

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

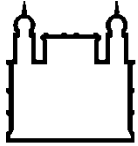
Rodrigo Agrellos Costa

Estudos populacionais e filogenéticos de *Oligoryzomys nigripes* e o status taxonômico de *Oligoryzomys utiaritensis*
(Rodentia, Sigmodontinae)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

RIO DE JANEIRO
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Rodrigo Agrellos Costa

Estudos populacionais e filogenéticos de *Oligoryzomys nigripes* e o status taxonômico de *Oligoryzomys utiaritensis*
(Rodentia, Sigmodontinae)

ORIENTADOR: Profa. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos	- Presidente titular
Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago	- Titular
Prof. Dr. João Alves de Oliveira	- Titular
Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira	- Suplente
Prof. Dra. Lena Geise	- Suplente
Prof. Dr. Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto	- Revisor

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2012

Agradecimentos

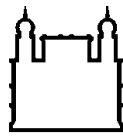
- Aos meus pais Wallace e Tereza, pelo apoio incondicional;
- À Luciana, por ser uma pessoa indispensável na minha vida;
- À Ingrid, por continuar sendo a melhor amiga da faculdade, mesmo sete anos depois de formados;
- Ao Raphael, que teve um papel crucial em momentos muito difíceis durante a realização deste trabalho;
- Ao Artur, pela paciência e companheirismo na reta final deste trabalho;
- À Hanna Soares, por jamais duvidar da minha capacidade e do meu talento;
- À Raquel da Hora, pela incrível capacidade de sempre fazer com que eu veja o lado bom de tudo;
- À Carolina Bagni, por me fazer lembrar em vários momentos que existe vida fora do laboratório, e que é necessário viver um pouco dela também;
- À Lívia Rosa, por ser uma conselheira incrível para qualquer momento, triste ou feliz;
- À Fabiana Knackfuss, por ter sempre um belo sorriso no rosto, me colocando para cima em todas as situações;
- À Marion, por uma meiguice que faz com que a gente sempre tenha esperança nas pessoas, não importa o que esteja acontecendo;
- À Adriana, por ter ouvido em vários momentos minhas reclamações e frustrações e pela ajuda imprescindível com o FISH;
- À Thaís Sholl, por ter me acompanhado desde o início no laboratório, por ter me ajudado nas mais diferentes tarefas, e pela grande ajuda durante algumas etapas desse trabalho;
- À Leila Cardoso, por mostrar sempre uma sensatez e seriedade difíceis de serem vistos, porém essenciais, nesse meio;
- À Tatiana Carvalho, pela capacidade de me deixar sempre bem-humorado, mesmo nas situações mais complicadas;
- À Fabrícia Nascimento, por tantas experiências trocadas e por ser essa pessoa tão inteligente, que faz com que você queira passar horas conversando;
- Ao Bernardo Teixeira, pelas grandes discussões e ajudas sobre esse ratinho complicado que é o objeto de estudo dessa tese;

- Aos meus companheiros mastozoólogos Luciana Guedes, Fabiana Caramaschi, Ana Lasar, Albert Menezes, Michel Barros, Fernanda Pedone e Maria Carolina, por todas as ajudas e trocas de experiências essenciais para uma boa vida acadêmica;
- À todos os membros, passados e atuais, da Divisão de Genética do Inca, por fazer um ambiente de trabalho menos duro e mais solícito, em especial à Priscila Sena, Talitha Cardozo, Raquel Watannabe, Gabrielle Viana, Mirela D'arc, Michelle Oliveira, Íris Pires, Fabiana Germano, Raíssa Andrade, Lilian Carvalho, João Vidal, Camila Xavier, Jânio Moreira, Carolina Furtado, Kelly Rose, Leila Monnerat, Claudio Vieira e Lia Cardoni;
- À minha orientadora Dra. Cibele Bonvicino, pela oportunidade de realizar este trabalho;
- Ao Dr. Paulo D'Andrea, que apesar de não ter sido meu co-orientador oficial, foi de grande importância em diversos momentos, com conselhos indispensáveis;
- Ao Dr. Marcelo Weksler, por ter sido um grande professor para mim, com diversas ajudas e conselhos para a realização desse trabalho;
- Ao Dr. Miguel Moreira, por sempre se mostrar solícito para sanar minhas inúmeras dúvidas;
- Ao Dr. Hector Seuanez, pela oportunidade de utilizar as instalações da Divisão de Genética no INCA;
- A todas as pessoas responsáveis pelas amostras que eu utilizei: as equipes do LBCE, da SVS e do Museu Nacional, a Dra. Lena Geise e a Dra. Liliani Tiepolo;
- Aos membros da banca, por terem aceitado meu convite e pelas discussões que serão levantadas;
- À FIOCRUZ e pela equipe da PGBCM por toda a ajuda e por permitir a minha formação;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

