estudos que apontam o rio Negro como barreira para o fluxo gênico entre espécies de primatas e roedores (Da Silva & Patton, 1998; Bonvicino *et al.*, 2003; Bonvicino & Weksler, 2012; Leite & Rogers, 2013). Aqui, a hipótese dos rios como barreiras foi testada com amostras de *Makalata*.

2. Objetivos

Analisar as relações filogenéticas, a variação cariotípica e o padrão de distribuição dos espécimes de *Makalata*, com foco nos indivíduos coletados na Amazônia brasileira nos municípios de Barcelos, Santa Isabel do Rio Negro no estado do Amazonas e Caracaraí no estado de Roraima, e no Cerrado do Brasil central no município de São Valério da Natividade no estado de Tocantins. Foram utilizados dados cariotípicos e sequências de marcadores mitocondriais e nucleares. Especificamente pretende-se:

- 1) Descrever e analisar a variação cariotípica em amostras disponíveis para este estudo;
- 2) Avaliar as relações filogenéticas dos espécimes utilizando sequências de DNA dos genes mitocondriais citocromo *b* e citocromo oxidase subunidade I, e do marcadores nucleares, éxon 28 do fator de Von Willebrand e íntron 7 do Beta-fibrinogênio;
- 3) Analisar, a partir dos padrões filogeográficos dos espécimes estudados, a presença de possíveis barreiras geográficas

3. Material e métodos

3.1. Amostras

As amostras analisadas neste estudo consistem em células em suspensão e tecido hepático, coletadas previamente, totalizando 20 espécimes de *Makalata*. Destas, 19 são da Amazônia, sendo 13 de Barcelos e Santa Isabel do Rio Negro, no estado do Amazonas (Figura 2, localidades 1 a 9), seis de Caracaraí no estado de Roraima (Figura 2, localidades 15 a 17), e um da região de Cerrado no sul do estado de Tocantins (Figura 2, localidade 20). Encontram-se depositados no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, Fiocruz, Brasil. No mapa da Figura 2 estão plotadas as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, localidades de 1 a 20 são de sequências obtidas neste trabalho, as demais localidades são de sequências obtidas no GenBank.

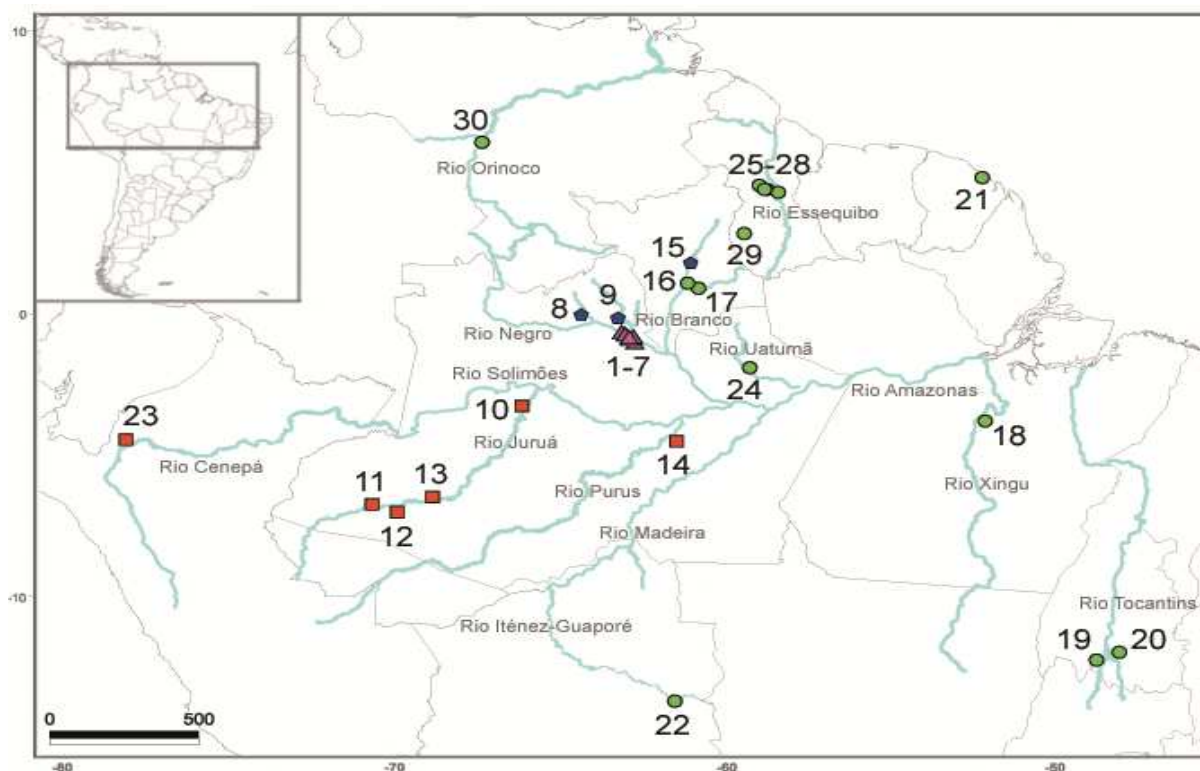


Figura 2. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios próximos. **Brasil: Amazonas**, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima**, Caracaraí (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa**: (21) Cayenne. **Bolívia**: Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru**: (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana**: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela**: Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado = *M. macrura*, triângulos = *M. aff. macrura*, círculos= *M. didelphoides*, pentágono= *M. aff. didelphoides*.

Para facilitar a exposição e compreensão dos dados, as linhagens que encontramos diferentes das linhagens já existentes (*M. macrura* e *M. didelphoides*), nomeamos de *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*.

Tabela 1. Lista das amostras de *Makalata* sequenciadas neste trabalho discriminando a espécie, número de campo (ID), sexo (S) e localidade de coleta. Os estados do Brasil são: AM=Amazônia, RR=Roraima, e TO=Tocantins.

Espécie	ID	S	Localidade de coleta
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	F	AM, Barcelos, rio Aracá, Igarapé do Bigorna
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	M	AM, Barcelos, rio Aracá, Igarapé do Bigorna
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	F	AM, Santa Isabel do rio Negro, rio Preto
<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	M	RR, Caracaraí, Parque Nacional do Viruá
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Itamaraty
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568, CRB2569	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626, CRB2627	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Urumari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Urumari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha do Tigre
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Giriau
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	M	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Budari
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	F	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Cururu
<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	M	TO, São Valério da Natividade
<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	F	RR, Rio anauá, próximo ao rio Branco
<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	M	RR, Caracaraí, rio Anauá
<i>M. didelphoides</i>	JAO2311, JAO2297, JAO2298	F	RR, Caracaraí, rio Anauá

3.2. Análises citogenéticas

Todas as células em suspensão foram obtidas no campo por cultura de curta duração seguindo o protocolo descrito por Andrade e colaboradores (2004). No laboratório, as células em suspensão foram lavadas pelo menos duas vezes com fixador Carnoy (3 volumes metanol, 1 volumes ácido acético). Para montagem das lâminas, os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados por 10 minutos a 1.500rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com pipeta Pasteur. As lâminas foram lavadas com detergente neutro, mergulhadas em Etanol e secas com gase. Para pingar o material cada lâmina foi mergulhada em metanol 70%, deixando escorrer o excesso em papel absorvente e a uma distância de aproximadamente 15cm da lâmina uma gota da suspensão celular foi pingada e a

lâmina flambada. A qualidade do material (crescimento celular, choque hipotônico) e concentração das metáfases foram verificadas ao microscópio invertido. Aqui 2n refere-se ao número diplóide e NF ao número fundamental autossômico.

3.2.1. Coloração convencional e bandeamentos

As lâminas com boas metáfases foram envelhecidas um dia e coradas utilizando solução de Giemsa 5% diluída em tampão Fosfato 0,1M (53,7ml NaH_2PO_4 , 46,3ml Na_2HPO_4 , água deionizada em quantidade suficiente para completar 1000ml) por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, secas e analisadas ao microscópio óptico com câmera digital acoplada. As fotos das metáfases foram capturadas através de um programa de captura e edição de imagem (Q-Capture Pro 7) e as melhores foram impressas para montagem dos cariótipos.

O bandeamento GTG foi realizado seguindo o protocolo de Seabright (1971) com modificações. As lâminas foram lavadas em água corrente, utilizando detergente neutro, colocadas em éter e secas com papel absorvente, pingadas conforme a técnica descrita acima e foram envelhecidas um dia. No dia seguinte a tripsina para a digestão das proteínas, foi preparada na proporção de 0,050g de tripsina para 50ml de solução salina de Hanks (6,75g Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1g NaHCO_3 , 0,5ml Fungizona, 1ml Penicilina, 50ml Streptomina). As lâminas foram mergulhadas na solução de tripsina por 30 a 45 segundos e imediatamente lavadas em água destilada. Após secas foram mergulhadas no corante por 10 minutos, lavadas em água corrente, secas e foto-documentadas ao microscópio.

Para o bandeamento CBG (Heterocromatina Constitutiva) foi seguido o protocolo de Sumner (1972) com modificações. As lâminas foram pingadas conforme descrito acima e envelhecidas por sete dias. Depois foram tratadas em solução de 2xSSC (17,53g NaCl, 8,82g Citrato de Na, 900ml de água deionizada) em banho Maria a 60°C por 15 minutos, lavadas em água corrente e mergulhadas em solução de ácido clorídrico (HCL) na concentração de 0,2N por 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas em água corrente e secas. Em seguida submersas numa solução filtrada de Hidróxido de Bário [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] a 5% à temperatura de 60°C por 30 a 45 segundos, lavadas rapidamente em ácido clorídrico a concentração de 2N e em seguida em água corrente. Depois de secas, as lâminas foram incubadas novamente em solução de 2xSSC, à 60°C por 30 minutos, lavadas em água corrente e secas para serem coradas em Giemsa 5% por 20 minutos.

Foram fotografadas e contadas 20 metáfases de cada amostra das localidades foco deste estudo. Destas, foram escolhidas as cinco melhores metáfases para serem impressas, recortadas e montadas. As análises de banda GTG e CGB foram realizadas e utilizadas para comparação das metáfases e confirmação da montagem do cariótipo.

3.3. Análises filogenéticas

A nomenclatura dos genes seguiu a disponível no site UniProt <http://www.uniprot.org>, específica para roedores (acesso em 13.06.2016).

3.3.1. Isolamento do DNA, amplificação e purificação

O DNA foi isolado a partir de tecido hepático (conservado em álcool etílico absoluto) utilizando de protocolo fenol-clorofórmio adaptado (Anexo I) de Sambrook & Russell (2001). Para checar a qualidade do DNA extraído, as amostras foram corridas em gel de agarose a 0,8% e observadas em transiluminador de ultra violeta (Gel Logic 200, Carestream Health). Após a extração, os fragmentos de DNA foram amplificados através de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*). Para isso, foram escolhidos dois genes mitocondriais, o citocromo *b* (*mt-Cytb*) completo, com 1140 pares de bases, por ter um bom sinal filogenético, para a maioria dos mamíferos e ser amplamente utilizado nos estudos filogenéticos e filogeográficos (Patterson & Velazco, 2008), e o citocromo oxidase unidade 1 (*mt-Co1*) parcial, com 657 pares de base, por sua utilização no projeto Barcoding (<http://brbol.org/>'DNA Barcode' de Tetrápoda: Construção de uma Rede Integrada de 'DNA Barcode' de Anfíbios, Répteis, Aves e Mamíferos). Além destes, foram escolhidos dois marcadores nucleares que possuem uma menor taxa de substituição nucleotídica que os genes mitocondriais (Springer *et al.*, 2001). O íntron 7 do gene nuclear Beta-fibrinogênio (*íntron 7-Fgb*), com 745 pares de base, foi escolhido por suplementar os dados de sequências mitocondriais e ser muito empregado em inferências filogenéticas de taxons recentes e por ter evolução mais rápida (Prychitko & Moore, 1997, 2000, Nascimento *et al.*, 2013). O éxon 28 do gene nuclear fator de Von Willebrand (*éxon 28-Vwf*), com 1143 pares de base, foi escolhido por ser muito usado para reconstruções filogenéticas de mamíferos nos vários níveis taxonômicos (Huchon & Douzery, 2001; Galewski *et al.*, 2005).

As reações foram realizadas em termociclador (*Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems*) utilizando iniciadores e ciclagens específicas para cada gene (Tabelas 2 e 3). Para um total de 50µl de reação foi adicionado 1µl de DNA (de 100 ng/µl), 0,4µl dNTPs (25 µM/ml), 0,5µl de cada iniciador (10 pmol/ µl), 5µl tampão de amplificação 10X, 2µl de MgSO₄ e 0,3µl de polimerase Taq Platinum (Invitrogen) e 40,3µl de água ultra pura. Para confirmação da presença dos amplicons, 3µl de produto de PCR foram homogenizados com 2µl de corante de ácidos nucléicos GelRed e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) com tampão de NaOH 1X pH8 (0,4gr NaOH, 2,75gr Ácido Bórico, H₂O q.s.p. 1000ml), observadas no transiluminador ultra violeta (Gel Logic 200, Carestream Health), acoplado ao programa *Quantity One* que fotodocumenta os géis. As amostras devidamente amplificadas foram purificadas utilizando o conjunto de reagentes de purificação *illustra GFX™ PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram novamente corridos em gel de agarose (1,5%) para checar a qualidade das bandas obtidas para então realizar a reação de sequenciamento.

Tabela 2. Iniciadores usados para amplificação (asterisco) e sequenciamento dos marcadores *mt-Cytb*, *mt-Co1*, *íntron 7-Ffg* e *éxon 28-Vwf* com as sequências, sentido das fitas e referência (ref) 1. Irwin *et al.* (1991), 2. Smith & Patton (1993), 3. Cassens *et al.* (2000), 4. Casado *et al.* (2010), 5. Matocq *et al.* (2007), 6. Ward *et al.* (2005), 7. Presente estudo.

Iniciadores	Sequências	Fita	Ref
L14724*	5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'	senso	1
MVZ16	5' AAATAGGAARTATCATTCTGGTTTRAT 3'	anti-senso	2
mt-Sot in 2	5' TGAGGACAAATATCATTYTGAG 3'	senso	3
mt-Cytb rev*	5' GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG 3'	anti-senso	4
β17-mammL*	5' ACCCCAGTAGTATCTGCCGTTTGGATT 3'	senso	5
βfib-mammU*	5' CACAACGGCATGTTCTTCAGCAC 3'	anti-senso	5
FishF1COI*	5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'	senso	6
FishR1COI*	5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'	anti-senso	6
VWF A*	5' CTGTGATGGTGTCAACCTCACCTGTGAA 3'	senso	7
VWF B*	5' TCGGGGGGAGCGTCTCAAAGTCCTGGATG 3'	anti-senso	7
VWF B2	5' GCAGGGTTTCTGTGACCATGTAGACCA 3'	anti-senso	7

Tabela 3. Ciclagens utilizadas para os marcadores mitocondriais (*mt-Cytb*, *mt-Co1*) e nucleares (*íntron 7-Fgb*, *éxon 28-Vwf*), especificando as temperaturas e os tempos em segundos (seg) ou minutos (min).

Gene	Des	Ciclos	Extensão
<i>mt-Cytb</i>	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 48°C 45seg, 72°C 90seg)	72°C 4min
<i>mt-Co1</i>	94°C 2min	5 ciclos (94°C 30seg, 42°C 30seg, 72°C 1min) 5 ciclos (94°C 30seg, 40°C 30seg, 72°C 1min) 25 ciclos (94°C 30seg, 38°C 30seg, 72°C 1min)	72°C 1min
<i>íntron 7-Fgb</i>	94°C 4min	35 ciclos (94°C 45seg, 58°C 30seg, 72°C 90seg)	72°C 4min
<i>éxon 28-Vwf</i>	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 65°C 45seg, 72°C 90seg)	72°C 4min

3.3.2. Sequenciamento e alinhamento

Os produtos purificados foram sequenciados com o conjunto de reagentes *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram preparadas da mesma forma para cada amostra com cada um dos iniciadores separadamente. Para um volume de 10µl de reação utilizou-se: 2µl do produto purificado (*Template*), 1,5µl de tampão *Ready Reaction Kit*, 1µl do tampão *BigDye Sequencing Buffer (5x)*, 1µl de iniciador (3,2 pmol/ µl, Tabela 2) e 4,5µl H₂O ultra pura. As reações foram realizadas no termociclador (*Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático “ABI 3130xl” Genetic Analyser (Applied Biosystems) da plataforma de sequenciamento da Divisão de Genética do Instituto Nacional de Câncer (INCA). As sequências obtidas foram editadas utilizando os programas Chromas Lite (McCarthy *et al.*, 1998), Chromas Pro versão 1.45 (McCarthy *et al.*, 1998) e alinhadas manualmente no MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Com base em análises filogenéticas preliminares as amostras utilizadas foram separadas em dois grupos nomeados Macrura (*M. macrura* e *M. aff. macrura*) e Didelphoides (*M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*), listadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente, assim como amostras adicionadas do GenBank e seus respectivos números de acesso. As amostras previamente sequenciadas foram obtidas em um trabalho de monografia em 2004 que não resultou em artigo científico.

3.3.3. Filogenia e filogeografia

A identificação dos haplótipos foi realizada com o programa DnaSP versão 5 (Librado & Rozas, 2009) e, para numerar os diferentes haplótipos, foi escolhida a opção “deleção par a par” (*pairwise deletion*) para que o máximo de caracteres fosse utilizado em cada comparação, no caso de dados ausentes. Para as análises de distância genética foi utilizado o algoritmo de distância de Kimura-2-parâmetros (K2p: Kimura, 1980), utilizando a opção de deleção completa, realizadas no programa MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). O modelo de substituição K2p corrige para múltiplas substituições na mesma posição, levando em conta a diferença de frequência entre transições e transversões, assumindo frequências iguais entre os quatro nucleotídeos e que as taxas de substituições não variam entre as posições.

O modelo de substituição para as análises filogenéticas foi escolhido pelo teste de AIC do inglês “Akaike Information Criterion” (Akaike, 1973) com correções (Hurvich & Tsai, 1988; Burnham & Anderson, 2003), através do programa jModelTest versão 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). As análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram realizadas com o programa PhyML versão 3.1 (Guindon & Gascue, 2003) e a confiabilidade dos ramos foi calculada com o método de reamostragem de bootstrap utilizando 1000 gerações. As análises de Inferência Bayesiana (IB) foram processadas no programa MrBayes versão 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e o valor de suporte usado para os agrupamentos foi a probabilidade posterior obtida em 10000 gerações, removendo 10% das árvores iniciais.

Para calcular e gerar a rede de haplótipos através da análise de Median-Joining (MJ) utilizou-se o programa Network versão 4.6.1.3 (Bandelt *et al.*, 1999) que adota a parcimônia como critério. Esta análise foi realizada apenas para o marcador mitocondrial Citocromo *b*, sendo uma análise com todos os haplótipos e outras duas com cada complexo (Macrura e Didelphoides) em separado.

Para as análises das árvores filogenéticas foram adicionadas ao conjunto de dados sequências de *Echimys chrysurus* (MBF73) e *Isothrix negrensis* (CRB2432), sequenciadas neste estudo para todos os marcadores analisados e *Mesomys hispidus* (CRB2054) para os marcadores *mt-Cytb*, *mt-Co1* e *éxon 28-Vwf*. Para as análises com os marcadores *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* foram ainda adicionadas as sequências de *Toromys grandis* (FMNH92198) disponível no GenBank, com os códigos de acesso KF590699 e KF590676, para cada marcador respectivamente.

Tabela 14. Amostras do complexo *Didelphoides* utilizadas nas análises moleculares, com números de campo ou de museu (ID), números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidade e referências (Ref). 1= presente estudo, 2= previamente sequenciadas, 3= Da Silva & Patton (1993), 4. Patton *et al.* (2000), 5. Engstrom *et al.* (ainda não publicado).

Taxon	ID	<i>mt-Cytb</i>	<i>mt-Co1</i>	<i>éxon 28-Vwf</i>	Localidade	Ref
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793, CRB1801	EU302690.1, EU302691.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, lg. Bigorna	1,2
<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	EU302692.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto	1,2
<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, PARNA Viruá	1
<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: TO, São Valério da Natividade	1
<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, rio Anauá-rio Branco	1
<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2297, JAO2311	Sem GB	Sem GB	Sem GB	BR: RR, Caracará, rio Anauá	1
<i>M. didelphoides</i>	LHE554, LHE595, LHE632	L23361.1, L23362.1, L23364.1	Sem GB	Sem GB	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu	3
<i>M. didelphoides</i>	LHE600/T3530	L23363.1	Sem GB	AJ849311.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu	3
<i>M. didelphoides</i>	V1251, V1566	EU302704.1, EU302705.1.	Sem GB	Sem GB	GF: Cayenne	2
<i>M. didelphoides</i>	ECH4, TTS380, TTS383	EU313230.1, EU313233.1, EU313234.1	Sem GB	Sem GB	BO: Santa Cruz, Flor de Oro, m.e. rio Iténez, Prq Noël Kempff Mercado	4
<i>M. didelphoides</i>	LCP700	EU313231.1	Sem GB	Sem GB	BR: TO, rio Santa Teresa	4
<i>M. didelphoides</i>	ROM107837,	Sem GB	JF458607.1,	Sem GB	VE: Pozon, 50Km a NE de Puerto Ayacucho	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM109023, ROM111775.	Sem GB	JF458608.1, JF458626.1.	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM119133	Sem GB	JF458622.1,	Sem GB	GY: Acima de Takutu Essequibo, sítio Dadanawa	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM107377, ROM107375, ROM107374, ROM107362, ROM107371, ROMF39480,	Sem GB	JF458610.1, JF458613.1, JF458614.1, JF458617.1, JF458627.1, JF444311.1,	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro burro	5

<i>M. didelphoides</i>	ROM107376 ROM109072, ROM107100, ROM107373, ROM109074, ROM109166, ROM109236, ROMF38836,	Sem GB	JF458612.1 JF458609.1, JF458624.1, JF458623.1, JF458625.1, JF458618.1, JF458619.1, JF458611.1,	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni	5
<i>M. didelphoides</i>	ROM109073, ROM107372, ROMF39284, ROM111609, ROM111622, ROM111621	Sem GB	JF458615.1, JF458616.1, JF458620.1, JF458621.1, JF458628.1, JF458629.1	Sem GB	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama	5
<i>M. didelphoides</i>	LCP716/ UFMG3012	EU313232.1	JF297658.1	JF297707.1	BR: TO, rio Santa Teresa	4

Abreviações: I.= ilha, Ig.= Igarapé, m.e.= margem esquerda, Prq.=parque. BO= Bolívia, PE= Peru, GF=Guiana Francesa, GY=Guiana, os estados brasileiros (BR) são: AM=Amazônia, PA=Pará, RR=Roraima, TO=Tocantins. Sem GB=sem número de acesso ao GenBank.