É impossível realizar um trabalho dessa magnitude e não ter a obrigação de agradecer a todos que, direta e indiretamente, me ajudaram e me apoiaram numa das empreitadas mais difíceis da minha vida. **MUITO OBRIGADO!**

"Tentaram me fazer acreditar que o amor não existe e que sonhos estão fora de moda. Cavaram um buraco bem fundo e tentaram enterrar todos os meus desejos, um a um, como fizeram com os deles. Mas como meninamenteimosa que sou, ainda insisto em desentortar os caminhos. Em construir castelos sem pensar nos ventos. Em buscar verdades enquanto elas tentam fugir de mim. A manter meu buquê de sorrisos no rosto, sem perder a vontade de antes. Porque aprendi, que a vida, apesar de bruta, é meio mágica. Dá sempre pra tirar um coelho da cartola. E lá vou eu, nas minhas tentativas, às vezes meio cegas, às vezes meio burras, tentar acertar os passos. Sem me preocupar se a próxima etapa será o tombo ou o voo. Eu sei que vou. Insisto na caminhada. O que não dá é pra ficar parada. Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim."

Caio Fernando Abreu



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudos populacionais e filogenéticos de *Oligoryzomys nigripes* e o status taxonômico de *Oligoryzomys utiaritensis* (Rodentia, Sigmodontinae)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Os roedores neotropicais do gênero *Oligoryzomys* possuem ampla distribuição geográfica, distribuindo-se por toda América Latina. No Brasil, existem pelo menos 12 espécies, com representantes em todos os domínios morfoclimáticos. Entre essas espécies, *Oligoryzomys nigripes* possui a distribuição mais ampla, ocorrendo por toda a Mata Atlântica, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (incluindo regiões adjacentes do Paraguai e Argentina), nos Pampas gaúchos e uruguaios e regiões de Cerrado em São Paulo e Goiás. Membros do gênero *Oligoryzomys* desempenham papel fundamental na dispersão e transmissão de hantavírus, e estudos populacionais e filogenéticos de espécies de mamíferos reservatórios ajudam a entender a distribuição e a dinâmica dos ciclos de transmissão da doença. Com esse trabalho, pretendemos estudar a diversidade genética de *Oligoryzomys*, através de filogenias moleculares com marcadores mitocondriais (genes citocromo *b* e citocromo oxidase subunidade I) e um marcador nuclear (íntron 7 do gene beta-fibrinogênio); analisar a diversidade intraespecífica de *O. nigripes*, através de análises populacionais e filogeográficas de subpopulações de Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraguai, com os dois marcadores mitocondriais citados acima; revisar o status taxonômico de *O. utiaritensis*, considerado atualmente sinônimo júnior de *O. nigripes*, através de análises filogenéticas e morfométricas; e investigar se existem inserções nucleares de genes mitocondriais em espécies de *Oligoryzomys*, um estudo importante levando-se em consideração que a maior parte dos estudos evolutivos desse grupo incluem o sequenciamento de genes mitocondriais. Os resultados mostram que *Oligoryzomys* é um gênero monofilético, contendo pelo menos quatro grupos de espécies. A diversidade de *Oligoryzomys* é subestimada, e existem pelo menos quatro espécies não descritas, além da presença de espécies crípticas. *Oligoryzomys* diferenciou-se dos outros orizomíneos no final do Mioceno e início do Plioceno, há aproximadamente 6,5 milhões de anos, sendo a espécie *O. microtis* a espécie mais antiga (2,5 milhões de anos) e *O. destructor* a espécie mais recente (23 mil anos). As análises populacionais indicam uma estruturação genética incipiente entre subpopulações de *O. nigripes* do Sudeste e Sul do Brasil, mas a diferenciação entre as subpopulações dentro dessas regiões é pequena. A área de diferenciação original de *O. nigripes* é a região do sul do Brasil, e pelo menos duas frentes de colonização ocorreram: uma em direção ao Paraguai e outra em direção ao centro e sudeste do Brasil. *Oligoryzomys utiaritensis* é uma espécie válida, distinta de *O. nigripes* através da morfologia, morfometria, filogenia molecular e citogenética. Existem inserções de sequências mitocondriais no genoma nuclear de pelo menos cinco espécies de *Oligoryzomys*. Estudos evolutivos devem vir acompanhados de outros tipos de marcadores moleculares, além de informações morfológicas, geográficas e citogenéticas, para um melhor entendimento das relações complexas entre as espécies de *Oligoryzomys*.

Population and phylogenetics studies of *Oligoryzomys nigripes* and the taxonomic status of *Oligoryzomys utiaritensis* (Rodentia, Sigmodontinae)

ABSTRACT

PhD Thesis

The neotropical rodents of genera *Oligoryzomys* have a wide distribution, extending throughout Latin America. In Brazil, there are at least 12 species, with representatives in all morphoclimatic domains. Among these species, *Oligoryzomys nigripes* has the widest distribution, occurring throughout Atlantic Forest of Rio Grande do Norte to Rio Grande do Sul (including adjacent areas of Paraguay and Argentina), Pampas from Brazil and Uruguay, and Cerrado regions of São Paulo e Goiás. Some *Oligoryzomys* species play a fundamental role in the dispersion and transmission of hantaviruses, and population and phylogenetics studies of mammal reservoirs help to understand the distribution and dynamics of disease transmission cycles. In this work, we intend to study the genetic diversity of *Oligoryzomys* through molecular phylogeny with mitochondrial markers (cytochrome *b* and cytochrome oxidase subunit I genes) and a nuclear marker (intron 7 of beta-fibrinogen gene); analyze the intraspecific diversity of *O. nigripes* via population and phylogeographic studies of subpopulations of Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Paraguay, with the two mitochondrial markers cited above; review the taxonomic status of *O. utiaritensis*, currently considered a junior synonym of *O. nigripes*, by morphometric analyses and molecular phylogenetics; and investigate whether there are insertions of mitochondrial genes in nuclear genome of *Oligoryzomys* species, a relevant study if we account that the most evolutionary studies of this group relies on sequencing mitochondrial genes. Results showed here indicate that *Oligoryzomys* is a monophyletic genus, containing at least four groups of species. The diversity of *Oligoryzomys* is underestimated, and there are at least four undescribed species, and the presence of cryptic species. *Oligoryzomys* has differentiated from other oryzomyiines in late Miocene and early Pliocene, about 6.5 million years ago, *O. microtis* is the oldest species (2.5 million years) and *O. destructor* the most recent (23.000 years). Population analyzes indicate an incipient genetic structure between subpopulations of *O. nigripes* from southeast and south of Brazil, but differentiation among subpopulations within these regions is small. The original area of original differentiation of *O. nigripes* is the region of southern Brazil, and there were at least two fronts of colonization: one to Paraguay and another toward center and southeast of Brazil. *Oligoryzomys utiaritensis* is a valid species, distinct from *O. nigripes* by morphology, morphometrics, cytogenetics and molecular phylogeny. There are insertions of mitochondrial origin into nuclear genome of at least five species of *Oligoryzomys*. Evolutionary studies should be followed by other types of molecular markers, and morphological, geographical and cytogenetics data, to a better understanding of the complex relationships among *Oligoryzomys* species.