Tabela 5. Amostras do complexo de espécies *Macrura* utilizadas nas análises moleculares, números de campo e/ou museu (id), números de acesso ao GenBank para cada marcador, localidades e referências (ref). 1= presente estudo, 2= previamente sequenciadas, 3= Silva & Patton(1993), 4= Patton *et al.* (2000), 5= Patterson & Velazco (2008).

Taxon	ID	<i>mt-Cytb</i>	<i>mt-Co1</i>	<i>éxon 28-Vwf</i>	Localidade	Ref
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	EU302694.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Itamaraty	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	EU302695.1,	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I.	1,2
	CRB2569	EU302696.1				
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	EU302697.1,	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Urumari	1,2
	CRB2627	EU302698.1,				
	CRB2628	EU302699.1				
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	EU302700.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. do Tigre	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	EU302701.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	EU302702.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari	1,2
<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	EU302703.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu	1,2
<i>M. macrura</i>	JLP15214/T3521	L23356.1	Sem GB	AJ849312.1	BR: AM, perto de Miranda, rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	JLP15394	L23357.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	JLP7191	L23358.1	Sem GB	Sem GB	PE: Huampami, rio Cenepa	3
<i>M. macrura</i>	INPA2474	L23359.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Beruri, m.d. rio Purus	3
<i>M. macrura</i>	MNFS465	L23360.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá	3
<i>M. macrura</i>	DWF466	EU313235.1	Sem GB	Sem GB		5
<i>M. macrura</i>	JLP7197	EU313236.1	Sem GB	Sem GB	PE: Huampami, rio Cenepa	5
<i>M. macrura</i>	MNFS1717	EU313237.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Colocação Vira-Volta, m.e. rio Juruá, Ig. Arabidi	4
<i>M. macrura</i>	MNFS894	EU313238.1	Sem GB	Sem GB	BR: AM, Altamira, m.e. rio Juruá	4

Abreviações: i. = ilha, ig.= igarapé, m.e.= margem esquerda, PE= Peru, o estado brasileiro (BR) é AM=Amazônia. Sem GB= sem número de acesso do GenBank

4. RESULTADOS

4.1. Análises cariotípicas

Foram encontrados quatro cariótipos entre as amostras estudadas, todos eles inéditos. O primeiro cariótipo encontrado foi de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro. Para caracterização do cariótipo foram cariotipados o macho CRB2839 e a fêmea CRB2841 que mostraram $2n=72$ e $NF=134$ (Figura 3). O complemento autossômico é composto por 32 pares de cromossomos de dois braços variando gradativamente em tamanho de grande a pequeno, e 3 pares de acrocêntricos pequenos. O cromossomo sexual, X é um submetacêntrico grande e o Y é um cromossomo acrocêntrico pequeno. Não foi possível encontrar metáfases completas com banda CGB e GTG.

O segundo cariótipo encontrado de *M. aff. didelphoides*. Para a caracterização do mesmo foram cariotipados o macho CRB1801 e a fêmea CRB2496 que mostraram um cariótipo inédito com $2n=76$ e $NF=134$ (Figura 4). O complemento autossômico é composto por 30 pares cromossomos de dois braços, sendo um submetacêntrico grande, o maior da composição, e o restante variando gradativamente em tamanho de grande a pequeno, e 7 pares de acrocêntricos, sendo o primeiro par maior que os demais, que não possuem grande variação em tamanho. O cromossomo sexual X é um metacêntrico grande e o Y o menor cromossomo de dois braços da composição. As bandas CBG e GTG não foram possíveis para estes espécimes devido a pouca quantidade de metáfases nas preparações.

O terceiro cariótipo foi encontrado em *M. didelphoides* de Caracarái, estado de Roraima. Para a caracterização do cariótipo, foram cariotipados o macho JAO2295 e a fêmea JAO2298 que mostraram $2n=64$ e $NF=100$ (Figura 5). O complemento autossômico é formado por 19 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, variando em tamanho de grande a pequeno, e 24 cromossomos acrocêntricos, sendo o primeiro par maior, com quase o dobro do tamanho em relação aos demais que possuem pouca variação de tamanho entre eles. O cromossomo sexual X é um submetacêntrico grande e o Y é um cromossomo metacêntrico pequeno. As bandas GTG e CBG (Figuras 6 e 7) ajudam a confirmar a montagem do cariótipo em coloração convencional, por evidenciarem a posição do centrômero no caso da banda CBG, e por facilitarem o pareamento em GTG. O

bandeamento CBG, mostrou bandas positivas para todos os cromossomos, salvo o cromossomo sexual Y, que totalmente heterocromático.

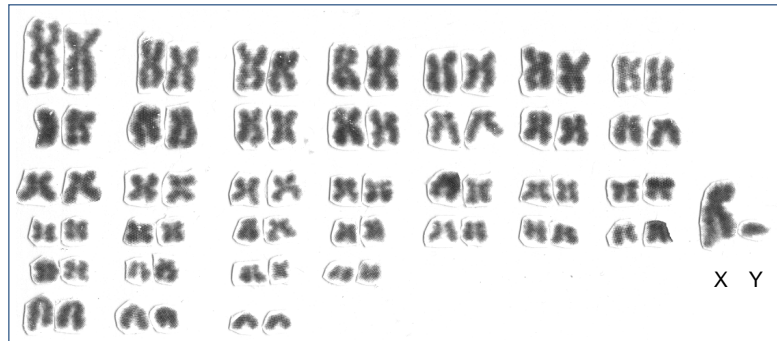


Figura 3. Cariótipo de *M. aff. macrura* em coloração convencional do macho CRB2839 com $2n=72$ e $NF=134$.



Figura 4. Cariótipo de *M. aff. didelphoides* em coloração convencional com $2n=76$ e $NF=134$, do macho CRB1801 em cima, e da fêmea CRB2496 em baixo.

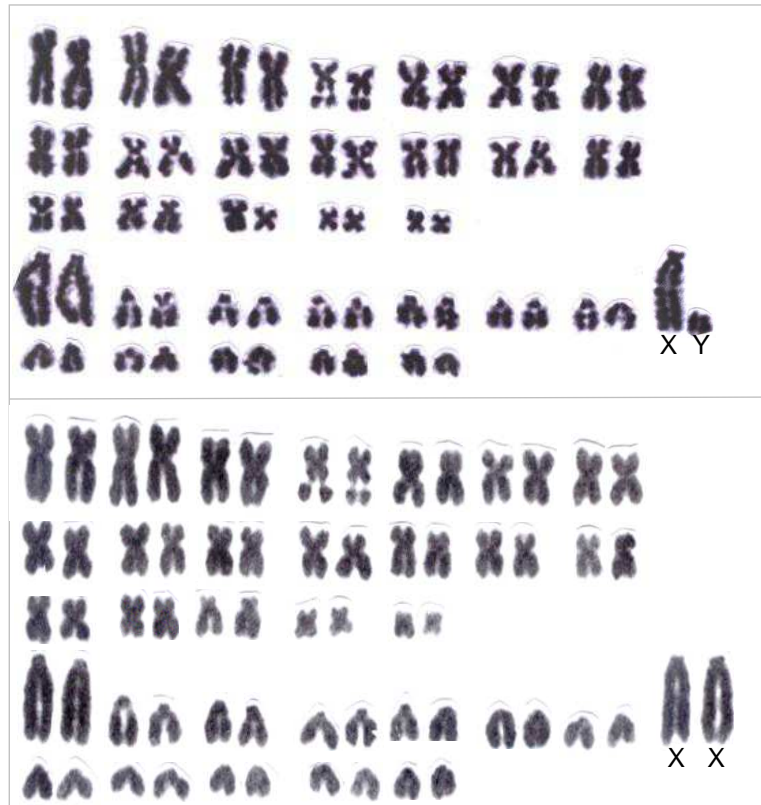


Figura 5. Cariótipos de *M. didelphoides* em coloração convencional com $2n=64$ e $NF=100$, acima macho JAO2295 e abaixo fêmea JAO2298, ambos de Caracaraí, RR.

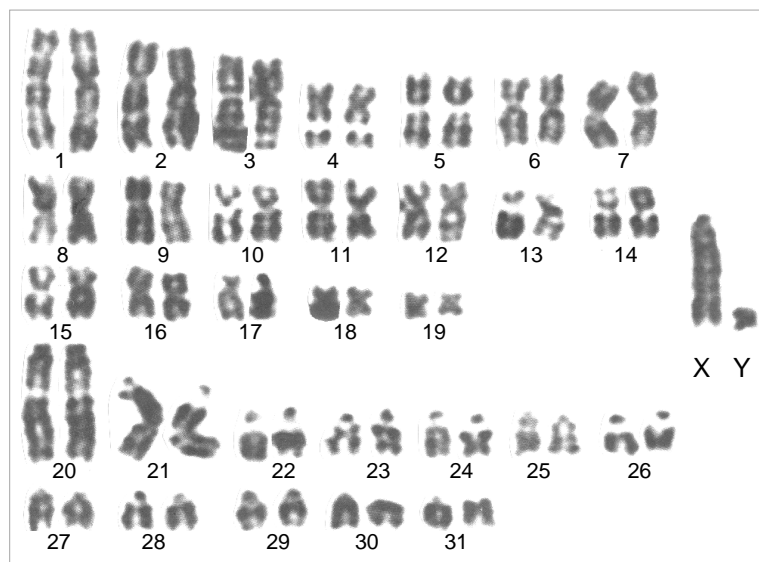


Figura 6. Cariótipo de *Makalata didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$ do espécime JAO2295 ♂ de Caracaraí, RR, com banda GTG

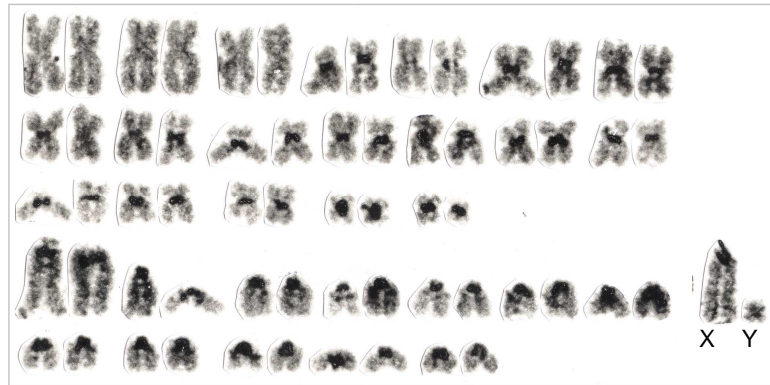


Figura 7. Cariótipo de *Makalata didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$ do espécime JAO2295 ♂ de Caracaraí, RR, com banda CBG.

O quarto cariótipo encontrado no macho CRB3717, único espécime de *Makalata didelphoides* de São Valério da Natividade. Este novo cariótipo possui $2n=68$ e $NF=132$, e o complemento autossômico é formado por 33 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos que variam de tamanho grande a pequeno. (Figura 8). O cromossomo sexual X é um submetacêntrico grande e o Y um metracêntrico pequeno, o menor da composição. Não foi possível obter nenhuma das bandas para esta preparação.

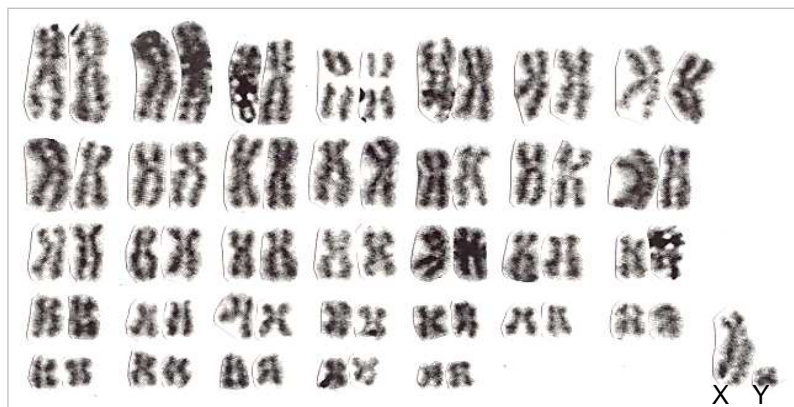


Figura 8. Cariótipo de *M. didelphoides* em coloração convencional com $2n=68$ e $NF=132$, do espécime macho CRB3717 de São Valério da Natividade, TO.

4.2. Análises filogenéticas

Os resultados obtidos para cada gene são apresentados separadamente. Para o gene *mt-Cytb* foram sequenciados apenas seis amostras de *M. didelphoides* da região de Caracaraí, RR, uma vez que as demais amostras já haviam sido sequenciadas e estão disponíveis no GenBank. Para o *mt-Co1* e o éxon 28-*Vwf*, foram sequenciadas 10 *M. aff. macrura*, cinco *M. didelphoides* e quatro *M. aff. didelphoides* e para o *intron 7-Fgb* foram sequenciadas nove *M. aff. macrura* e duas *M. didelphoides* e três *M. aff. didelphoides*. Não foi possível sequenciar as demais amostras com este marcador devido a problemas com o sequenciamento da fita reversa. No intuito de descartar a possibilidade de contaminação, para todas as amostras que apresentaram resultados discordantes entre as topologias, foram refeitos todos os passos desde a extração de DNA, para cada uma destas amostras em separado.

4.2.1. Gene mitocondrial citocromo *b* - *mt-Cytb*

Foi sequenciado o *mt-Cytb* completo de cinco amostras de *M. didelphoides* e analisadas com as 33 sequências de *mt-Cytb* de *Makalata* disponíveis no GenBank (Tabelas 4 e 5). A análise das 39 sequências revelou nove sequências e nove haplótipos de *M. macrura*, 10 sequências e cinco haplótipos de *M. aff. macrura*, 16 sequências e 13 haplótipos de *M. didelphoides*, e quatro sequências e quatro haplótipos de *M. aff. didelphoides* (Tabela 6), totalizando 31 haplótipos. As estimativas de distância genética intraespecífica (Tabela 7) variaram de 0,1 a 7,0% para *M. macrura*, de 0,1 a 12,2% para *M. didelphoides*, de 0,1 a 0,5% para *M. aff. macrura*, e de 0,2 a 2,8% para *M. aff. didelphoides*. As estimativas de distância genética interespecífica variaram de 17,1 a 18,2% entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*, 13,1 a 17,8% entre *M. macrura* e *M. didelphoides*, 13,4 a 17,3% entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, 10,1 a 13,9% entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides* e 9,2 a 11,2% entre *M. macrura* e *M. aff. macrura*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de *mt-Cytb* de *Makalata* foi o HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição gamma) que é um modelo que assume frequências de base iguais e considera as taxas de transições e transversões como sendo igual a um. As árvores resultantes da análise Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (MV) foram geradas utilizando este mesmo modelo. As análises de MV e IB geraram topologias semelhantes confirmando o

monofiletismo de *Makalata* [1 probabilidade posterior (pp) e 99% bootstrap(BS)] e das espécies *M. didelphoides* e *M. macrura*. Os haplótipos de *Makalata* aparecem divididos em dois clados, um com *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, aqui designado complexo *Didelphoides*, e o outro com *Makalata macrura* e *M. aff. macrura*, aqui designado complexo *Macrura* (Figura 9).

O clado complexo *Didelphoides*, com altos valores de suporte [1 probabilidade posterior (pp) e 91% bootstrap (BS)], ficou dividido em dois grupos, um com haplótipos de *M. didelphoides* (0,8 pp, 79% BS) e outro com haplótipos do interflúvio dos rios Negro e Branco (1 pp, 100% BS), sugerindo uma linhagem diferente de *M. didelphoides*, aqui nomeada de *M. aff. didelphoides*. No clado *M. didelphoides* os haplótipos da Bolívia (1 pp, 100% BS) se separaram do clado com os demais haplótipos (1 pp, 88% BS). Neste último clado, o haplótipo LHE595 de Altamira, PA é a primeira linhagem a divergir seguida do clado (1 pp, 99% BS) com haplótipos de Caracarái, e do clado com o restante dos haplótipos (1 pp, 97% BS). Neste último clado o haplótipo de Cayenne aparece como grupo irmão do clado com haplótipos do TO e PA (1 pp, 84% BS), com os haplótipos de localidades do Tocantins (1 pp, 100% BS) agrupados à parte do clado com haplótipos do Pará (1 pp, 100% BS, Figura 9).

O complexo *Macrura* (1 pp, 100% BS) aparece dividido em dois clados, um com haplótipos de *M. macrura* (1 pp, 91% BS) como grupo irmão do clado (1 pp, 100% BS) com haplótipos das ilhas do rio Negro, aqui designados *M. aff. macrura*. O clado dos haplótipos de *M. macrura* aparece dividido em dois, um apenas com o haplótipo de Beruri, AM, e o outro (1 pp, 98% BS) com o restante dos haplótipos divididos em dois grupos, um com haplótipos do Peru e de Colocação do Vira –Volta sem suporte, e outro (0,9 pp, 96% BS) com haplótipos da região do rio Juruá, no estado do Amazonas.

Tabela 15. Lista de haplótipos do *mt-Cytb*, discriminando o táxon, número de campo ou museu (ID), número do GenBank, e localidade de coleta. BO= Bolívia, GF= Guiana Francesa, PE= Peru. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig. = igarapé, I.= ilha do rio Negro, PARNA=Parque Nacional. m.e.=margem esquerda

Hap	Taxon	ID	GENBANK	Localidade
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	EU302703.1	BR: AM, Barcelos, I. Cururu
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	EU302694.1	BR: AM, Barcelos, I. do Itamaraty
HÁ	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628	EU302698.1, EU302699.1	BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
HB	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568, CRB2569	EU302695.1, EU302696.1	BR: AM, Barcelos, I.
HC	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	EU302697.1	BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
HC	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	EU302701.1	BR: AM, Barcelos, I. Giriau
HD	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	EU302700.1	BR: AM, Barcelos, I. do Tigre
HE	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	EU302702.1	BR: AM, Barcelos, I. Budari
HF	<i>M. macrura</i>	JLP7191	L23358.1	PE: Huampami (Aguaruma Village), rio Cenepá
HG	<i>M. macrura</i>	JLP7197	EU313236.1	PE: Huampami (Aguaruma Village), rio Cenepá
HH	<i>M. macrura</i>	JLP15214	L23356.1	BR: AM, perto de Miranda, rio Juruá
HI	<i>M. macrura</i>	JLP15394	L23357.1	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá
HJ	<i>M. macrura</i>	MNFS465	L23360.1	BR: AM, Nova Empresa, m.e. rio Juruá
HK	<i>M. macrura</i>	MNFS894	EU313238.1	BR: AM, Altamira, m.e. rio Juruá
HL	<i>M. macrura</i>	MNFS1717	EU313237.1	BR: AM, Colocação Vira-Volta, m.e. rio Juruá, Ig. Arabidi
HM	<i>M. macrura</i>	DWF466	EU313235.1	
HN	<i>M. macrura</i>	INPA2474	L23359.1	BR: AM, Beruri, m.d. rio Purus
HO	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	EU302690.1	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
HP	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	EU302691.1	BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
HQ	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	EU302692.1	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
HR	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273		BR: RR, Caracaraí, PARNA Viruá
HS	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291		BR: RR, rio Anauá próximo ao rio Branco
HS	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295		BR: RR, Caracaraí, rio Anauá
HT	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297		BR: RR, Caracaraí, rio Anauá
HU	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311		BR: RR, Caracaraí, rio Anauá
HV	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717		BR: TO, São Valério da Natividade
HW	<i>M. didelphoides</i>	ECH4	EU313230.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, rio Iténez, m.e., PARNA Noël Kempff Mercado
HW	<i>M. didelphoides</i>	TTS383	EU313234.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, rio Iténez, m.e., PARNA Noël Kempff Mercado
HX	<i>M. didelphoides</i>	V1251, V1566	EU302704.1, EU302705.1	GF: Cayenne
HZ	<i>M. didelphoides</i>	LHE554	L23361.1	BR: PA, Altamira, m.e. rio Xingu
HAA	<i>M. didelphoides</i>	LHE595	L23362.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu
HAB	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	L23363.1	BR: PA, Altamira, m.d. rio Xingu
HAC	<i>M. didelphoides</i>	LHE632	L23364.1	BR: AM, Altamira, m.e. rio Xingu
HAD	<i>M. didelphoides</i>	TTS380	EU313233.1	BO: Sta Cruz, Flor de Oro, m.e. rio Iténez, PARNA Noël Kempff Mercado
HAE	<i>M. didelphoides</i>	LCP700	EU313231.1	BR: TO, rio Santa Teresa
HAF	<i>M. didelphoides</i>	LCP716	EU313232.1	BR: TO, rio Santa Teresa

Tabela 7. Estimativas das distâncias genéticas (em porcentagem) entre haplótipos de *Makalata* com *mt-Cytb*, com o modelo de Kimura 2-
parâmetros. Para identificação dos haplótipos veja Tabela 7.

Hap	Amostras	HB	HC	HA	HE	HD	HF	HG	HI	HM	HJ	HH	HK	HL	HN	HO	HP	HQ	HR	HS	HU	HT	HAC	HX	HZ	HAE	HAF	HAB	HV	HAA	HW	
HB	CRB2568																															
HC	CRB2839	0,2																														
HA	CRB2841	0,4	0,2																													
HE	CRB2840	0,4	0,3	0,1																												
HD	CRB2832	0,4	0,3	0,4	0,5																											
HF	JLP7191	9,2	9,2	9,4	9,5	9,7																										
HG	JLP7197	9,4	9,4	9,5	9,7	9,8	0,1																									
HI	JLP15394	9,5	9,5	9,4	9,5	10,0	3,0	2,8																								
HM	DWF466	9,2	9,2	9,4	9,5	9,7	3,2	3,1	0,1																							
HJ	MNFS465	9,8	9,8	9,7	9,5	10,3	3,5	3,4	0,5	2,3																						
HH	JLP15214	10,3	10,4	10,2	10,3	10,7	3,5	3,4	2,3	3,1	2,8																					
HK	MNFS894	9,9	9,9	9,8	9,9	10,4	4,4	4,3	2,7	2,7	3,2	3,8																				
HL	MNFS1717	10,1	10,1	10,3	10,4	10,3	4,6	4,4	5,8	5,6	6,1	6,1	6,5																			
HN	INPA2474	11,0	11,1	11,1	11,2	11,2	6,5	6,4	6,4	6,1	6,7	6,2	6,8	7,0																		
HO	CRB1793	17,2	17,2	17,4	17,2	17,1	17,2	17,0	16,0	15,7	16,3	18,0	16,2	16,9	18,9																	
HP	CRB1801	17,5	17,5	17,6	17,5	17,4	17,6	17,4	16,3	16,0	16,7	18,3	16,6	17,2	18,9	0,2																
HQ	CRB2496	18,0	18,0	18,1	17,9	17,8	17,4	17,2	16,2	15,9	16,5	18,5	16,0	17,0	18,8	0,9	0,9															
HR	JAO2273	18,1	18,1	18,2	18,1	18,0	18,4	18,3	17,9	16,9	18,3	19,2	17,8	18,4	19,4	2,4	2,4	2,8														
HS	JAO2295	16,4	16,4	16,3	16,4	16,7	16,8	17,0	16,1	16,6	16,4	16,4	16,3	16,4	15,6	11,8	11,8	12,3	12,2													
HU	JAO2311	16,5	16,5	16,4	16,5	16,8	16,8	17,0	16,1	16,6	16,4	16,4	15,9	16,4	15,6	12,1	12,1	12,5	12,4	0,4												
HT	JAO2297	16,9	16,9	16,8	16,9	17,3	17,6	17,8	16,9	17,4	17,2	17,2	17,1	17,2	16,3	12,5	12,5	12,9	12,4	0,6	1,0											
HAC	LHE632	13,9	14,1	14,3	14,4	14,3	15,4	15,6	14,3	14,8	14,6	14,9	14,8	14,9	15,3	10,2	10,2	10,1	11,7	8,1	8,4	8,8										
HX	V1251	16,1	16,1	16,1	16,2	16,5	15,9	16,1	14,4	15,0	15,1	16,0	14,9	15,7	16,4	11,8	11,8	11,9	12,4	8,2	8,6	8,9	5,3									
HZ	LHE554	14,3	14,4	14,6	14,7	14,6	15,4	15,6	14,6	15,1	14,9	15,3	15,1	14,9	15,6	10,5	10,5	10,4	11,7	8,4	8,7	9,1	0,3	5,5								
HAE	LCP700	13,4	13,6	13,8	13,9	14,1	14,9	15,1	14,1	14,2	14,4	14,4	15,1	14,6	15,9	12,4	12,4	12,2	13,7	8,5	9,0	9,2	3,6	5,4	3,9							
HAF	LCP716	13,7	13,8	14,0	14,1	14,3	15,1	15,3	14,3	14,5	14,6	14,6	15,3	14,8	16,1	12,6	12,6	12,4	13,9	8,7	9,1	9,4	3,8	5,5	4,0	0,1						
HAB	LHE600	16,0	16,2	16,3	16,4	16,4	15,5	15,7	14,7	14,8	15,0	16,3	15,1	15,0	16,7	11,0	11,0	11,1	11,1	8,8	9,0	9,5	0,3	5,3	0,1	3,9	4,1					
HV	CRB3717	15,7	15,7	15,7	15,8	16,0	15,1	15,3	14,3	14,4	14,6	16,2	15,2	14,8	17,0	12,2	12,2	12,3	12,7	8,9	9,1	9,6	3,7	5,2	3,9	0,4	0,5	4,0				
HAA	LHE595	15,2	15,4	15,4	15,5	15,7	14,4	14,2	13,1	13,3	13,7	15,0	13,4	14,4	15,5	12,3	12,3	12,5	13,4	10,1	10,3	10,2	9,5	9,2	9,8	9,3	9,5	9,7	9,2			
HW	ECH4	16,9	17,0	16,9	16,7	17,2	16,4	16,2	14,9	14,9	15,2	15,5	15,4	15,9	16,4	11,3	11,6	11,7	13,0	10,6	10,6	11,4	11,1	11,8	11,4	12,0	12,2	11,4	12,1	11,3		
HAD	TTS380	16,5	16,7	16,5	16,4	17,2	16,7	16,6	15,2	15,2	15,6	15,9	15,7	16,5	16,7	11,6	11,9	12,0	13,3	10,6	10,6	11,4	10,8	11,8	11,1	12,0	12,2	11,1	12,1	11,3	0,5	

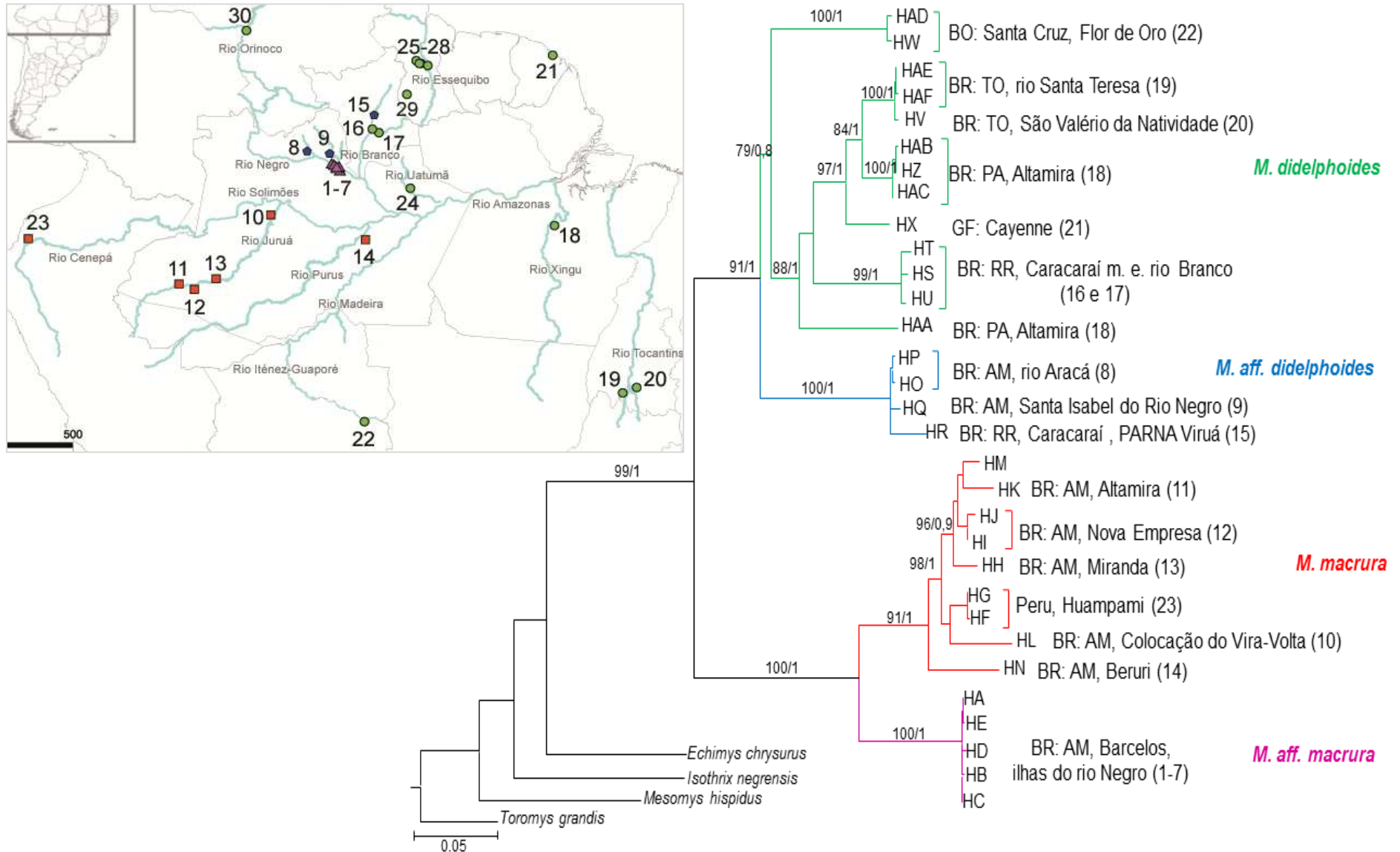


Figura 9. Topologia de ML para o gênero *Makalata* com o *mt-Cytb*. Os números próximos aos ramos são os valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos ver tabela 6. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia e os números entre parêntesis são referentes às localidades do mapa.

4.2.2. Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 - *mt-Co1*

As análises das sequências do *mt-Co1* de cinco amostras de *M. didelphoides* obtidas neste trabalho e 25 disponíveis no GenBank revelaram 13 haplótipos, as quatro sequências de *M. aff. didelphoides* aqui obtidas revelaram quatro haplótipos, e as 10 amostras de *M. aff. macrura* aqui sequenciadas revelaram quatro haplótipos, num total de 21 haplótipos para este marcador (Tabela 8). As estimativas de distância genética intraespecíficas com o modelo Kimura 2-parâmetros (Tabela 9) variaram de 0,2 a 0,6% para *M. aff. macrura*, de 0,2 a 1,8% para *M. aff. didelphoides*, e de 0,2 a 14,5% para *M. didelphoides*. As estimativas de distância genética interespecíficas (Tabela 9) variam de 9,0 a 12,3 entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides*, de 11,6 a 15,0 entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, e de 12,1 a 12,7 entre *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de *mt-Co1* de *Makalata* foi o TrN (Tamura & Nei, 1993) + G (distribuição gamma) que é um modelo que considera as frequências de variação de bases, taxas de transversões iguais e taxas de transição variável. As topologias resultantes da análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança foram geradas utilizando este mesmo modelo.

As análises filogenéticas geraram topologias semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* [93% bootstrap (BS), 1 probabilidade posterior (pp)], com a maioria dos ramos bem suportados. O gênero ficou dividido em dois clados, (1) primeiro sem suporte agrupando os haplótipos da reserva de Iwokrama (localidade 25 a 28, Figura 10), (2) o segundo com pouco suporte (66% BS, 0,9 pp), com o restante das linhagens, *M. didelphoides*, *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Neste segundo clado os haplótipos ficaram divididos em três ramos, (a) o primeiro (100% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura* das localidades 1 a 7, e o haplótipo CRB3717 de *M. didelphoides* da localidade 20 em São Valério da Natividade, (b) o segundo (99% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. didelphoides* das localidades 8, 9 e 15, (c) o terceiro, sem suporte, com haplótipos de *M. didelphoides* das localidades 16 e 17, agrupado com os haplótipos da localidade 19 em Tocantins (Hc21), localidade 29 no Alto Takutu-Alto Essequibo, na Guiana, e localidade 30 em Pozon, na Venezuela.

Tabela 8. Lista de haplótipos de *Makalata* com *mt-Co1*, discriminando a espécie, números de campo ou museu (ID), números do GenBank, e as localidades. BO= Bolívia, GY= Guiana, PE= Peru. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig. = igarapé, i.= ilha do rio negro, PARNA=Parque Nacional.

Hap	Taxon	ID	GENBANK	Localidade
Hc1	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793		BR: AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hc2	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801		BR: AM, Barcelos, Ig. Bigorna
Hc5	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496		BR: AM, Sta Isabel do Rio Negro
Hc9	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273		BR: RR, Caracaraí, PARNA Viruá
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466		BR: AM, Barcelos, I. do Itamaraty
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628		BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840		BR: AM, Barcelos, I. Budari
Hc4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841		BR: AM, Barcelos, I. Cururu
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568		BR: AM, Barcelos, rio Negro, ilha
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2569		BR: AM, Barcelos, rio Negro, I.
Hc6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832		BR: AM, Barcelos, I. do Tigre
Hc7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626		BR: AM, Barcelos, I. do Urumari
Hc8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839		BR: AM, Barcelos, I. Giriau
Hc10	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291		BR: RR, rio Anauá
Hc10	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2297, JAO2311		BR: RR, Caracaraí, rio Branco
Hc3	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717		BR: TO, São Valério da Natividade
Hc11	<i>M. didelphoides</i>	ROM109023	JF458608	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama
Hc11	<i>M. didelphoides</i>	ROM107377, ROM107375, ROM107374, ROM107362, ROM107371	JF458610, JF458613, JF458614, JF458617, JF458627	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc12	<i>M. didelphoides</i>	ROM109072, ROM107100,	JF458609, JF458624,	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc12	<i>M. didelphoides</i>	ROM111775	JF458626	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama
Hc13	<i>M. didelphoides</i>	ROM107373, ROM107372, ROMF39284,	JF458615, JF458616, JF458620,	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, RIO Burro Burro
Hc13	<i>M. didelphoides</i>	ROM109074	JF458623	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc14	<i>M. didelphoides</i>	ROM109166, ROM109236, ROM109073	JF458618, JF458619, JF458625	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc15	<i>M. didelphoides</i>	ROM111622, ROM111609	JF458628, JF458621	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama
Hc16	<i>M. didelphoides</i>	ROM111621	JF458629	GY: Potaro-Siparuni, Kabukalli Landing, reserva Iwokrama
Hc17	<i>M. didelphoides</i>	ROMF38836	JF458611	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Siparuni
Hc17	<i>M. didelphoides</i>	ROMF39480	JF444311	GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc18	<i>M. didelphoides</i>	ROM119133	JF458622	GY: AltoTakutu-Alto Essequibo,

Hc19	<i>M. didelphoides</i>	ROM107376	JF458612	sítio Dadanawa GY: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama, rio Burro Burro
Hc20	<i>M. didelphoides</i>	ROM107837	JF458607	VE: Pozon, 50Km NE Puerto Ayacucho
Hc21	<i>M. didelphoides</i>	UFMG 3012	JF297658	BR: TO, rio Santa Teresa

Tabela 9. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de *Makalata* com o marcador *mt-Co1*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Para identificação dos hapótipos veja Tabela 9.

Hap.	Amostras	Hc1	Hc2	Hc5	Hc9	Hc20	Hc10	Hc15	Hc14	Hc17	Hc13	Hc16	Hc11	Hc12	Hc19	Hc18	Hc21	Hc3	Hc4	Hc6	Hc7		
Hc1	CRB1793																						
Hc2	CRB1801	0,2																					<i>Makalata aff. didelphoides</i>
Hc5	CRB2496	0,6	0,5																				
Hc9	JAO2273	1,1	1,3	1,8																			
Hc20	JF458607	9,8	9,6	9,0	9,4																		
Hc10	JAO2295	9,9	9,8	9,6	9,2	7,2																	
Hc15	JF458628	10,1	9,9	10,5	9,8	9,8	7,7																
Hc14	JF458616	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,5															
Hc17	JF444311	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,3	0,5														<i>Makalata didelphoides</i>
Hc13	JF458619	10,3	10,1	10,7	9,9	10,0	7,5	0,2	0,3	0,2													
Hc16	JF458624	10,5	10,3	10,9	10,1	10,1	7,7	0,3	0,5	0,3	0,2												
Hc11	JF458629	10,7	10,5	11,1	9,9	9,8	7,2	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5											
Hc12	JF458613	10,7	10,5	11,1	9,9	10,0	7,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5	0,3										
Hc19	JF458612	10,9	10,7	11,3	10,1	10,1	7,7	0,6	0,8	0,6	0,5	0,6	0,5	0,2									
Hc18	JF297658	10,9	10,7	10,9	10,1	6,3	7,8	9,8	10,0	10,0	10,0	10,2	10,0	10,0	10,2								
Hc21	JF458622	10,9	11,1	11,3	10,1	6,7	7,6	11,1	11,3	11,3	11,3	11,5	11,3	11,3	11,5	6,7							
Hc3	CRB3717	12,1	11,9	12,3	12,1	13,7	11,4	13,3	12,7	13,1	13,1	13,3	13,1	13,1	13,1	12,6	14,5						
Hc4	CRB2840	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,2					<i>Makalata aff.</i>
Hc6	CRB2626	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,5	0,3				<i>macrura</i>
Hc7	CRB2568	12,3	12,1	12,5	12,3	13,9	11,6	13,5	12,9	13,3	13,3	13,5	13,3	13,3	13,3	12,8	14,8	0,5	0,3	0,3			
Hc8	CRB2839	12,5	12,3	12,7	12,5	14,1	11,8	13,7	13,1	13,5	13,5	13,7	13,5	13,5	13,5	13,0	15,0	0,6	0,5	0,2	0,5		

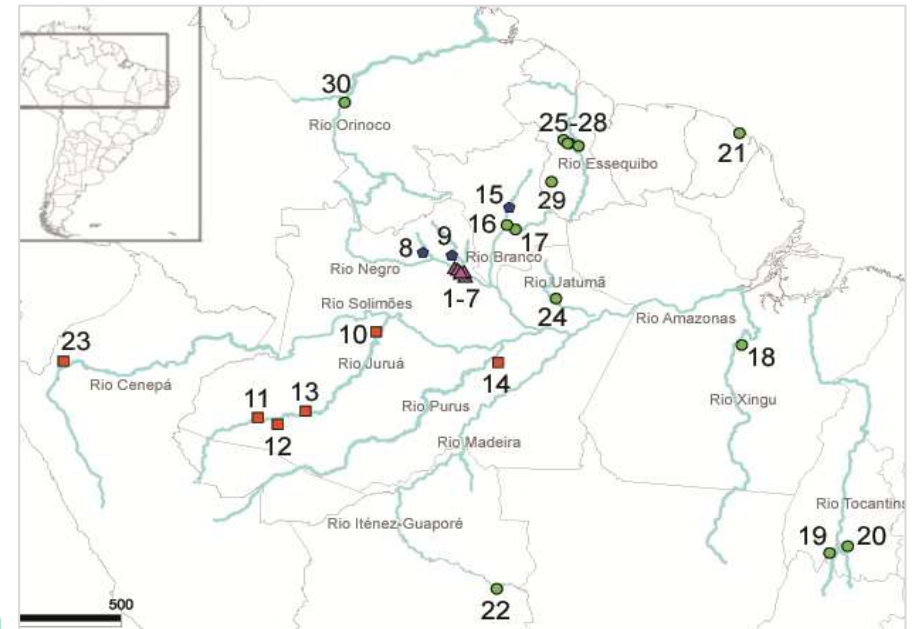
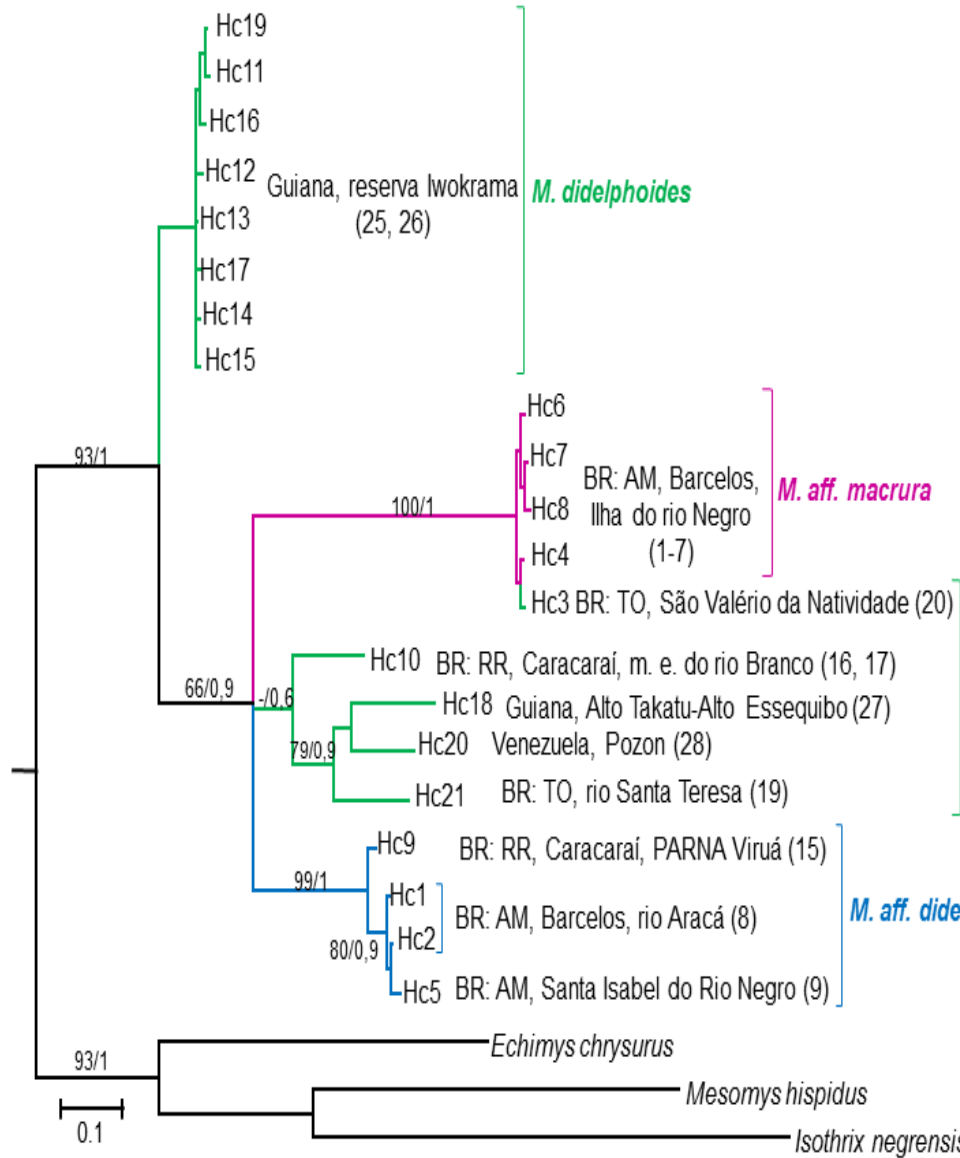


Figura 10. Topologia de ML para o gênero *Makalata* com o *mt-Co1*. Os números próximos aos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos ver tabela 9. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia, os números entre parênteses fazem referência aos números das localidades do mapa.