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribossomal
ADO	área de diferenciação original
aLRT	teste de taxa de verossimilhança aproximado
AMOVA	análise molecular de variância
ANOVA	análise de variância
ARNt	ácido ribonucleico transportador
BA	análise bayesiana
BB	largura do crânio
<i>beta-fibint7</i>	íntron 7 do gene β -fibrinogênio
BIF	largura do forâmeme incisivo
BM1	largura do primeiro molar maxilar
BRO	largura do rosto
bs	<i>bootstrap</i>
BZP	largura da placa zigomática
C	citosina
CH	altura do crânio
CIL	comprimento do côndilo-incisivo
<i>citb</i>	gene mitocondrial citocromo <i>b</i>
<i>coi</i>	gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I
CRB	Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> = por exemplo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	Espírito Santo
ESS	tamanho amostral efetivo
EUA	Estados Unidos da América
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
g	taxa de crescimento populacional
G	guanina
gl	graus de liberdade
GO	Goiás
GSL	comprimento máximo do crânio
GTR	general time reversible
HPD	estimativa de maior densidade posterior
IRBP	proteína de ligação de retinóide intersticial
K2P	kimura 2-parâmetros
km	quilômetro
LBCE	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
LD	comprimento do diástema
LG	Dra. Lena Geise
LIB	menor largura interorbital
LIF	comprimento do forâmeme incisivo
LM	comprimento da série molar maxilar
LMT	Dra. Liliane Tiepole
LSD	<i>Least significant difference</i> = diferença mínima significativa
m	metros
M1M	largura palatal tomada na parte externa dos alvéolos dos molares

MCMC	cadeia Monte Carlo de Markov
MG	Minas Gerais
mg	miligrama
min	minuto
MJ	<i>median-joining</i>
mL	mililitro
ML	máxima verossimilhança
MLE	estimativa de máxima verossimilhança
mM	milimolar
MT	Mato Grosso
n	número
n/a	não aplicável
n/d	não disponível
Numt	sequencia nuclear de ADN mitocondrial
ORL	comprimento orbital
PA	Pará
PAR	Paraguai
pb	pares de base
PB	comprimento da ponte palatal
PC	componente principal
PCA	análise de componentes principais
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = reação em cadeia da polimerase
pp	probabilidade posterior
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
RL	comprimento do rosto
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
s	segundos
s	transição
SC	Santa Catarina
SPH	Síndrome Pulmonar por Hantavírus
SDS	dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
SSC	citrato de sódio salino
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
T	timina
tMRCA	tempo até o último ancestral comum mais recente
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
v	transversão
ZB	largura do zigomático