4.2.3. Íntron 7 do gene Beta-fibrinogênio - íntron 7-Fgb

A análise das sequências do íntron 7-Fgb de duas amostras de *M. didelphoides* revelou um haplótipo, de três amostras de *M. aff. didelphoides* revelou dois haplótipos, e de nove amostras de *M. aff. macrura* revelou cinco haplótipos, totalizando oito haplótipos em 14 amostras de *Makalata* (Tabela 10). As distâncias genéticas intraespecíficas estimadas com o modelo Kimura 2-parâmetros (Tabela 11) variaram de 0 a 0,4% para *M. aff. didelphoides*, 0,3 a 1,5% para *M. aff. macrura*, 0 a 0,6% para *M. didelphoides*, 0,4 a 1,8% entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*, e 0,2 a 0,5% entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*. As distâncias genéticas interespecíficas estimadas variam de 0,2 a 0,5 entre *M. aff. macrura* e *M. didelphoides*, e de 0,4 a 1,8 entre *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* e de 0,5 a 0,6 entre *M. aff. didelphoides* e *M. didelphoides*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de íntron 7-Fgb de *Makalata* foi GTR - General time reversible (Rodríguez *et al.*,1990) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição gamma) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança foram feitas usando esse mesmo modelo. As análises confirmaram o monofiletismo de *Makalata*, no entanto as topologias diferiram e poucos ramos foram bem suportados (Figuras 11). Com este marcador os haplótipos de *M. aff. macrura* aparecem agrupados com haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*. Em ambas as topologias o maior valor de suporte apresentado é o do clado que inclui o haplótipo de *M. aff. didelphoides* (69% BS, 0,8 pp).

Tabela 10. Lista de haplótipos do *íntron 7-Fgb*, discriminando a espécie, número de campo (ID), e a localidade. Os estados brasileiros (BR) são Amazonas (AM) e Roraima (RR). Ig.=igarapé, I.= ilha

Hap	Taxon	ID	Localidade de coleta
Hb1	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793, CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hb3	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Itamaraty
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627, CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Urumari
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
Hb2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
Hb4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, rio Negro, ilha
Hb5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Urumari
Hb6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, Ig. Tigre
Hb7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
Hb8	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295, JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco

Tabela 11 Estimativas das distâncias genéticas (%) entre haplótipos de *Makalata* com o marcador *íntron 7-Fgb*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Para identificação dos haplótipos veja tabela 9.

Hap	Amostras	Hb1	Hb3	Hb4	Hb6	Hb5	Hb2	Hb7	
Hb1	CRB1793								<i>M. aff. didelphoides</i>
Hb3	CRB2496	0,4							
Hb4	CRB2568	0,7	0,4						
Hb6	CRB2832	0,7	0,4	0,3					
Hb5	CRB2626	1,1	0,8	0,4	0,7				<i>M. aff. macrura</i>
Hb2	CRB2466	1,4	1,1	0,7	0,9	0,3			
Hb7	CRB2841	1,8	1,4	1,4	1,5	1,2	1,2		
Hb8	JAO2311	0,6	0,5	0,3	0,5	0,2	0,5	0,3	<i>M. didelphoides</i>

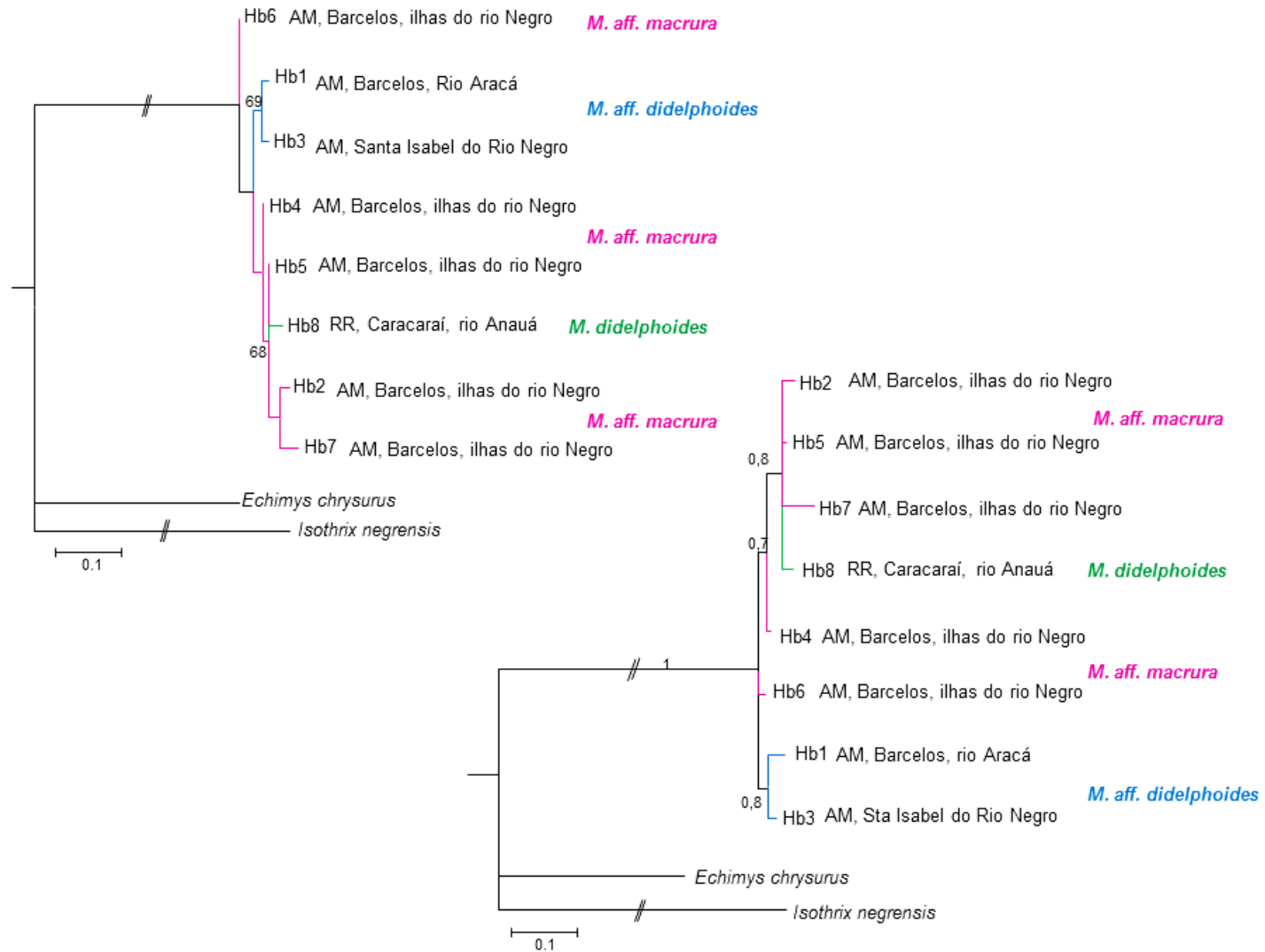


Figura 11. Topologia de MV a esquerda e de IB a direita, para *Makalata* com *íntron 7-Fgb*. Valores próximos aos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 ou probabilidade posterior. Para identificação dos haplótipos ver Tabela 11.

4.2.4. Éxon 28 do fator de Von Willebrand – éxon 28-Vwf

A análise das sequências do éxon 28-Vwf foi realizada para 22 amostras de *Makalata*, sendo sete de *M. didelphoides*, destas cinco foram sequenciadas neste trabalho, quatro de *M. aff. didelphoides*, uma de *M. macrura* do GenBank e 10 de *M. aff. macrura*. Todas as sequências, revelaram haplótipos exclusivos (Tabela 12). As estimativas de distância genética intraespecíficas com o modelo Kimura 2-parâmetros mostraram variação de 0,1 a 1,2% em *M. didelphoides*, 0,1 a 1,5% em *M. aff. macrura* e 0,8 a 1,1% em *M. aff. didelphoides* (Tabela 13). As estimativas de distância genética interespecíficas (Tabela 13) variaram de 0,8 a 1,5 entre *M. macrura* e *M. didelphoides*, de 0,8 a 1,8 entre *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, 0,9 e 1,8 entre *M. macrura* e *M. aff. macrura*, e de 1,1 a 2,7 entre *M. didelphoides* e *M. aff. macrura*, 1,2 a 1,5 entre *M. macrura* e *M. aff. didelphoides*, e 1,3 a 2,4 entre *M. aff. macrura* e *M. aff. didelphoides*.

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências de éxon 28-Vwf de *Makalata* foi o GTR - General time reversible (Rodríguez *et al.*, 1990) + I (sítios invariáveis) + G (distribuição *gamma*) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança (Figura 12) foram feitas usando esse mesmo modelo. As topologias de MV e IB foram semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* (99% BS, 1 pp), dividido em dois clados, um sem suporte com os haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides*, e o outro (62% BS, 0,9 pp) com um haplótipo de *M. macrura* como grupo irmão do clado (90% BS, 0,9 pp) com haplotipos de *M. aff. macrura*. O clado (90% BS, 1 pp) de *M. didelphoides* apresenta três haplótipos colapsados, um subclado (99% BS, 1 pp) com haplótipos de TO e PA, outro (72% BS, 1 pp) com os haplótipos Hv17 e Hv18 de Caracarái. O clado (72% BS, 0,9 pp) de *M. aff. didelphoides* apresenta o haplótipo de Santa Isabel do Rio Negro separado do clado (67% BS, 0,9 pp) com os haplótipos do rio Aracá. No clado do complexo Macrura a única amostra de *M. macrura* fica como grupo irmão do clado (96% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro e um haplótipo de *M. aff. didelphoides* de Caracarái.

Tabela 16. Lista de haplótipos de *éxon 28-Vwf* (Hv) de *Makalata*, discriminando o táxon, número de campo ou de museu (ID) e localidade. Os estados brasileiros são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig.= igarapé, I.= Ilha do rio Negro.

Hap	Táxon	ID	Localidade
Hv1	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
Hv2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Itamaraty
Hv3	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, ilha do rio Negro
Hv6	<i>M. aff. macrura.</i>	CRB2569	AM, Barcelos, rio Negro, I.
Hv7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
Hv8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
Hv9	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, I. Tigre
Hv10	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
Hv11	<i>M. macrura</i>	JLP15214	AM, Miranda, rio Juruá
Hv12	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hv13	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
Hv14	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
Hv15	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	RR, Caracaraí, PARNA Viruá
Hv16	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	RR, Caracaraí, rio Anauá
Hv17	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv18	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv19	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco
Hv20	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	TO, São Valério da Natividade
Hv21	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	PA, Altamira, rio Xingu
Hv22	<i>M. didelphoides</i>	UFMG3012	TO, rio Santa Teresa

Tabela 13. Estimativas das distâncias genéticas (%) entre os haplótipos de *Makalata* com o marcador *éxon 28-Vwf*, com o modelo de Kimura 2-parâmetros. Veja tabela 13 para identificação dos haplótipos.

Hap	Amostras	Hv5	Hv7	Hv2	Hv8	Hv1	Hv15	Hv9	Hv3	Hv6	Hv10	Hv4	Hv11	Hv14	Hv12	Hv13	Hv16	Hv19	Hv18	Hv20	Hv17	Hv22	
Hv5	CRB2568																						
Hv7	CRB2626	0,1																					
Hv2	CRB2466	0,2	0,1																				
Hv8	CRB2839	0,4	0,3	0,2																			
Hv1	CRB2841	0,5	0,4	0,3	0,2																		
Hv15	JAO2273	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6																	
Hv9	CRB2832	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,9																
Hv3	CRB2627	0,6	0,5	0,4	0,6	0,7	0,9	0,4															
Hv6	CRB2569	0,6	0,6	0,7	0,9	0,8	1,1	0,8	0,7														
Hv10	CRB2840	0,9	0,8	0,7	0,6	0,6	0,9	0,6	0,6	1,3													
Hv4	CRB2628	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8	1,3	0,7	0,7	1,5	0,7												
Hv11	JLP15214	1,2	1,1	1,0	0,9	0,9	1,2	1,2	1,1	1,8	1,0	1,4											
Hv14	CRB2496	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,8	1,6	1,6	1,9	1,6	1,8	1,2										
Hv12	CRB1793	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	2,0	1,6	1,8	2,1	2,0	2,1	1,5	1,1									
Hv13	CRB1801	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,9	1,9	1,9	2,4	1,7	2,0	1,2	1,0	0,8								
Hv16	JAO2291	1,4	1,3	1,2	1,1	1,1	1,4	1,4	1,4	1,9	1,2	1,6	0,8	0,9	1,1	0,8							
Hv19	JAO2311	1,5	1,4	1,3	1,2	1,2	1,5	1,5	1,5	2,0	1,3	1,7	0,9	1,0	1,2	0,9	0,1						
Hv18	JAO2297	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,6	1,6	1,6	2,1	1,4	1,8	1,0	1,1	1,3	1,0	0,2	0,3					
Hv20	CRB3717	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,6	1,6	1,6	2,1	1,4	1,8	1,1	1,1	1,4	1,1	0,3	0,4	0,5				
Hv17	JAO2295	1,9	1,8	1,7	1,5	1,6	2,0	1,9	1,9	2,4	1,6	2,0	1,4	1,4	1,6	1,4	0,6	0,6	0,4	0,6			
Hv22	UFMG3012	2,0	2,0	1,9	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	2,6	1,9	2,2	1,5	1,6	1,8	1,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,2		
Hv21	LHE600	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	2,2	2,1	2,1	2,7	2,0	2,3	1,5	1,6	1,8	1,6	0,8	0,8	0,9	1,0	1,2	0,2	

M. aff. macrura

M. macrura

M. aff. didelphoides

M. didelphoides

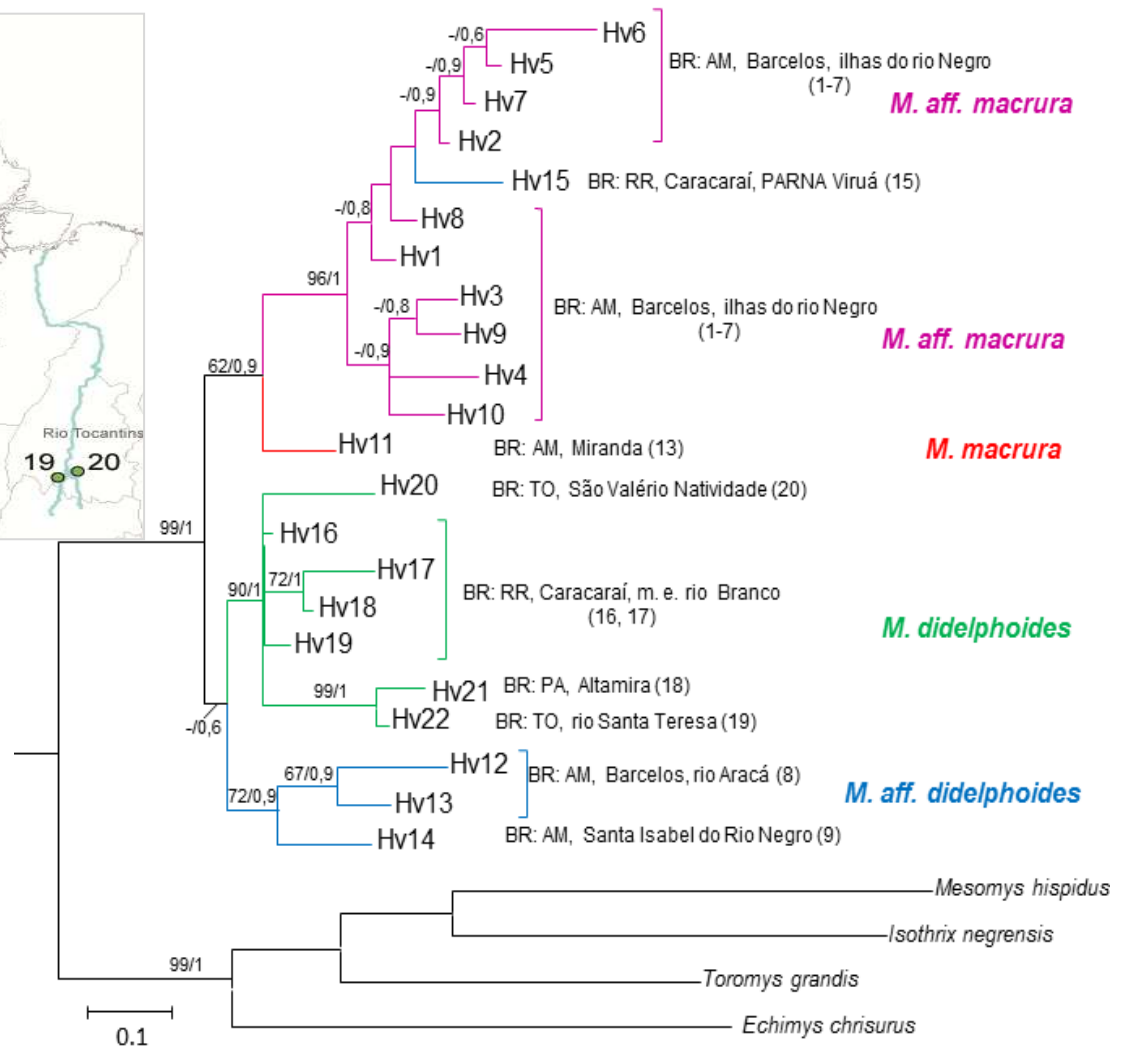
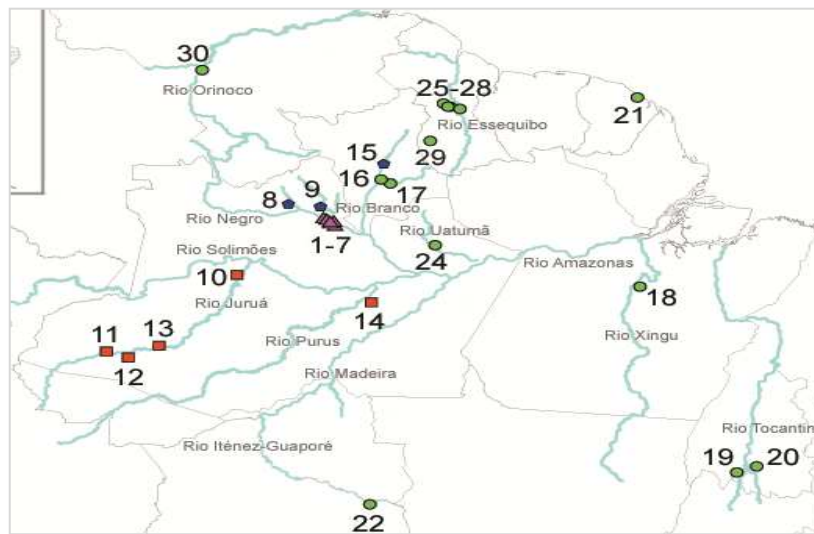


Figura 12. Topologia para o gênero *Makalata* com o éxon 28-Vwf. Os números nos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos haplótipos veja tabela 13. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia. Os números entre parêntesis são referentes as localidades do mapa.

4.2.5. Análise concatenada de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf*

Para a análise concatenada utilizou-se apenas um marcador mitocondrial e um nuclear no intuito de manter na análise o máximo de haplótipos por linhagens. Para o marcador *mt-Co1* grande parte das amostras não foram sequenciadas para os outros marcadores, e não possuímos sequências de *M. macrura* para este marcador.

A análise das sequências concatenadas do *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* foi realizada para 22 amostras de *Makalata*, sendo sete *M. didelphoides* e destas duas são do GenBank, quatro de *M. aff. didelphoides*, e 10 de *M. aff. macrura*, e uma de *M. macrura* disponível no GenBank e todas revelaram haplótipos exclusivos (Tabela 14).

O modelo evolutivo de substituição de bases que melhor explicou o padrão de diferenciação entre as sequências concatenadas de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* de *Makalata* foi o GTR - General Time Reversible (Rodríguez *et al.*, 1990) + G (distribuição *gamma*) que é um modelo que assume uma matriz de substituição simétrica que permite que cada nucleotídeo ocorra em frequências diferentes e que cada par de substituições nucleotídicas ocorra em uma taxa diferente. As árvores geradas a partir de análise Bayesiana e de Máxima Verossimilhança (Figura 13) foram feitas usando esse mesmo modelo. As topologias de MV e IB foram semelhantes confirmando o monofiletismo de *Makalata* (100% BS, 1 pp), dividido em dois clados, um com os haplótipos de *M. didelphoides* e *M. aff. didelphoides* (97% BS, 1 pp), e o outro (100% BS, 1 pp) com um haplótipo de *M. macrura* como grupo irmão do clado (100% BS, 1 pp) com haplótipos de *M. aff. macrura*. O clado com haplótipos de *M. didelphoides* (99% BS, 1 pp) se divide em um clado com haplótipos de TO e PA (100% BS, 1 pp), e outro com os haplótipos de Caracará da margem esquerda do rio Branco (100% BS, 1 pp).

Tabela 14. Lista de haplótipos das sequências concatenadas de *mt-Cytb* e do *éxon 28-Vwf* de *Makalata*, discriminando o táxon, número de campo ou de museu (ID) e localidade. Os estados brasileiros são Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Ig.= igarapé, I.= Ilha do rio Negro.

Hap	Táxon	ID	Localidade
H1	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2466	AM, Barcelos, rio Negro, Ilha Itamaraty
H2	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2568	AM, Barcelos, ilha do rio Negro
H3	<i>M. aff. macrura.</i>	CRB2569	AM, Barcelos, rio Negro, I.
H4	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2626	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H5	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2627	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H6	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2628	AM, Barcelos, rio Negro, I. Urumari
H7	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2832	AM, Barcelos, rio Negro, I. Tigre
H8	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2839	AM, Barcelos, rio Negro, I. Giriau
H9	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2840	AM, Barcelos, rio Negro, I. Budari
H10	<i>M. aff. macrura</i>	CRB2841	AM, Barcelos, rio Negro, I. Cururu
H11	<i>M. macrura</i>	JLP15214	AM, Miranda, rio Juruá
H12	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1793	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
H13	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB1801	AM, Barcelos, rio Aracá, Ig. Bigorna
H14	<i>M. aff. didelphoides</i>	CRB2496	AM, Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto
H15	<i>M. aff. didelphoides</i>	JAO2273	RR, Caracaraí, PARNA Viruá
H16	<i>M. didelphoides</i>	JAO2291	RR, Caracaraí, rio Anauá
H17	<i>M. didelphoides</i>	JAO2295	RR, Caracaraí, rio Branco
H18	<i>M. didelphoides</i>	JAO2297	RR, Caracaraí, rio Branco
H19	<i>M. didelphoides</i>	JAO2311	RR, Caracaraí, rio Branco
H20	<i>M. didelphoides</i>	LHE600	PA, Altamira, rio Xingu
H21	<i>M. didelphoides</i>	CRB3717	TO, São Valério da Natividade
H22	<i>M. didelphoides</i>	UFMG3012	TO, rio Santa Teresa

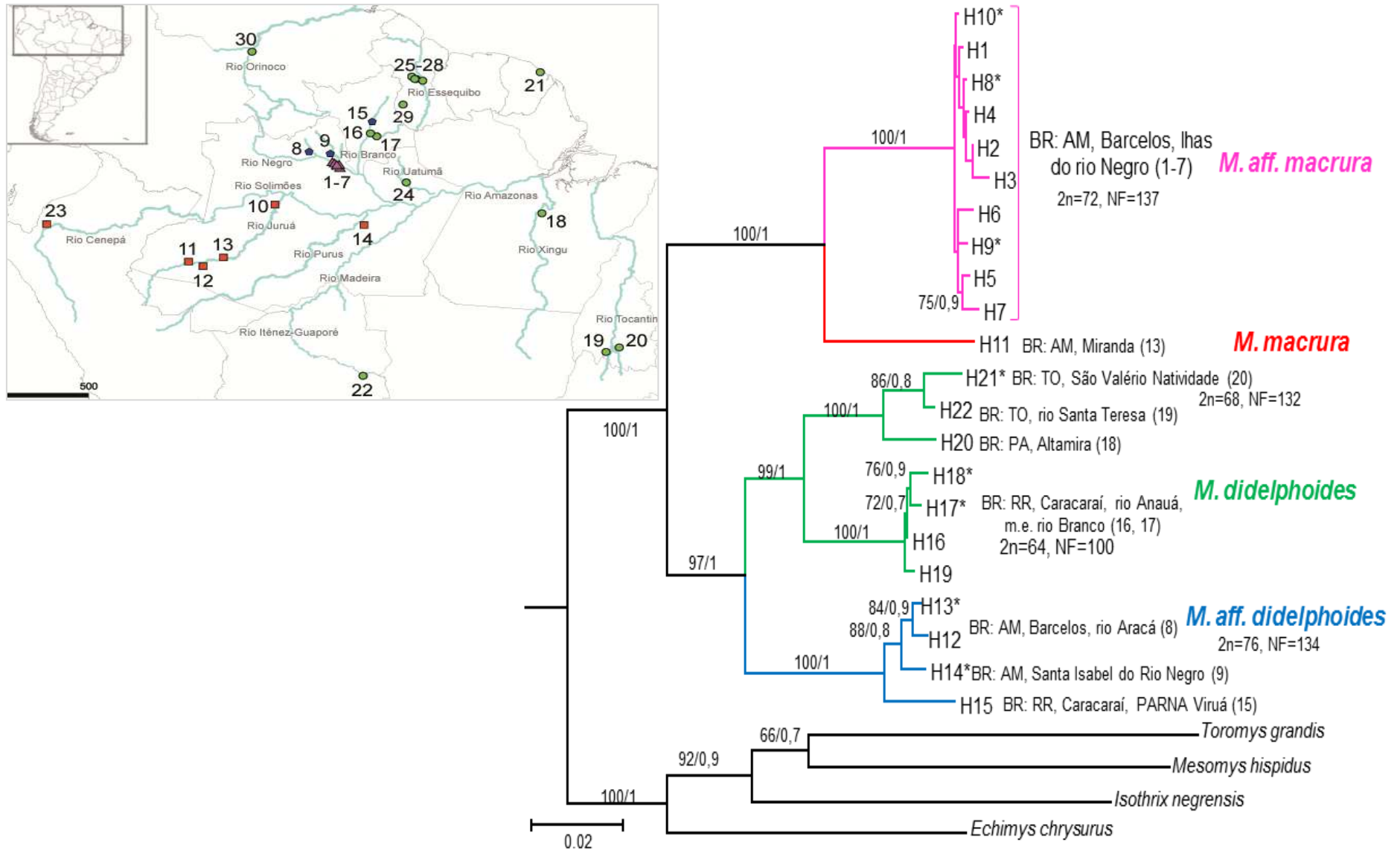


Figura 13. Topologia para *Makalata* com dados concatenado de *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf*. Os números nos ramos são valores de bootstrap ≥ 60 e a direita, probabilidade posterior $\geq 0,6$. Para identificação dos espécimes veja tabela 15. No mapa a cor dos pontos das localidades segue a mesma dos ramos dos haplótipos na topologia. 2n= número diploide e NF = número fundamental. Os valores entre parênteses são referentes às localidades do mapa e os asteriscos são referentes aos haplótipos cariotipados.

4.3. Análises de rede de haplótipos

A análise de Median-Joining com o *mt-Cytb* (Figura 14) foi realizada com 39 sequências de *Makalata*, sendo 15 de *M. didelphoides*, 4 de *M. aff. didelphoides*, 10 de *M. macrura* e 10 de *M. aff. macrura*. Foram feitas três análises, uma com todos os haplótipos do gênero, uma com o complexo de espécie *Didelphoides*, e uma com o complexo de espécies *Macrura*. A análise com todo o gênero mostrou os complexos *Didelphoides* e *Macrura* separados por pelo menos 87 passos mutacionais e quatro vetores médios (Figura 14).

A análise com o complexo de espécie *Didelphoides* (Figura 15) apresentou dois grupos: (A) o primeiro com haplótipos de *M. aff. didelphoides* distantes por pelo menos 66 passos mutacionais do segundo (B) grupo com haplótipos de *M. didelphoides*. O grupo B se divide em cinco subgrupos separados por vários vetores médios e passos mutacionais: (B1) haplótipos da Bolívia separados por pelo menos 74 passos mutacionais dos demais haplótipos do complexo, (B2) com haplótipo do Cerrado e do Pará, (B3) com o haplótipo HAA do Pará separado por pelos menos 55 passos mutacionais dos demais, (B4) com haplótipos da margem esquerda do Rio Branco separados por pelo menos 43 passos mutacionais, e (B5) com haplótipos das Guianas. O centro da rede é composto por diversos vetores médios interligados entre si e entre cada grupo de haplótipos.

A análise com o complexo de espécies *Macrura* (Figura 16) mostrou dois grupos, o primeiro com haplótipos de *M. aff. macrura* separados por 61 passos mutacionais do segundo com haplótipos de *M. macrura*. O grupo de *M. macrura* possui muitos vetores médios no eixo central de onde se ramificam os haplótipos. O haplótipo de Beruri, AM (rio Purus) é o que mais se afasta dos demais haplótipos do grupo, com 39 passos mutacionais.

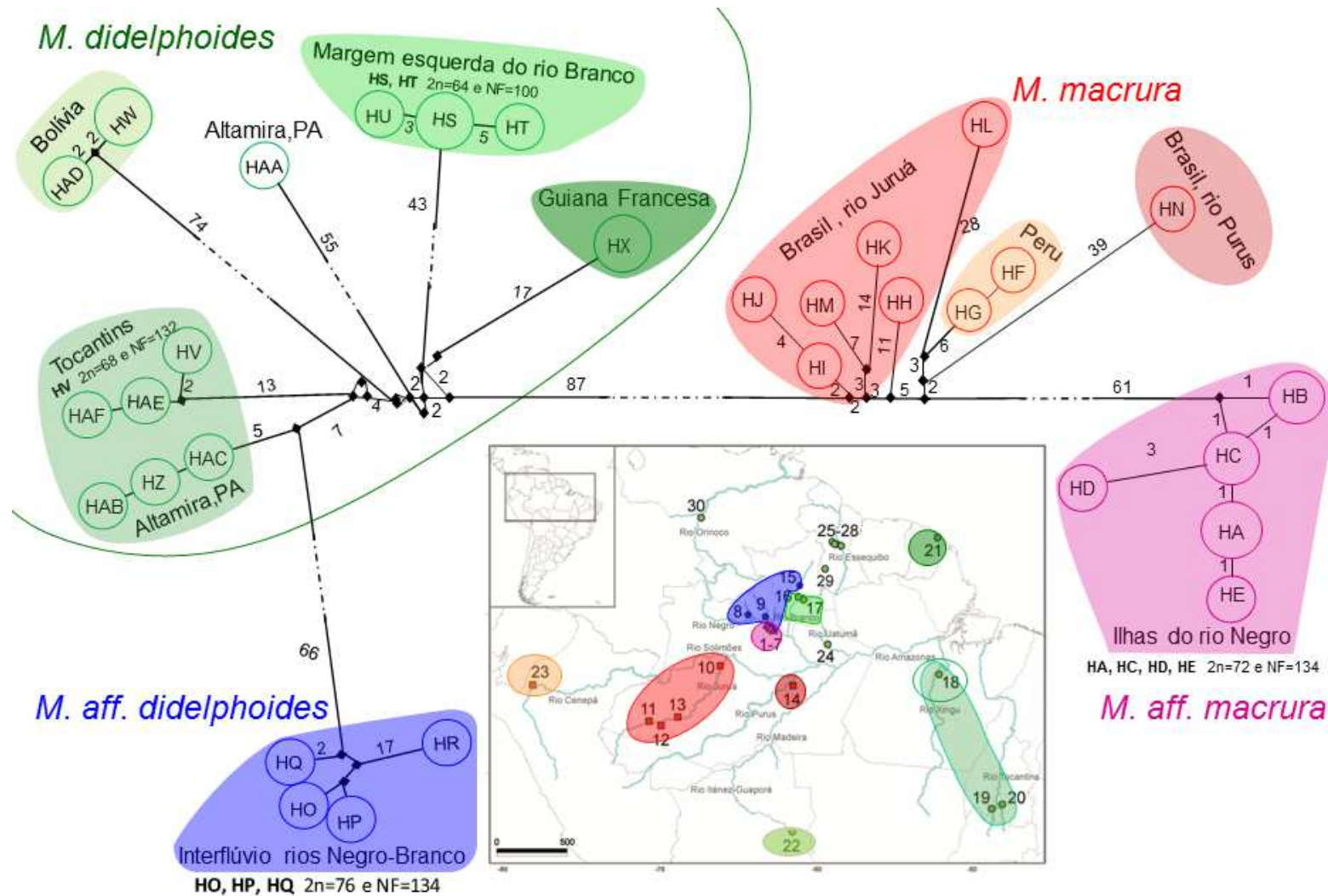


Figura 14. Análise de median-joining para *Makalata* com *mt-Cytb*. Círculos representam haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de seqüências que compartilham. Lozangos representam vetores médios. Números próximos as linhas representam os passos mutacionais. Azul *M. aff. didelphoides*, verde *M. didelphoides*, vermelho *M. macrura*, roxo *M. aff. macrura*. Para identificação dos haplótipos ver tabela 7. 2n= número diplóide e NF = número fundamental. **BRASIL: Amazonas**, Barcelos (1-7) ilhas do rio Negro, (8) rio Aracá; (9) Santa Isabel do Rio Negro; rio Juruá: (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Viravolta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda; rio Purus (14) Beruri. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa; (20) São Valério da Natividade. **GUIANA FRANCESA**: (21) Cayenne. **BOLIVIA**: Santa Cruz (22) Flor de Oro. **PERU**: (23) Huampami.

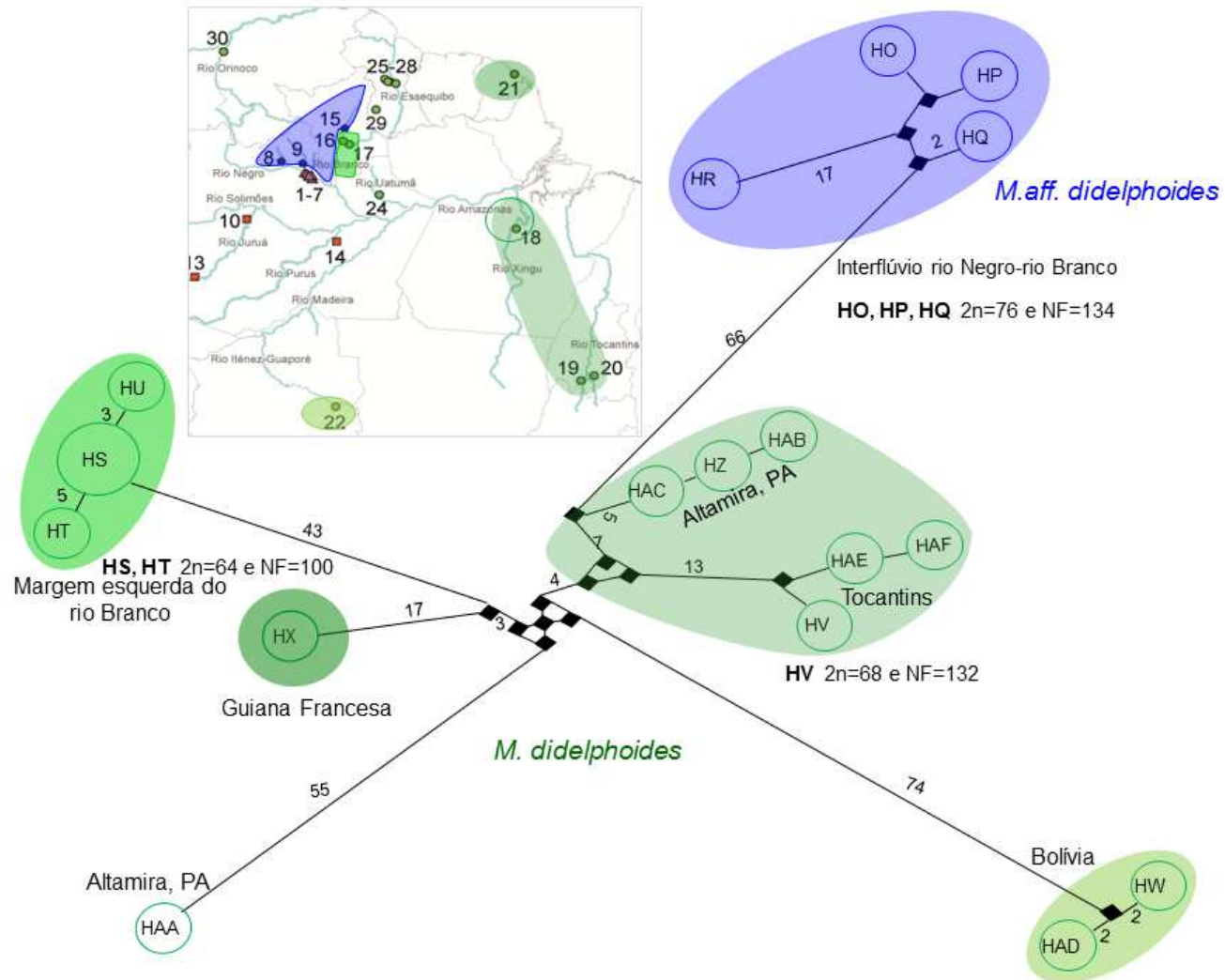


Figura 15. Análise de *Median-Joining* do complexo *Didelphoides* com haplótipos com *mt-Cytb*. Círculos representam os haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de sequências que compartilham cada haplótipo. Lozangos representam vetores médios. Números próximos às linhas representam os passos mutacionais maiores que 1. Em Azul *M. aff. didelphoides*, verde *M. didelphoides*. Para identificação dos haplótipos ver tabela 7. 2n= número diplóide e NF = número fundamental. BRASIL: **Amazonas**, Barcelos (8) rio Aracá; (9) Santa Isabel do Rio Negro. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa; (20) São Valério da Natividade. GUIANA FRANCESA: (21) Cayenne. BOLÍVIA: **Santa Cruz** (22) Flor de Oro.