Lista de Figuras

Figura 3-1. Mapa mostrando as localidades das amostras de <i>citb</i> aqui sequenciadas, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão listadas na tabela 3-1. A barra de escala está em quilômetros. * - <i>O. fornesi</i> , • - <i>O. microtis</i> , ⊗ - <i>O. moojeni</i> , + - <i>O. nigripes</i> , ♠ - <i>O. rupestris</i> , □ - <i>O. stramineus</i> , ◆ - <i>O. utiaritensis</i>	31
Figura 3-2. Mapa mostrando as localidades referentes às novas sequências de <i>coi</i> , indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-2. A barra de escala está em quilômetros. Δ - <i>O. flavescens</i> , * - <i>O. fornesi</i> , • - <i>O. microtis</i> , ⊗ - <i>O. moojeni</i> , + - <i>O. nigripes</i> , ♠ - <i>O. rupestris</i> , □ - <i>O. stramineus</i> , ◆ - <i>O. utiaritensis</i>	36
Figura 3-3. Mapa mostrando as localidades referentes às novas sequências de <i>beta-fibint7</i> , indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-3. A barra de escala está em quilômetros. Δ - <i>O. flavescens</i> , * - <i>O. fornesi</i> , • - <i>O. microtis</i> , ⊗ - <i>O. moojeni</i> , + - <i>O. nigripes</i> , ♠ - <i>O. rupestris</i> , □ - <i>O. stramineus</i> , ◆ - <i>O. utiaritensis</i>	39
Figura 3-4. Mapa mostrando as localidades referentes aos espécimes utilizados nas análises morfométricas, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-5. A barra de escala está em quilômetros. * - <i>O. fornesi</i> , ⊗ - <i>O. moojeni</i> , + - <i>O. nigripes</i> , □ - <i>O. stramineus</i> , ◆ - <i>O. utiaritensis</i>	42
Figura 3-5. Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo, adaptado de Irwin <i>et al.</i> (1991). Maiores informações sobre a sequência dos iniciadores estão no texto. Retângulos representam o gene <i>citb</i> e a região que o flanqueia: os genes ARNt de Ácido Glutâmico (E), ARNt de Treonina (T) e ARNt de Prolina (P). Números estão de acordo com a mesma região no genoma do ADNmt de <i>Microtus levis</i> no GenBank (número de acesso: NC_008064).....	46
Figura 3-6. Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo. Maiores informações sobre a sequência dos iniciadores estão no texto. Retângulos representam o gene <i>coi</i> e a região que o flanqueia: os genes ARNt de Cisteína (C), ARNt de Tirosina (Y) e ARNt de Serina (S). Números estão de acordo com a mesma região no genoma do ADNmt de <i>Microtus levis</i> no GenBank (número de acesso: NC_008064).....	47
Figura 3-7. Visões (a) superior, (b) inferior e (c) lateral de um crânio de <i>Oligoryzomys</i> , indicando as 17 medidas cranianas utilizadas para as análises morfométricas.....	60
Figura 4-1. Gráficos das taxas de transição e transversão (<i>s</i> e <i>v</i>) versus distância genética K2P de <i>citb</i>	69
Figura 4-2. Árvore de ML de <i>citb</i> com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores. Acima dos nós são os valores de aLRT, e abaixo os valores de <i>bootstrap</i> . Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de <i>bootstrap</i> acima de 50 foram considerados.....	71
Figura 4-3. Árvore de BA de <i>citb</i> com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores. Os valores próximos aos nós são valores acima de 0,5 de probabilidade posterior.....	72
Figura 4-4. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de <i>O. microtis</i> e <i>O. fornesi</i> a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.....	74
Figura 4-5. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo vermelho, <i>Oligoryzomys</i> sp. 2 e sp. 3, a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.....	75
Figura 4-6. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo amarelo, representado por <i>O. costaricensis</i> , <i>O. vegetus</i> e <i>O. fulvescens</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Os valores intraespecíficos de <i>O. vegetus</i> e <i>O. fulvescens</i> não foram mostrados....	75
Figura 4-7. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por <i>O. destructor</i> e <i>O. rupestris</i> , além de <i>O. messorius</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.....	76
Figura 4-8. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por <i>Oligoryzomys</i> sp. 1 e <i>O. delicatus</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.....	76
Figura 4-9. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por <i>O. moojeni</i> e <i>O. utiaritensis</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.....	77
Figura 4-10. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo roxo, representado por <i>O. chacoensis</i> e <i>O. longicaudatus</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.....	78
Figura 4-11. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo roxo, representado por <i>O. andinus</i> , <i>Oligoryzomys</i> sp. 4, <i>O. flavescens</i> e suas quatro linhagens diferentes, a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.....	78
Figura 4-12. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo marrom, representado por <i>O. stramineus</i> e <i>O. nigripes</i> , a partir de <i>citb</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.....	79