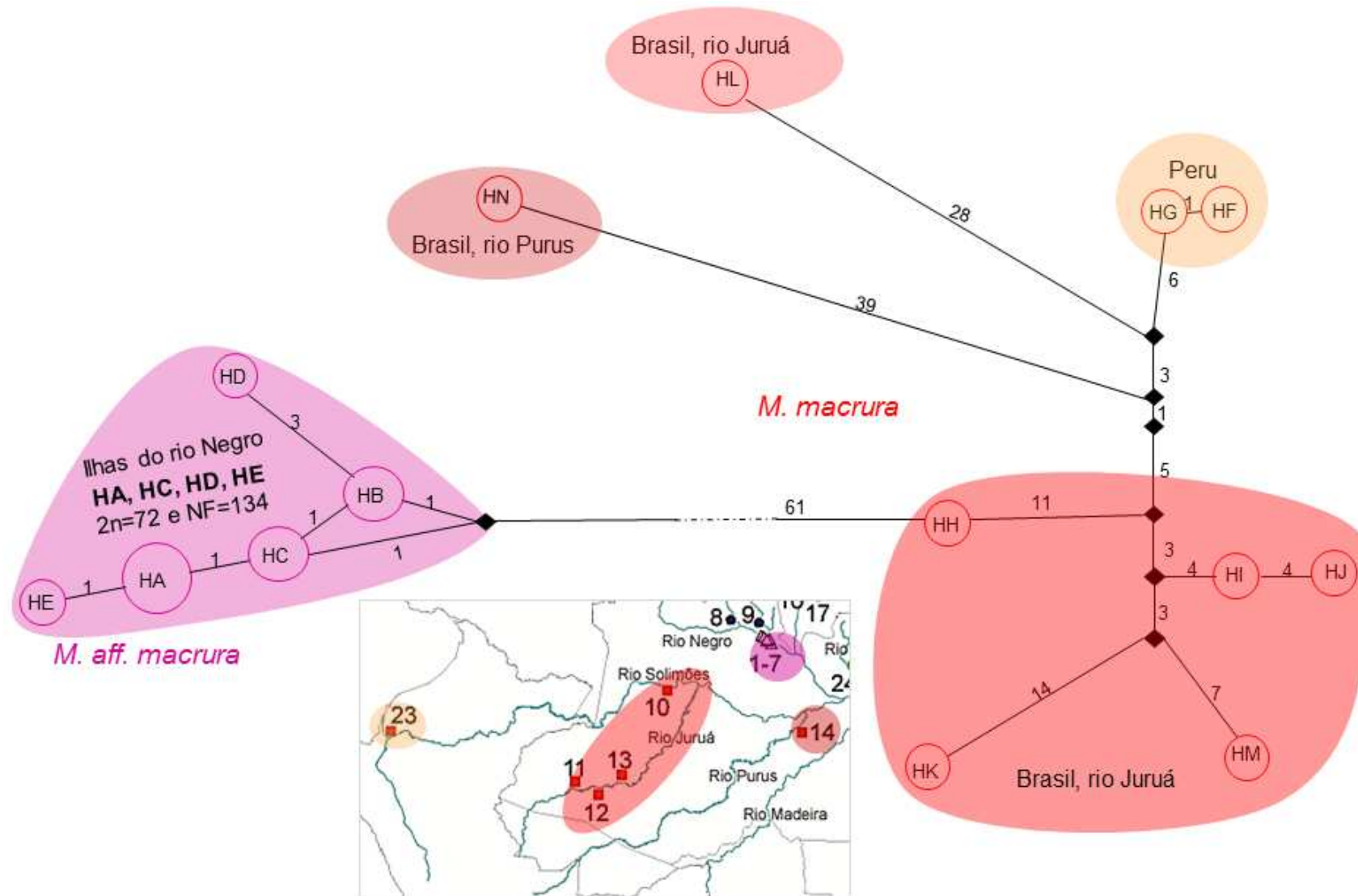


Figura 16. Análise de *Median-Joining* do complexo Macrura com haplótipos de *mt-Cytb*. Círculos representam os haplótipos e seu diâmetro é proporcional ao número de indivíduos que compartilham cada haplótipo. Lozangos representam vetores médios. Números próximo as linhas representam os passos mutacionais. Vermelho *M. macrura*, rosa *M.aff. macrura*. Para identificação dos haplótipos veja tabela 7. $2n$ = número diploide e NF = número fundamental. BRASIL: Amazonas, e Barcelos (1-7) ilhas do rio Negro; rio Juruá: (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, (14) Beruri, rio Purus. PERU: (23) Huampami.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variação cariotípica

Existem apenas dois cariótipos descritos para *Makalata*, um com $2n=70$ e $NF=120$ atribuído a *Makalata armata* (Leal-Mesquita, 1991), e outro com $2n=66$ e $NF=106$ atribuído a *M. didelphoides* (Lima *et al.*, 1998). *Makalata armata* é sinônimo júnior de *M. didelphoides* (Emmons 1993). Aqui descrevemos quatro outros cariótipos, diferentes dos já descritos para o gênero (Figuras 11, 12, 13, 16). Espécimes identificados como *M. aff. didelphoides* do interflúvio dos rios Negro-Branco, mostraram $2n=76$ e $NF=134$, sendo este o maior número diplóide para o gênero, mas compartilhando o mesmo número fundamental com o cariótipo com $2n=72$ e $NF=134$ aqui descrito para *M. aff. macrura*, apesar de diferirem na morfologia dos cromossomos como mostram as figuras 12 e 13. Vale salientar que estes dois táxons tem distribuição parapátrica.

Neste trabalho foram encontrados dois cariótipos para espécimes indetificados como *M. didelphoides*. O espécime de *M. didelphoides* do Cerrado de Tocantins possui $2n=68$ e $NF=132$, e os espécimes de Caracaraí da margem esquerdo do rio Branco possuem $2n=64$ e $NF=100$, ambos com os cromossomos apresentando morfologia distinta do cariótipo ($2n=66$ e $NF=106$, Lima *et al.*, 1998) associado a esta espécie. O cariótipo de *M. didelphoides* do Tocantins não apresenta cromossomos acrocêntricos, enquanto o de Balbina (Lima *et al.*, 1998) e o aqui descrito para Caracaraí apresentam de 22 a 24 cromossomos acrocêntricos, respectivamente. Os espécimes de Balbina apresentaram $2n=66$ e $NF=106$, e os espécimes de Caracaraí apresentaram $2n=64$ e $NF=100$, sendo que os espécimes de Caracaraí apresentam maior número de cromossomos acrocêntricos e o primeiro par destes é muito maior que os demais acrocêntricos e não possui homólogos na composição de Balbina.

O cariótipo apresentado por Leal-Mesquita (1991), atribuído a *Makalata armata* da UHE Samuel estado de Rondônia, apresenta $2n=70$ e $NF=120$, embora não possua a morfologia publicada para comparação, podemos supor, pelos números diplóide e fundamental apresentados pela autora, que se trata de um quinto arranjo cariotípico para o gênero. A comparação dos dados citogenéticos mostra a existência de seis cariótipos distintos. Quatro destes cariótipos tiveram representantes sequenciados e utilizados nas análises filogenéticas que mostraram quatro linhagens correspondendo aos quatro cariótipos: um de *M. aff. didelphoides*,

um de *M. aff. macrura* e dois de *M. didelphoides*, que analisando juntamente com os dados moleculares, sugere que *M. didelphoides* pode ser um complexo de espécies.

A figura 19 mostra o mapa das localidades de coleta dos espécimes de *Makalata* e os arranjos cariotípicos disponíveis até o momento. À linhagem de *M. aff. macrura* (triângulos de 1-7) das ilhas do rio Negro foi atribuído o cariótipo A (em rosa) embora geograficamente próxima da linhagem de *M. aff. didelphoides* (pentágonos 8, 9 e 15) com o cariótipo B (em azul), essas linhagens estão separadas pelo rio Negro, e os cariótipos são distintos no $2n$ e NF e na morfologia dos cromossomos (Tabela 14). O cariótipo C (em verde claro) atribuído à linhagem de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco das localidades 16 e 17, possui arranjo distinto do cariótipo E (em verde) encontrado por Lima *et al.* (1998) atribuído a um espécime de *M. didelphoides* coletado em Balbina, AM (localidade 24). A figura permite melhor comparação das proporções de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (maior quantidade em E do que em C) e acrocêntricos (maior quantidade em C do que em E). Alguns pares de cromossomos de C não possuem homólogos em E, deixando claro que são arranjos distintos (valores de $2n$ e NF na tabela 14).

O cariótipo D (em verde mais escuro) atribuído à linhagem de *M. didelphoides* do Cerrado de TO (localidade 20, Figura19), mostra apenas cromossomos metacêntricos/submetacêntricos ($2n$ e NF na tabela 14), e a morfologia deste cariótipo é diferente da morfologia dos cariótipos C e E atribuídos à *M. didelphoides* que possui cromossomos acrocêntricos.

As análises cariotípicas e filogenéticas são concordantes em mostrar *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* como linhagens distintas das demais, e apontam mais uma espécie dentro do que foi identificado como *M. didelphoides*. Apesar de apresentarem o mesmo número fundamental, os cariótipos de *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* apresentam número diplóide e a morfologia dos cariótipos distintos, permitindo sua separação em linhagens distintas. Aliado a isso, *M. aff. didelphoides* apresentou maior relação filogenética com *M. didelphoides*, reforçando a separação de *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Os dois cariótipos aqui atribuídos a espécimes identificados como *M. didelphoides* diferem nos números diplóide e fundamental, sendo impossível derivar um cariótipo do outro sem rearranjos citogenéticos complexos. Aliado a isso, as análises com marcadores mitocondriais e nucleares colocam estes dois cariomorfotipos em grupos distintos, mostrando que pertencem a linhagens distintas.

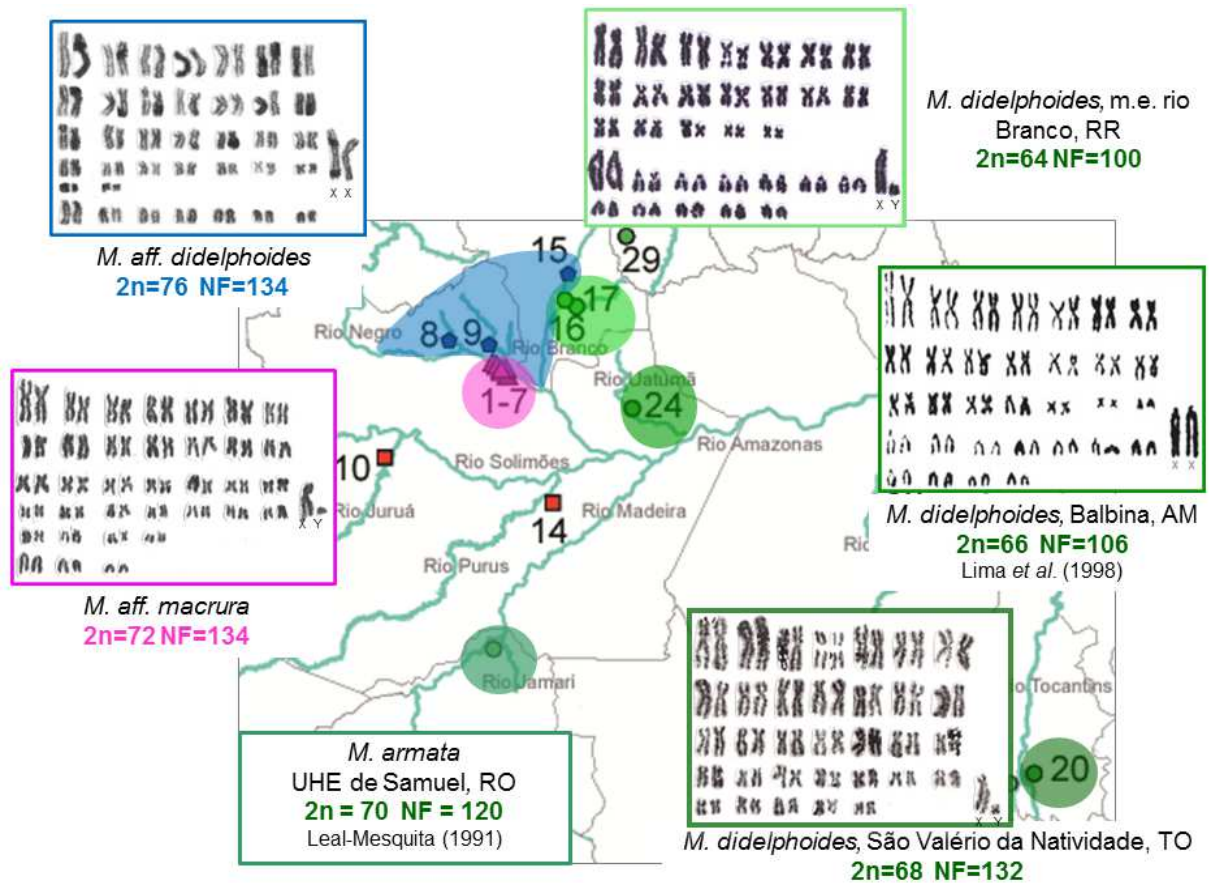


Figura 17. Mapa com os pontos de coleta de *Makalata* e os cariótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, AM das localidades 1-7, de *M. aff. didelphoides* do interflúvio entre os rios Negro e Branco das localidades 8 e 9, de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco, RR das localidades 16 e 17, *M. didelphoides* de São Valério da Natividade, TO da localidade 20, *M. didelphoides* da UHE de Balbina, AM, retirado de Lima *et al.* (1998), localidade 24 e *M. armata* = *M. didelphoides* da UHE de Samuel, RO, de Leal-Mesquita (1991).

Tabela 15. Dados citogenéticos disponíveis para *Makalata*, discriminando o táxon, localidade, números diploide (2n) e fundamental (NF), e referência: 1 = este estudo, 2 = Lima *et al.* (1998), 3 = Leal Mesquita (1991). Os estados brasileiro são: AM = Amazonas, RR = Rorâima, RO = Rondônia.

Taxon	Localidade	2n	Nf	Ref.
<i>M. aff. macrura</i>	AM, Barcelos, Ilhas do Rio Negro	72	134	1
<i>M. aff. didelphoides</i>	AM, Sta Isabel do Rio Negro, interflúvio dos Rios Negro e Branco	76	134	1
<i>M. didelphoides</i>	RR, Caracaraí, m. E. Rio Branco	64	100	1
<i>M. didelphoides</i>	TO, São Valério da Natividade	68	132	1
<i>M. didelphoides</i>	AM, Balbina	66	106	2
<i>M. armata</i>	RO, Rio Jamari	70	120	3

5.2. Relações filogenéticas

O monofiletismo encontrado nas análises filogenéticas para o gênero *Makalata*, corrobora estudos anteriores com os marcadores *mt-Cytb* (Patton *et al.*, 2000; Galewski *et al.*, 2005), *exon 28-Vwf* (Galewski *et al.*, 2005), e com os marcadores *mt-Cytb* e *RAG1* (Patterson & Velazco, 2008). Entretanto, neste último trabalho a análise com o marcador mitocondrial *D-loop* mostrou o gênero *Makalata* sendo parafilético com *Isothrix*; os autores discutem que esta dissonância no *D-loop* seja devido às homoplasias existentes nesta sequência não codificante.

As estimativas de distância genética intraespecífica encontradas no presente estudo foram bem amplas para *M. didelphoides* (0,1 a 12,2%), concordando com o trabalho anterior em que os autores sugeriram a espécie como complexa e variável (Emmons, 2005). Apesar do maior número de haplótipos utilizados, a topologia aqui apresentada para *mt-Cytb* foi semelhante às geradas em outros trabalhos com o mesmo gene (Patton *et al.*, 2000; Patterson & Velazco, 2008). As topologias mostram *Makalata* como monofilético, *M. didelphoides* e *M. macrura* formando clados separados e com alto suporte nos três trabalhos (Figuras 9 e 18).

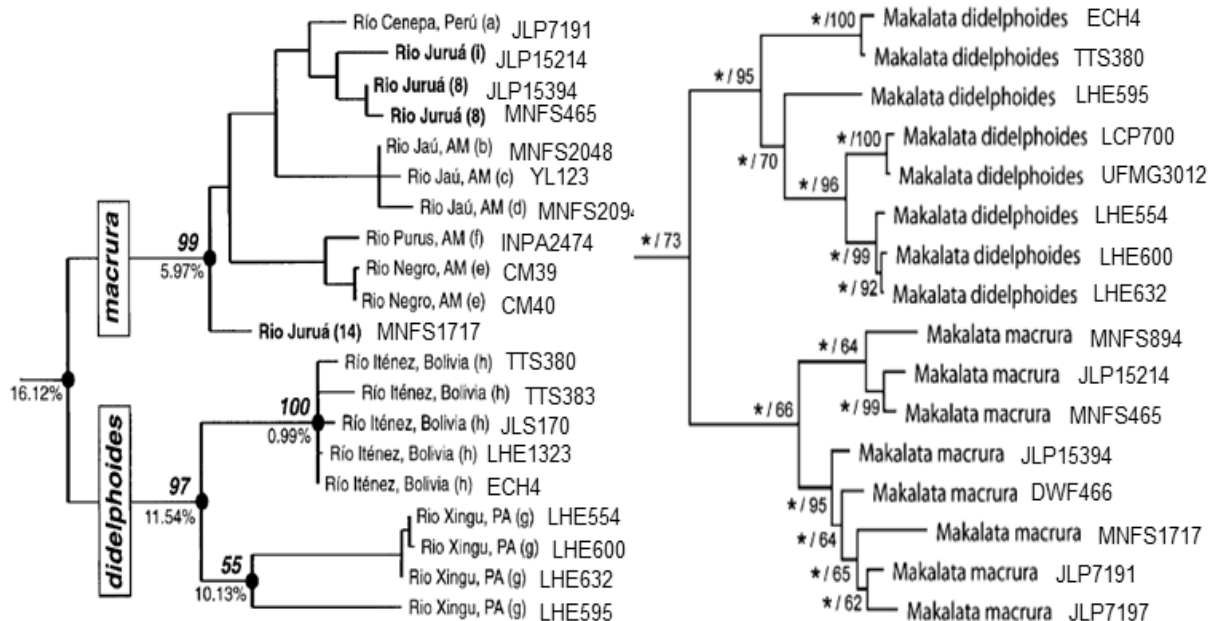


Figura 18. Topologias com *mt-Cytb* publicadas por Patton *et al.* (2000) e Patterson & Velazco (2008), com modificações

Tanto trabalhos anteriores (Patton *et al.*, 2000; Patterson & Velazco, 2008) como o presente estudo, mostram a monofilia de *M. didelphoides* com alto suporte (97% e 95% BS, respectivamente) e divididos em dois clados, um com haplótipos da Bolívia (ambos com bootstrap 100%), e o outro com o restante dos haplótipos. Neste segundo clado, o espécime LHE595 de Altamira, PA, ficou separado dos demais,

não se agrupando com os haplótipos da mesma localidade. Na análise de rede esta amostra (LHE595) também aparece separado dos demais, sugerindo que seja uma linhagem distinta.

Para a espécie *M. macrura* o trabalho de Patton *et al.* (2000) apresenta dois clados. O primeiro, apresenta apenas uma sequência (MNFS1717), do rio Juruá (localidade 10, Figura 2) e o segundo está dividido em dois subgrupos, um com os haplótipos do Arquipélado de Anavilhas, no rio Negro e do rio Purus (INPA 2474, localidade 14, Figura 2), como grupo irmão dos clados com os haplótipos do rio Jaú, AM, e segundo com amostras do Peru (JLP7191, localidade 23, Figura 2) e do rio Juruá, AM (localidades de 12 e 13, Figura 2). No trabalho de Patterson e Velazco (2008), o clado *Macrura* é composto apenas por haplótipos do rio Juruá, AM e do Peru, não recuperando, portanto, a estruturação apresentada por Patton *et al.* (2000). As sequências de Anavilhas, rio Negro e do rio Jaú, não estão disponíveis no GenBank ou em outro banco de dados, sendo apresentadas apenas no trabalho de Patton *et al.* (2000). No presente estudo incluímos todas as sequências utilizadas por Patterson & Velazco (2008), a sequência INPA2474 do trabalho de Patton *et al.* (2000), além das sequências geradas neste trabalho. Neste estudo, o haplótipo de Beruri, AM, rio Purus (INPA2474, localidade 14, Figura 2), aparece separado dos demais, que formam um clado dividido em outros dois clados, um com os haplótipos de Altamira, Miranda e Nova Empresa, todas localidades próximas ao rio Juruá no estado do Amazonas (localidades 11,12 e 13, Figura 2), como grupo irmão do clado com o haplótipo de Colocação do Vira – Volta, AM (localidade 10, Figura 2) e os haplótipos do Peru (JLP 7191 e JLP7197, localidade 23, Figura 2).

As análises filogenéticas com *mt-Cytb* e *éxon 28-Vwf* e com estes genes concatenados, apontam pelo menos quatro linhagens evolutivas distintas: (1) *M. macrura*, (2) *M. aff. macrura*, (3) *M. didelphoides*, e (4) *M. aff. didelphoides*. Na análise com *mt-Cytb* a linhagem *M. didelphoides* apresentou maior distância genética em relação as outras linhagens, e para o *éxon 28-Vwf* as maiores distâncias estão entre *M. didelphoides* e *M. aff. macrura*. Apesar da proximidade geográfica das linhagens *M. aff. macrura* (das ilhas do rio Negro) e *M. aff. didelphoides* (de Santa Isabel do Rio Negro, parte de Barcelos e parte de Caracarái), elas não são linhagens irmãs e possuem estimativas de distância genética variando entre 17,1 a 18,2% para *mt-Cytb* e 1,3 a 2,4% para *éxon 28-Vwf*. Os espécimes das ilhas do rio Negro (*M. aff. macrura*) agrupam em um clado tendo como grupo irmão os espécimes de *M. macrura*, formando o grupo “*Macrura*”. Os

espécimes de *M.aff. didelphoides* da margem esquerda do rio Negro e margem direita do rio Branco se agruparam com espécimes de *M. didelphoides*, formando o grupo “Didelphoides”. Em estudos anteriores *M. macrura* foi o nome utilizado para designar as *Makalatas* da porção oeste da floresta amazônica e *M. didelphoides* os espécimes a leste (Lara *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 2000; Emmons, 2005; Emmons & Patton, 2015). Nosso estudo mostra que a diversidade de *Makalata* é maior do que esse arranjo, quando consideramos as linhagens *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura*.

A análise de rede mostra a linhagem de *M. aff. macrura* quase tão distante de *M. macrura* quanto a linhagem *M. didelphoides*. A linhagem *M. aff. didelphoides* também apresenta uma distancia significativa da linhagem *M. didelphoides*. É importante ressaltar a existência de grupos bem distintos entre o que chamamos de *M. didelphoides* corroborando a hipótese de Emmons (2005) de que se trata de um complexo de espécies.

Na topologia do marcador nuclear *éxon 28-Vwf* o haplótipo *M. aff. didelphoides* (Hv15 que corresponde ao JAO2273) do PARNA Viruá, margem direita do rio Branco (localidade 15, Figura 2 ou 12), aparece agrupado com os haplótipos de *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro, AM. Levantamos algumas hipóteses para esta situação: (1) contaminação com material de *M. aff. macrura*, descartada após feito, apenas para esta amostra em separado, todos os passos desde o isolamento do DNA até o sequenciamento. (2) presença de pseudogene (cópia de um gene que perdeu sua função - Bensasson *et al.*, 2001), embora o cromatograma não apresente picos duplos e a sequência não tenha *stop codon*, que são os passos para checar a possibilidade de pseudogene (Leite, 2012), esta hipótese não pode ser de toda descartada. (3) presença de polimorfismo ancestral - embora não sejam simpátricas, as espécies *M. aff. didelphoides* e *M. aff. macrura* estão geograficamente próximas e é possível que em um passado não muito distante, estas espécies tivessem fluxo gênico ou que tenham derivado de uma mesma população (cladogênese), mantendo informações genéticas ancestrais recuperadas no *exon 28-Vwf*. Os genes mitocondriais por terem uma taxa de substituição de bases maior que os gene nucleares, já diferenciaram a ponto de não mais mostrarem conexões entre estas linhagens (Loss, 2014).

A topologia do marcador *mt-Co1* (Figura10) mostrou uma linhagem da reserva de Iwokrama, ao norte do escudo das Guianas (localidades 25 a 28) em um clado bem separado das demais amostras de *Makalata*, embora com baixo valor de

suporte. Estas sequências foram retiradas do GenBank, não foram publicadas e as amostras não foram sequenciadas para outros marcadores, para comparação. Cogitando a possibilidade de pseudogene chegamos a presença de *stop codons* e possíveis mudanças no *frame* de leitura, não sendo encontrada nenhuma alteração. Sugerimos então uma hipótese biogeográfica para a topologia encontrada, os haplótipos da Guiana que ficaram agrupados em um clado separado dos demais haplótipos de Makalata são da reserva de Iwokrama (localidade 25 a 28, Figura 19 e 20) que está ao norte das terras altas do escudo das Guianas, ficando isolada das demais localidades. Este isolamento geográfico pode ter impedido o fluxo gênico com os demais espécimes das localidades da planície ao sul da elevação. O outro haplótipo da Guiana (Haplótipo Hc18 da localidade 29, Figura 19 e 20), não agrupou ao clado com os demais haplótipos da Guiana, agrupando com outros haplótipos identificados como *M. didelphoides*. O haplótipo Hc18 é da localidade de Alto Takutu-Alto Essequibo, que está ao sul das terras altas do escudo das Guianas, isolada dos demais haplótipos deste país pelas terras mais altas, este haplótipo está em terras baixas da formação do Graben de Takutu, o que possibilita o deslocamento de indivíduos dessa localidade para as outras localidades nas terras baixas do Brasil e Venezuela. A possibilidade de conexão entre as terras baixas da Guiana e da bacia amazônica, ajuda a compreender a proximidade das haplótipos destas regiões (Haplótipos Hc10, Hc18, Hc20 e Hc21, localidades 16 e 17, 29, 30 e 19 respectivamente, Figura 19). Apesar das distâncias geográficas, os haplótipos da Venezuela, sul da Guiana, Norte de Roraima e do sul do Tocantins estão todos na planície da bacia amazônica.

O outro clado da topologia do *mt-Co1* mostrou uma politomia na base, mas as linhagens estão agrupadas de forma parecida com a encontrada com o *mt-Cytb*: um clado com a linhagem de *M. aff. macrura*, outro com a linhagem de *M. didelphoides*, e um terceiro com a linhagem de *M. aff. didelphoides*.

Um resultado discordante na topologia do *mt-Co1* em relação aos outros marcadores, foi a sequência de São Valério da Natividade, TO (da linhagem *M. didelphoides*). Este haplótipo aparece agrupado com os haplótipos de *M. aff. macrura*, na topologia do *mt-Co1* e nas análises dos outros marcadores, aparece agrupado com *M. didelphoides*. As análises da amostra de São Valério da Natividade foram refeitas desde o isolamento do DNA até o sequenciamento, isoladamente, para descartar a hipótese de contaminação. Também foi descartada a hipótese de pseudogene, uma vez que o *frame* de leitura foi conferido, os *stop*

codons não foram encontrados, o cromatograma não apresenta picos duplos, e o gel da PCR apresentou apenas uma banda (Anexo 2). No entanto, a possibilidade de pseudogene não pode ser totalmente descartada sem a realização da clonagem desse produto.

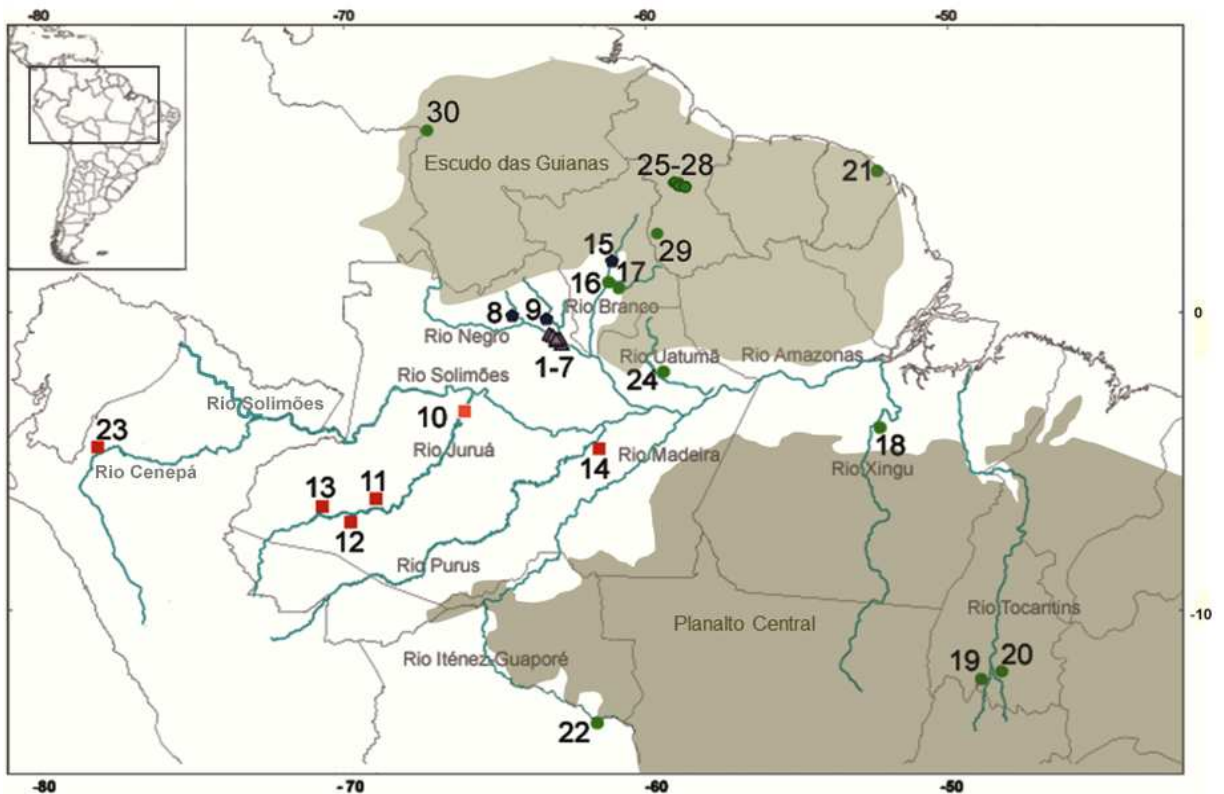


Figura 19. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados nas análises moleculares, destacando os rios e relevo próximos. **Brasil:** Amazonas, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima,** Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará,** (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins,** (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa:** (21) Cayenne. **Bolívia:** Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru:** (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana:** Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela:** Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado = *M. macrura*, triângulos = *M. aff. macrura*, círculos= *M. didelphoides*, pentágono= *M. aff. didelphoides*. Relevo do escudo das Guianas baseado no mapa de Tom Hollowell, NMNH e do Planalto central foi gerado através do programa ArcView.



Figura 20. Mapa mostrando o relevo da Guiana evidenciando os pontos amostrados. Retirado do Google com relevo. **Guiana**: Potaro-Siparuni, **reserva Iwokrama** (25) Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) **Alto Takutu-Alto Essequibo**, sítio Dadanawa.

A topologia gerada pelo marcador *íntron 7-Fgb* mostrou uma politomia, não separando as espécies como os outros três marcadores utilizados, e os suportes para as análises apresentaram valores baixos ($\leq 60\%$). Novamente temos duas hipóteses: (1) pseudogene, mas no cromatograma não aparece picos duplos para as sequências obtidas (Figura 1 do Anexo 3), e como íntron não codifica, não existe stop códons. No entanto, a falha no sequenciamento de um dos iniciadores pode indicar que o amplicon seja um pseudogene e não o gene alvo, dificultando ou impossibilitando a obtenção da sequência (Leite, 2003). Tivemos dificuldades para sequenciar a fita reversa de muitas amostras (não sequencia nada, ou somente poucos pares de base) motivo pelo qual a árvore do *íntron 7-Fgb* possui menor número de sequências para análise, apesar da amplificação ter ocorrido com sucesso. No entanto, isso pode apenas indicar que os iniciadores utilizados não eram adequados para todos os espécimes; (2) irradiação adaptativa - o íntron 7 do *Fgb* é conservado entre vertebrados, mas de evolução rápida e alta variabilidade,

sendo muito usado para análises de grupos recentes (Prychitko & Moore,1997). Prychitko & Moore (2000) propõe que o íntron 7- Fgb tem melhor sinal filogenético para estudos com grupos que divergiram entre 4 e 7 milhões de anos. Segundo Galewski et al.,(2005), a divergência entre as espécies conhecidas de *Makalata* (*M. macrura* e *M. didelphoides*), para o marcador nuclear éxon 28-Vwf, é de 2,3 milhões de anos com variação de (0,2 a 6,6). Portanto, é possível que o gênero possua taxa de substituição nucleotídica maior que a taxa de substituição deste íntron, por isso a topologia para o marcador íntron 7 –Fgb mostra uma politomia.

As análises de rede utilizando o *mt-Cytb*, assim como as árvores filogenéticas apresentaram quatro, ou mais, linhagens evolutivas distintas, cada qual separada por pelo menos 60 passos mutacionais. A maior distância é a que separa as linhagens de *M. macrura* e *M. didelphoides* (87 passos). Assim como estudos anteriores (Patton *et al.*, 2000; Emmons, 2005; Patterson & Velazco, 2008;), os dados da análise de rede sugerem fortemente que *M. didelphoides* é um complexo com linhagens distintas: (1) grupo *M. aff. didelphoides* com $2n=76$ e $NF=134$ e 66 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (2) grupo Bolívia com cariótipo desconhecido e 71 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (3) haplótipo Altamira, PA com cariótipo desconhecido e 55 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (4) Caracaraí na margem esquerda do rio Branco com $2n=74$ e $NF=100$ e 43 passos mutacionais separando-o do restante da rede, (5) grupo Tocantins com $2n=68$ e $NF=132$, e o restante das amostras (Guiana Francesa, PA). Em toda a rede há diversos vetores médios que sugerem a presença de haplótipos ainda não amostrados ou extintos, mostrando que esse complexo de espécies tem uma alta diversidade haplotípica.

As linhagens de *M. macrura* também apresentam uma alta diversidade e altas estimativas de distância genética, ficando clara a separação de *M. aff. macrura* com $2n=72$ e $NF=134$ por 61 passos mutacionais de *M. macrura* (Figura 12), mas não temos dados de cariótipo e acesso aos crânios desse último táxon.

5.3. Variação geográfica

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permite uma correlação com a hipótese de barreira ribeirinha inferida por Wallace (1854) para o gênero de roedor arborícola *Makalata*, já que alguns rios da bacia Amazônica parecem funcionar como barreira para o fluxo gênico entre algumas linhagens deste gênero. A linhagem de

M. aff. macrura (localidade destacada em rosa na figura 21) é restrita às ilhas do rio Negro, próximas a Barcelos, AM e de acordo com os resultados obtidos mostrou-se distinta das demais linhagens analisadas nos marcadores moleculares e citogenéticos. Para a linhagem de *M. aff. didelphoides* (das localidades destacadas em azul na figura 21) os rios Negro e Branco e o escudo das Guianas parecem funcionar como barreiras geográficas, visto que indivíduos desta linhagem foram encontrados apenas na área do interflúvio destes rios, e essa linhagem divergiu das demais linhagens nos marcadores citogenéticos e moleculares aqui utilizados.

A linhagem de *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco (localidades 16, 17) aparece isolada das demais por este rio e pelas terras altas do escudo da Guiana (Figura 21). Esta linhagem diverge nas análises cariotípicas e moleculares. A linhagem de *M. didelphoides* de Balbina está na planície amazônica mas é separada das demais linhagens pelo Escudo das Guianas e pelos rios Amazonas e Negro e também mostrou cariótipo distinto. A linhagem de *M. didelphoides* da Guiana Francesa está isolada das demais linhagens pelo Escudo das Guianas. A linhagem de *M. didelphoides* do planalto central, próximo ao rio Tocantins na região de Cerrado também é geneticamente distinta das demais linhagens, e inserida em um bioma totalmente distinto. A linhagem de *M. didelphoides* da Bolívia localizada ao sul do planalto central, na margem esquerda do rio Iténez-Guaporé, também aparece separada das demais linhagens nas análises filogenéticas.

Resumindo (Figura 21), dentro de *M. didelphoides* (localidades destacadas em tons de verde), algumas possíveis barreiras atuais para as linhagens são os rios Branco, Negro e Itinerez-Guaporé e o escudo das Guianas: (A) espécimes da margem esquerda do rio Branco estão separados dos demais pelo rio Branco e pelas terras altas do escudo das Guianas, (B) espécimes da Guiana Francesa estão separados dos demais pelas terras altas formadas por várias serras, (C) a linhagem do Tocantins é a única a ocupar terras do Cerrado, no alto rio Tocantins, (D) a linhagem da Bolívia está separada das demais pelo rio Itinerez (Guaporé no território brasileiro). Estes dados se somam aos dados citogenéticos e moleculares em mostrando a diversidade subestimada de *Makalata*.

A oeste do rio Madeira e sul do rio Solimões estão distribuídos os espécimes da linhagem de *M. macrura* (Figura 21, localidades destacadas em vermelho). Até o presente momento nenhum cariótipo foi publicado sendo atribuído a esta linhagem, impossibilitando inferências citogenéticas. Patton *et al.* (2000) inferiu que o rio Juruá

não é barreira efetiva para os espécimes de *Makalata* encontrados nas margens deste rio, possivelmente porque o rio Juruá é um rio de meandros, e já os rios Negro e Branco são rios de águas escuras ou barrentas e não são rios de meandro, apresentando maior eficiência como barreira geográfica.

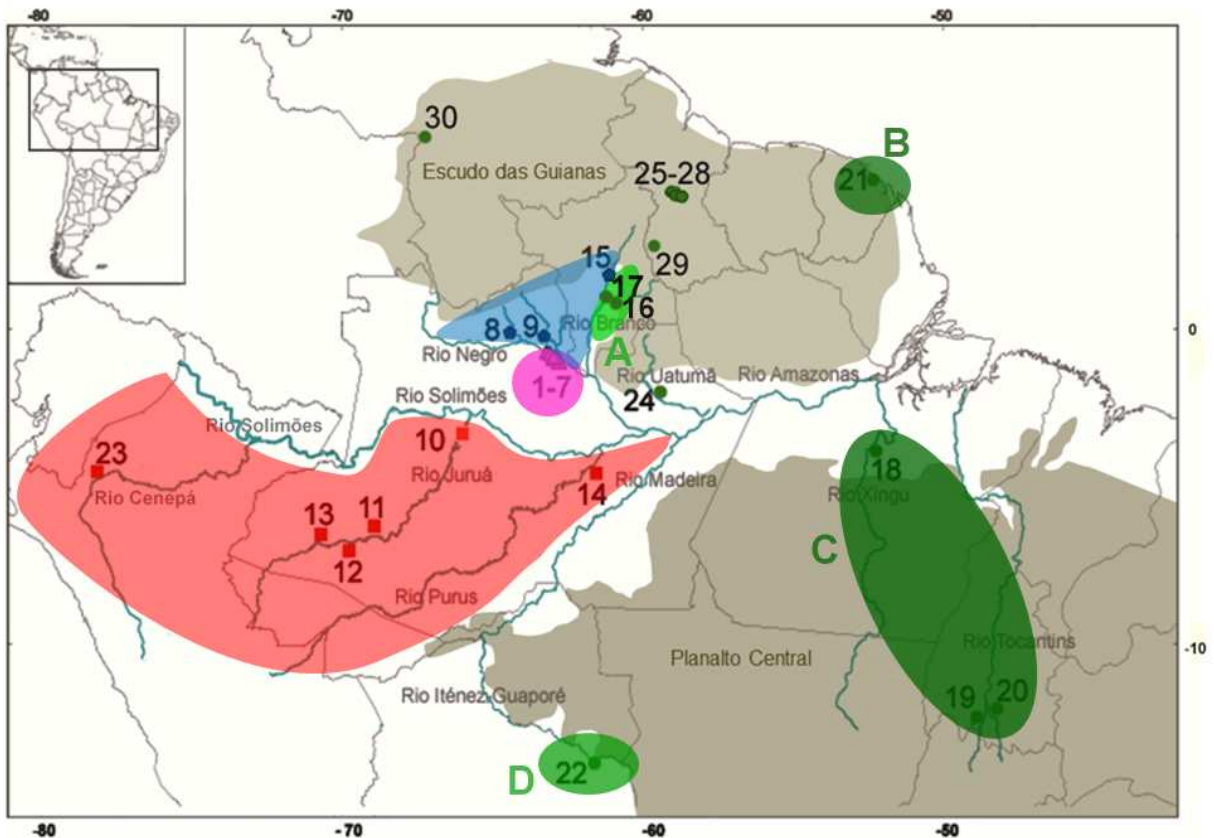


Figura 21. Mapa com as localidades dos espécimes utilizados, destacando os rios e relevo próximos e as linhagens de *Makalata*. **Brasil: Amazonas**, e Barcelos (1-7) ilhas próximas a margem direita (m.d.) do rio Negro, (8) rio Aracá, igarapé do Bigorna; (9) Santa Isabel do Rio Negro, rio Preto; margem esquerda (m.e.) do rio Juruá (10) Distrito de Fonte Boa, Colocação Vira-Volta, (11) Altamira, (12) Nova Empresa, (13) Miranda, m.d do Juruá, (14) Beruri, m.d. Rio Purus. **Roraima**, Caracarái (15) PARNA Viruá, m.d.rio Branco, (16) m.e. Rio Branco, foz do rio Anauá, (17) m.e. rio Branco, rio Anauá. **Pará**, (18) Altamira, m.d. rio Xingu. **Tocantins**, (19) rio Santa Teresa, m.e. rio Tocantins; (20) São Valério da Natividade, m.d. rio Tocantins. **Guiana Francesa**: (21) Cayenne. **Bolívia**: Santa Cruz (22) Flor de Oro, m.e. rio Iténez-Guaporé. **Peru**: (23) Huampani, m.e. rio Cenepá. **Guiana**: Potaro-Siparuni, reserva Iwokrama (25)Kabukalli Landing, (26) rio Burro Burro, (27) rio Siparuni, (28) proximidades do Essequibo, (29) Alto Takutu-Alto Essequibo, sítio Dadanawa. (30) **Venezuela**: Pozon, 50Km NE de Puerto Ayacucho. Quadrado/vermelho = *M. macrura*, triângulos/rosa = *M. aff. macrura*, círculos/verde= *M. didelphoides*, pentágono/azul= *M. aff. didelphoides*. Relevo do escudo das Guianas baseado no mapa de Tom Hollowell, NMNH e do Planalto central foi gerado através do programa ArcView.

6. CONCLUSÃO

O íntron 7 do Beta-fibrinogênio foi testado mas não apresentou sinal filogenético.

Os dados filogenéticos obtidos no presente estudo utilizando sequências de DNA do citocromo *b*, citocromo oxidase subunidade I, e éxon 28 do Fator de Von Willebrand mostram diferentes linhagens evolutivas dentro do gênero *Makalata*, sendo elas *M. macrura*, *M. aff. macrura*, *M. aff. didelphoides* das ilhas do rio Negro, e *M. didelphoides* dividida em: linhagem de Roraima à esquerda do rio Branco, linhagem do escudo das Guianas, linhagem do Cerrado de Tocantins e da Amazônia Paraense, linhagem da Bolívia, além de outros haplótipos disjuntos.

Foram descritos quatro novos cariótipos para espécimes identificados como *M. aff. macrura* das ilhas do rio Negro com $2n=72$ e $FN=134$, *M. aff. didelphoides* do interflúvio rios Negro-Branco com $2n=76$ e $NF=134$, linhagem *M. didelphoides* do Cerrado do Tocantins com $2n=68$ e $FN=132$, linhagem *M. didelphoides* da margem esquerda do rio Branco com $2n=64$ e $NF=100$.

A partir dos padrões filogeográficos dos espécimes estudados, podemos inferir que os rios da bacia Amazônica possuem grande importância na distribuição das linhagens de *Makalata*: (1) os rios Negro e Branco parecem funcionar como barreira ao fluxo gênico entre a linhagem de *M. aff. didelphoides* e as demais linhagens, (2) o rio Negro interfere também no fluxo de genes entre a linhagem de *M. aff. macrura* que é restrita às suas ilhas, (3) o rio Branco separa a linhagem de *M. didelphoides* com $2n=64$ e $NF=100$, das demais, (4) o rio Iténez-Guaporé separa a linhagem da Bolívia das demais, (5) e o escudo da Guiana contém a linhagem da Guiana Francesa.

Os dados filogenéticos e citogenéticos apontam para a presença de pelo menos 5 linhagens evolutivas distintas, que necessitam ser descritas.