Figura 4-13. Gráficos das taxas de transição e transversão (s e v) versus distância genética K2P de <i>coi</i>	80
Figura 4-14. Árvore de ML de <i>coi</i> com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores acima dos nós são o suporte por aLRT, e os valores abaixo dos nós são o suporte por <i>bootstrap</i> . Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de <i>bootstrap</i> acima de 50 foram considerados.	81
Figura 4-15. Árvore de BA de <i>coi</i> , com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores próximos aos nós são o suporte pela probabilidade posterior. Apenas valores acima de 0,5 foram considerados.	82
Figura 4-16. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte dos grupos rosa e azul, representados por <i>O. fornesi</i> e <i>O. microtis</i> , a partir de <i>coi</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	83
Figura 4-17. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo roxo, representado por <i>O. flavescens</i> , e do grupo verde, representados por <i>O. moojeni</i> , <i>O. utiaritensis</i> e <i>O. rupestris</i> , a partir de <i>coi</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	84
Figura 4-18. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo marrom, representado por <i>O. stramineus</i> e <i>O. nigripes</i> , a partir de <i>coi</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	85
Figura 4-19. Gráficos das taxas de transição e transversão (s e v) versus distância genética K2P de <i>beta-fibint7</i> considerando todas as posições.	86
Figura 4-20. Árvore de ML de <i>beta-fibint7</i> com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores acima dos nós são o suporte por aLRT, e os valores abaixo dos nós são o suporte por <i>bootstrap</i> . Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de <i>bootstrap</i> acima de 50 foram considerados.	87
Figura 4-21. Árvore de BA de <i>beta-fibint7</i> com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores próximos aos nós são o suporte pela probabilidade posterior. Apenas valores acima de 0,5 foram considerados.	88
Figura 4-22. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo verde, representado por <i>O. rupestris</i> , <i>O. moojeni</i> e <i>O. utiaritensis</i> , além do grupo roxo, representado por <i>O. flavescens</i> , a partir de <i>beta-fibint7</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	89
Figura 4-23. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo rosa, representado por <i>O. fornesi</i> , e do grupo azul, representado por <i>O. microtis</i> , a partir de <i>beta-fibint7</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	90
Figura 4-24. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo marrom, representado por <i>O. stramineus</i> e <i>O. nigripes</i> , a partir de <i>beta-fibint7</i> . Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.	91
Figura 4-25. Gráfico dos <i>traces</i> referente à probabilidade posterior dos parâmetros encontrados pelo programa BEAST para <i>citb</i>	92
Figura 4-26. Gráfico da densidade posterior das taxas de mutação entre as três posições dos códons de <i>citb</i>	94
Figura 4-27. Árvore filogenética gerada pelo programa BEAST contendo as espécies de <i>Oligoryzomys</i> colapsadas. Os números do eixo de escalas estão em milhões de anos. Os números acima dos nós são os valores médios do tempo até o ancestral comum mais recente (em milhão de anos), e os números abaixo dos nós são os valores de probabilidade posterior do clado. As barras azuis representam o intervalo de 95% da maior densidade posterior. Todos os valores de probabilidade posterior dos ramos intraespecíficos são iguais a 1, e por isso não são mostrados.	95
Figura 4-28. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de <i>citb</i> (linha azul) e a simulação de uma expansão demográfica (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de <i>O. nigripes</i> como uma única população.	97
Figura 4-29. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de <i>citb</i> (linha azul) e a simulação de uma expansão espacial (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de <i>O. nigripes</i> como uma única população.	98
Figura 4-30. Gráfico dos <i>traces</i> mostrando o valor da verossimilhança da probabilidade posterior por geração da cadeia de Markov encontrados pelo programa BEAST para <i>citb</i>	99
Figura 4-31. Gráfico da densidade posterior mostrando a variação do tempo até o ancestral comum mais recente (tmrca) em milhões de anos, das subpopulações de <i>O. nigripes</i> e de <i>O. stramineus</i> , a partir de <i>citb</i> . Tempo mais recente=0.	100
Figura 4-32. Mapa mostrando as subpopulações de <i>O. nigripes</i> analisadas com <i>citb</i> : PAR (Paraguai), SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), RJ (Rio de Janeiro) e ES (Espírito Santo). A cor das setas indicam valores de F_{ST} , entre 0 e 0,05 (branca), entre 0,05 e 0,15 (amarelas), entre 0,15 e 0,25 (vermelhas) e acima de 0,25 (pretas). O tamanho da ponta da seta indica os valores de M : setas menores indicam valores menores de M	102
Figura 4-33. Rede de haplótipos <i>median-joining</i> de <i>O. nigripes</i> a partir de <i>citb</i> . Os números indicam as posições das mutações entre cada haplótipos. Os círculos brancos representam os vetores médios. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos compartilhando o haplótipo, verde representa haplótipos do ES, azul do RJ, amarelo do RS, preto de SC, roxo de SP, rosa de GO, vermelho de MG, laranja da Argentina, marrom do Paraguai e cinza do Uruguai.	103