7. REFERÊNCIAS

- Aleixo A. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: A case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2006;89(2):383–95.
- Andrade AFB, Bonvicino CR, Briani D, Kasahara S. Karyologic diversification and phylogenetic relationships of the genus *Thalpomys* (Rodentia, Sigmodontinae). *Acta Theriologica*. 2004;49(2): 181-190.
- Astúa DM. Análise morfométrica do crânio e da mandíbula de marsupiais Didelfídeos: implicações ecológicas e funcionais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais. 1998;154p.
- Astúa D, Bandeira I, Geise L. Cranial morphometric analyses of the cryptic rodent species *Akodon cursor* and *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae). *Oecologia Australis*. 2015;19(1):143–57.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999;16:37-48.
- Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM. Mitochondrial pseudogenes : evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001;16(6):314–21.
- Bonvicino CR, Menezes AREAN, Oliveira JA. Molecular and karyologic variation in the genus *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae). *Hereditas* 2003;139:206-211.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. OPAS, Rio de Janeiro. 2008.
- Bonvicino CR, Weksler M. Speciation in Amazonia: Patterns and predictions of a network of hypotheses. In: Patterson BD, Costa LP (eds). *Bones, clones and Biomes: the history and geography of Recent Neotropical mammals*. University of Chicago Press, Chicago. 2012;259-282.
- Burnham K, Anderson D. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2003. Springer-Verlag, New York, NY
- Carleton MD, Musser GG. Order Rodentia. In: Wilson DE, Reeder DM (eds). *Mammal Species of the World: Third Edition*. The Johns Hopkins University Press. 2005;745-752.
- Casado F, Bonvicino CR, Nagle C, Comas B, Manzur TD, Lahoz MM, Seuánez HN. Mitochondrial divergence between 2 populations of the Hooded Capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). *Journal of Heredity* 2010;101:261–269.

- Cassens I, Vicario S, Waddell VG, Balchowsky H, Belle DV, Ding W, Fan C, Mohan RSL, Simões-Lopes PC, Bastida R, Meyes A, Stanhope MJ, Milinkovitch MC. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(21):11343-11347.
- Chevirona ZA, Hackett SJ, Capparella AP. Complex Evolutionary History of a Neotropical Lowland Forest Bird (*Lepidothrix coronata*) and Its Implications for Historical Hypotheses of the Origin of Neotropical Avian Diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005;36:338-357.
- Da Silva MNF, Patton JL. Amazonian Phylogeography: mtDNA sequence variation in Arboreal Echimyid Rodents (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1993;2(3):243–55.
- Da Silva MNF, Patton JL. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 1998;7:475–86.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012;9(8):772. doi:10.1038/nmeth.2109.
- Dobigny G, Aniskin V, Volobouev V. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two cryptic species. *Cytogenetic and Genome Research*. 2002;96:117-124.
- Eler ES, Da Silva MNF; Silva CEF, Feldberg E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. *Genetics and Molecular Research*. 2012;11(2):830-846.
- Emmons LH. On the identity of *Echimys didelphoides* Desmarest, 1817 (Mammalia: Rodentia: Echimyidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 1993;106:1–4.
- Emmons LH, Leite YLR, Kock D, Costa LP. A review of the named forms of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) with the Description of a new species from coastal Brazil. *American Museum Novitates*. 2002;3380.
- Emmons LH. A Revision of the genera of Arboreal Echimyidae (Rodentia: Echimyidae, Echimyinae), with descriptions of two new genera. *Mammalian diversification: from Chromosomes to Phylogeography (A celebration of the career of James L. Patton)*. University of California Publications in Zoology 2005;133:247-381.

- Emmons LH, Leite Y, Patton JL. Echimyidae In:Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2716-2724.
- Emmons LH, Patton JL. *Makalata* In: Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2803-2817.
- Emmons LH, Leite Y, Patton JL. Echimyinae In:Patton JL, Pardinãs UFJ, D'Elía G. Mammals South America, Volume 2: Rodents. Vol.2. Chicago: University of Chicago Press. 2015;2749-53.
- Endler JA. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press. 1977,10.
- Endler JA. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. American Zoologist. 1982;22(2), 441-452.
- Faria MB, Nascimento FF, Oliveira JA, Bonvicino CR. Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). Journal of Heredity, publish on line doi:10.1093/jhered/est039.
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, Riva I De la, Cannatella DC. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007;44(2):825-837.
- Galewski T, Mauffrey JF, Leite YRL, Patton JL, Douzery EJP. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. Molecular and Phylogenetic Evolution 2005;34:601-615.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, da Silva MN, Bogart JP, Lougheed SC, et al. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(25):13672–7.
- Guindon S., Gascuel O. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 2003;52(5):696-704.
- Hasegawa M. Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal Molecular Evolution. 1985;22(2):160-74
- Hice CL, Velazco PM. The Non-volant Mammals of the Reserva Nacional Allpahuayo-Mishana, Loreto, Peru. Special Publications Museum of Texas Tech University. 2012;(60):142.

- Huchon D, Catzeflis FM, Douzery EJP. Molecular Evolution of the Nuclear von Willebrand Factor Gene in Mammals and the Phylogeny of Rodents. *Molecular Biology and Evolution* 1999;16(5):577–589.
- Huchon D, Douzery EJP. From the Old World to the New World: A Molecular Chronicle of the Phylogeny and Biogeography of Hystricognath Rodents. *Molecular Biology and Evolution*. 2001;20(2):238–51.
- Hurvich, C, Tsai, C. Regression and Time Series Model Selection. In: *Small Samples*. *Biometrika*. 1989;76(2):297–307.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* 1991;32:128–44.
- lack-ximenes GE, Vivo M de, Percequillo AR. A new species of *Echimyus* Cuvier, 1809 (Rodentia, Echimyidae) from Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia Museu de Zoologia da USP*. 2005a;45(5):51–60.
- lack-ximenes GE, Vivo MDE, Percequillo AR. A new genus for *Loncheres grandis* Wagner, 1845, with taxonomic comments on other arboreal echimyids. *Arquivos do Museu Nacional* 2005b;63:89–112.
- Kasahara, S. *Introducao a Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética. 2009,160p.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980;16:111-120.
- Lara MC, Patton JL, da Silva MNF. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution* 1996;5:403–413.
- Leal-Mesquita ERRBP. *Estudos citogenéticos em dez espécies de roedores brasileiros da família Echimyidae*. São Paulo. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 1991.
- Leite YLR, Patton JL. Evolution of South American spiny rats (Rodentia , Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002;25:455–64.
- Leite YLR. *Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats, Genus Phyllomys (Rodentia, Echimyidae), with Description of Two New Species*. Zoology University of California Press 2003;132:1-118.
- Leite RN, Rogers DS. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity and*

- Evolution [Internet]. 2013;13(4):639–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13127-013-0140-8>
- Leite ALR. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue DNA Barcoding in Entomology. *Biota Neotropica* 2012;12(3):301-308.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009;25:1451-1452.
- Lima JF de S, Langguth A, Sousa LC. The Karyotype of *Makalata didelphoides* (Rodentia, Echimyidae). *Journal of Mammalogy* 1998;63:315–318.
- Loss AC. Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, ES. 2014, 139.
- Matocq MD, Shurtliff QR, Feldman CR. Phylogenetics of the woodrat genus *Neotoma* (Rodentia: Muridae): implications for the evolution of phenotypic variation in male external genitalia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007;42(3), 637-652.
- Mccarthy C. Chromas v1.45. School of Health Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia. 1998.
- Nagamachi CY, Feldberg E, Pieczarka JC, Pereira AL, Feresin e Silva CE, Rosa CC, et al. Citogenética de pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira. *Pequenos Mamíferos não-voadores da Amazônia Brasileira*. Capítulo 9. 2015;275-307.
- Nascimento FF, Pereira LG, Geise L, Bezerra AMR, D’Andrea PS, Bonvicino CR. Colonization process of the brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): A biogeographic hypothesis. *Journal of Heredity*. 2011;102(3):260–8. doi:10.1093/jhered/esr012
- Nascimento FF, Lazar A, Menezes AN, Durans M. The Role of Historical Barriers in the Diversification Processes in Open Vegetation Formations during the Miocene / Pliocene Using an Ancient Rodent Lineage as a Model. *PLoS ONE* 2013;8(4) e61924.
- Patton JL, Da Silva MNF, Malcolm JR. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia, Echimyidae) of the amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution (N Y)*. 1994;48(4):1314–23.
- Patton JL, da Silva MNF, Malcolm JR. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2000;244:1-306.

- Patterson BD, Velazco PM. Phylogeny of the Rodent Genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its Diversification in Amazonia and the Eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution* 2008;15:181–201.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 2008;25(7): 1253-1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Prance GT. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1982;594-624.
- Prychitko TM, Moore WS. The utility of DNA sequences of an intron from the β -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1997;8(2): 193-204.
- Prychitko TM, Moore WS. Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear β -fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*. 2000;17(7): 1101-1111.
- Ribeiro NAB. Análises cromossômicas e filogenia de roedores do gênero *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia). Tese de doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. 2006.
- Rodríguez F, Oliver JL, Marín A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. 1990;142(4):485-501.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003;19:1572-1574.
- Sambrook J, Russel D W. *Molecular Cloning*. 3rd edition 3 vol cold spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- Seabright MA. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971;2: 971-972.
- Smith M, Patton JL. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1993;50:149-177.
- Springer MS, Debry RW, Douady C, Amrine HM, Madsen O, Jong WW De, et al. Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Mol Biol Evol*. 2001;18(2):132-43.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 1972;75:304-306.

- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993;10(3):512-26.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2013;28:2731-2739.
- Upham NS, Patterson BD. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 2012;63:417–429.
- Upham NS, Ojala-Barbour R, Brito JM, Velazco PM, Patterson B. Transitions Between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *Evolutionary Biology* 2013;13:191.
- Upham NS, Patterson BD. Evolution of Caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. In: Vassallo AI & Antenucci D (Eds), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. *Mammalogical Research*. 2015;1: 63-120
- Vanzolini PE, Williams EE. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*. 1970;19(1-2), 1-176.
- Vassallo AI, Antenucci D Caviomorph Rodents: An Introduction. In: Vassallo AI & Antenucci D (Eds), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. *Mammalogical Research*. 2015;1: 1-11
- Wallace AR. On the monkeys of the Amazon. *Journal of Natural History*. 1854;14 (84):451-454.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert, PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2005;360(1462), 1847-1857.
- Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. Johns Hopkins University Press. 2005;2142.

8 Anexos

Anexo 1 – Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook & Russel (2001).

Nomear dois tubos de 1,5µl (Tipo Eppendorf) para cada amostra a ser extraída.

1ª Parte

- 1 Cortar o tecido com o bisturi em pedaços bem pequenos e macerar.
- 2 Acrescentar
 - 500µl de tampão de Lise (100mM de NaCl; 10mM de Tris pH7,5; 5mM de EDTA)
 - 50µl de SDS 10%
 - 5µl de Proteinase K
 - 2µl de RNase
- 3 Colocar no agitador e deixar de um dia para o outro.

2ª Parte

- 1 Adicionar 500µl de Fenol,
- 2 Vortexar e centrifugar por 10min a 13000rpm,
- 3 Retirar a fase de baixo, deixando um pellet,
- 4 Adicionar 400µl de Clorofórmio,
- 5 Vortexar e centrifugar por 8min a 13000rpm.
- 6 Retirar a fase de baixo deixando um pellet,
- 7 Adicionar 400µl de Clorofórmio,
- 8 Retirar a fase de baixo deixando um pellet,
- 9 Centrifugar por 8min a 13000rpm
- 10 Retirar o SOBRENADANTE e colocar em outro tubo
 - No novo tubo:
 - 1 Adicionar 800µl de **Etanol Absoluto** GELADO.
 - 2 Centrifugar a 4°C por 30min a 13000rpm.
 - 3 Descartar o Etanol.
 - 4 Adiciona 800µl de **Etanol 70%** GELADO.
 - 5 Centrifugar a 4°C por 30min a 13000rpm.
 - 6 Descartar o Etanol.
 - 7 Deixar o tubo aberto na estufa a 37°C, ou na bancada de um dia para o outro para secar.
 - 8 Adicionar 30 a 50µl de tampão de eluição.

Anexo 2 – Gel de PCR e cromatograma do marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1

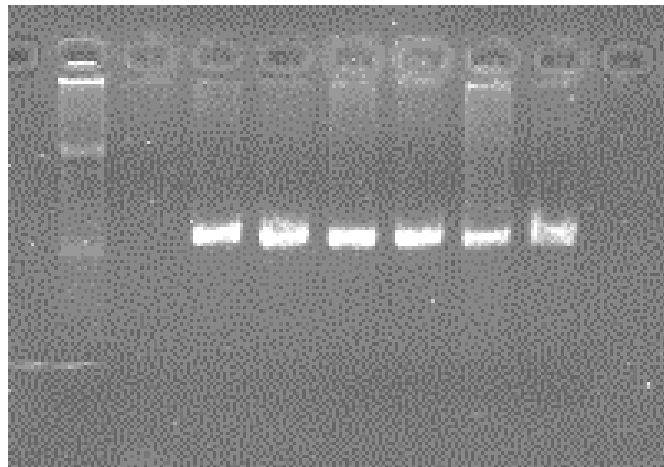


Figura 1. Resultado da PCR com o marcador mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1, evidenciando a presença de uma única banda bem marcada.

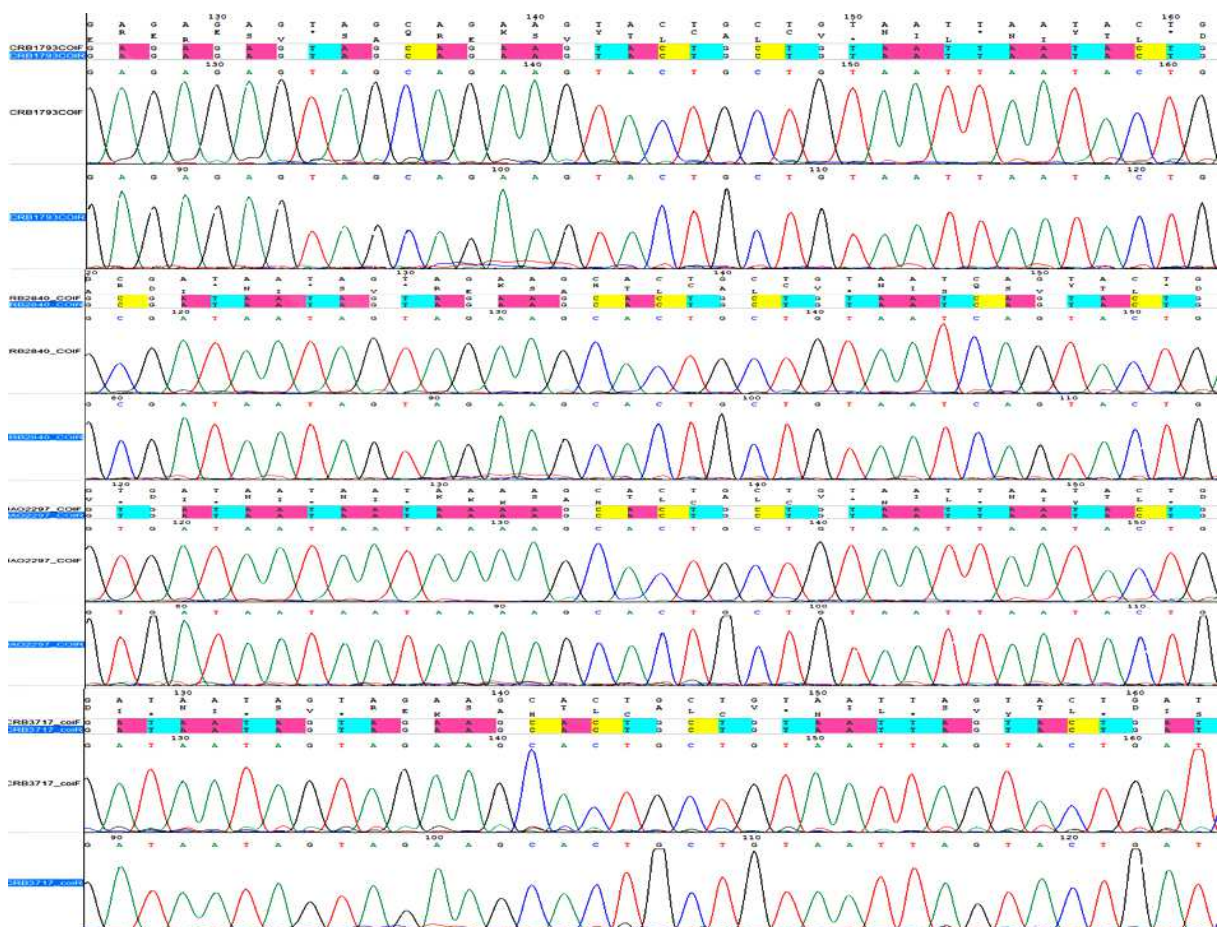


Figura 2. Cromatogramas para o marcador *mt-Co1*, a primeira fita é a senso a segunda é a anti-senso das sequências de CRB1793, CRB 2840, JAO2297 e CRB3717, respectivamente, evidenciando o fragmento 5' AAGCACTGCTGTAATT 3'.

Anexo 3 – Gel de PCR e cromatograma do marcador nuclear *íntron 7- Fgb*

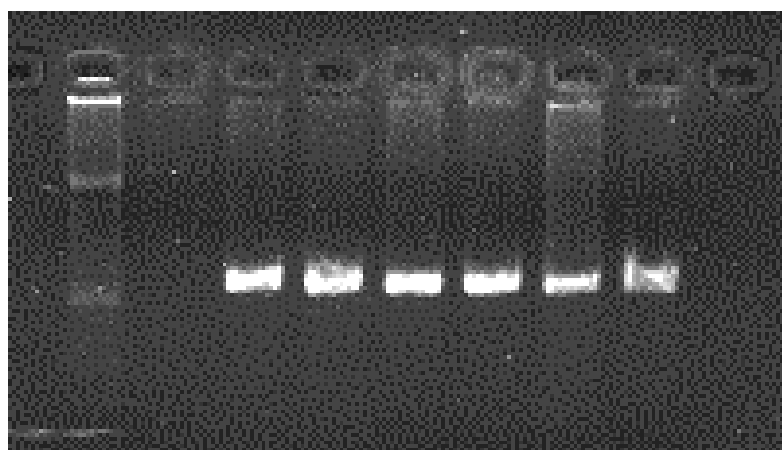


Figura 1. Resultado da PCR com o marcador nuclear *íntron 7- Fgb*, evidenciando a presença de uma única banda bem marcada

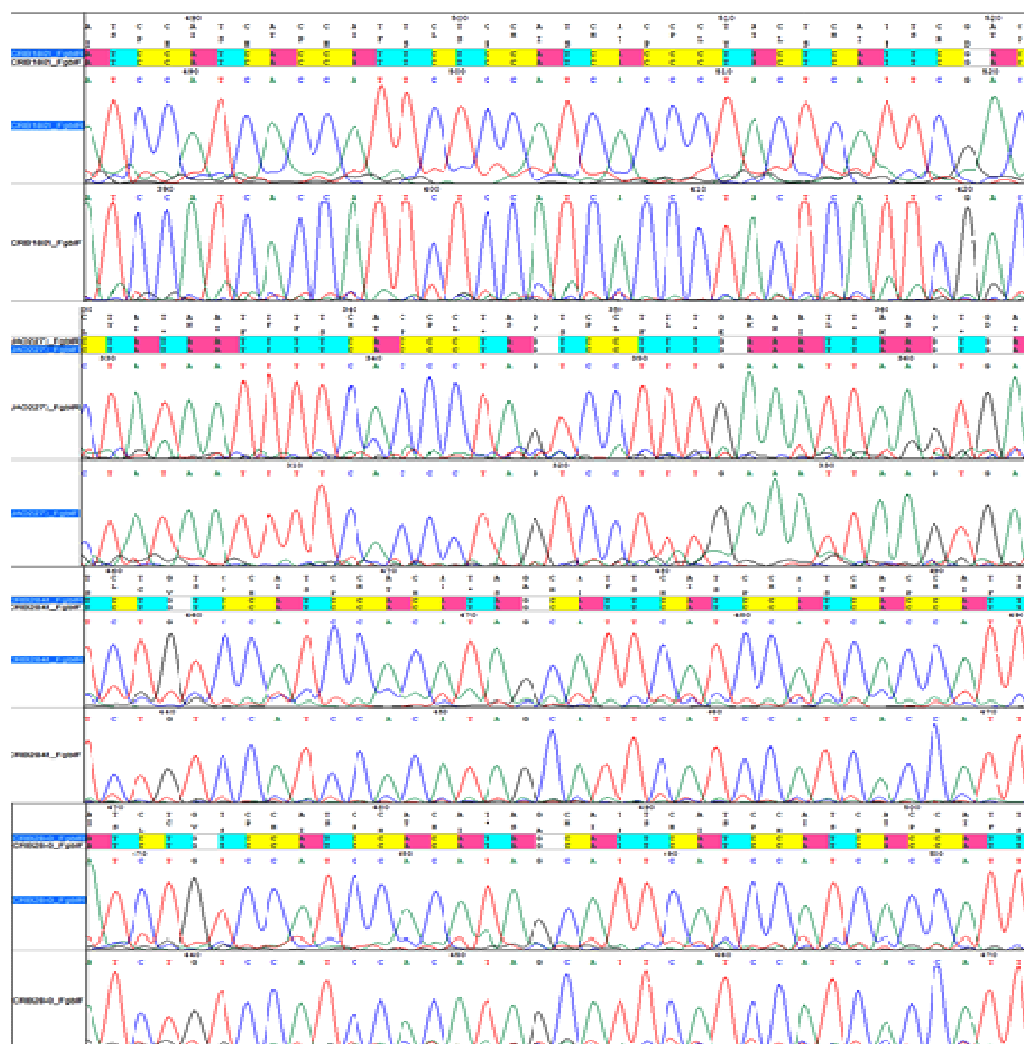


Figura 2. Cromatogramas para o marcador *íntron 7- Fgb*, a primeira fita é a senso a segunda é a anti-senso das sequências de CRB1801, JAO2273, CRB 2466, e CRB2840, respectivamente.