Figura 4-34. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de <i>coi</i> (linha azul) e a simulação de uma expansão demográfica (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de <i>O. nigripes</i> como uma única população.....	105
Figura 4-35. Gráfico mostrando distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de <i>coi</i> (linha azul) e a simulação de uma expansão espacial (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de <i>O. nigripes</i> como uma única população.	106
Figura 4-36. Gráfico dos <i>traces</i> referente à probabilidade posterior dos parâmetros encontrados pelo programa BEAST para <i>coi</i>	107
Figura 4-37. Gráfico da densidade posterior do tempo até o ancestral comum mais recente (tmrca), em milhões de anos, de <i>O. stramineus</i> , <i>O. nigripes</i> e suas subpopulações, a partir de <i>coi</i>	108
Figura 4-38. Mapa mostrando as subpopulações de <i>O. nigripes</i> analisadas com <i>coi</i> : SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro), ES (Espírito Santo) e GO (Goiás). A cor das setas indicam valores de F_{ST} , entre 0 e 0,05 (branca), entre 0,05 e 0,15 (amarelas), entre 0,15 e 0,25 (vermelhas) e acima de 0,25 (pretas). O tamanho das pontas das setas referem-se aos valores de <i>M</i> : setas menores indicam valores menores de <i>M</i>	110
Figura 4-39. Rede de haplótipos <i>median-joining</i> de <i>O. nigripes</i> com <i>coi</i> . Os números indicam as posições das mutações entre cada haplótipos. Os círculos brancos representam os vetores médios. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos, verde representa haplótipos do ES, azul do RJ, amarelo do RS, preto de SC, roxo de PR, vermelho de GO, cinza de MG e laranja de SP.	111
Figura 4-40. Gráfico de dispersão dos escores das componentes principais 1 e 2, considerando espécimes de <i>O. fornesi</i> , <i>O. moojeni</i> , <i>O. nigripes</i> , <i>O. stramineus</i> e <i>O. utiaritensis</i> , com a elipse de 95% dos dados.	114
Figura 4-41. Projeções das componentes principais para as 17 variáveis.	114
Figura 4-42. Gráfico de dispersão das raízes canônicas 1 e 2, considerando espécimes de <i>O. fornesi</i> , <i>O. moojeni</i> , <i>O. nigripes</i> , <i>O. stramineus</i> e <i>O. utiaritensis</i> , com a elipse de 95% dos dados.....	115
Figura 4-43. Exemplos de eleroferogamas mostrando diversas anomalias, como ruídos, deleções, picos duplos e divergência de bases.	116
Figura 4-44. Topologia de ML de <i>Oligoryzomys</i> para <i>citb</i> , incluindo os clones. Os valores de suporte são aLRT, <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, nessa ordem. Os nomes em negrito correspondem às sequências dos clones.	119
Figura 4-45. Rede de haplótipos MJ dos clones de <i>citb</i> . Os números representam mutações, números precedidos de * representam inserções/deleções e números precedidos de # representam códons de parada prematuros. Preto representa SVS04 (<i>O. microtis</i>), azul representa CRB733 (<i>O. fornesi</i>), laranja representa MN46410 (<i>O. stramineus</i>), cinza representa MN50322 (<i>O. rupestris</i>), marrom representa MN50326 (<i>O. rupestris</i>), amarelo representa CRB1425 (<i>O. nigripes</i>), verde representa LMT302 (<i>O. nigripes</i>), vermelho representa MN50307 (<i>O. moojeni</i>) e roxo representa MN50309 (<i>O. moojeni</i>).....	120
Figura 4-46. FISH do indivíduo LBCE13642 mostrando marcação em núcleos (b, c, e) e diretamente nos cromossomos (a, b, d). Em verde a marcação por fluoresceína, representando <i>citb</i> . Em vermelho a marcação por rodamina, representando ADNr.....	127
Figura 4-47. FISH da amostra LBCE14231 mostrando marcação em núcleos (c, d, e) e diretamente nos cromossomos (a, b). Em verde a marcação por fluoresceína, representando <i>citb</i> , e em vermelho a marcação por rodamina, representando ADNr.....	127
Figura 5-1. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de <i>Oligoryzomys</i> . A elipse branca ADO1 representa a área de diferenciação original do gênero. A elipse branca ADO2 representa a área de diferenciação original de <i>O. moojeni</i> , <i>O. utiaritensis</i> , <i>O. delicatus</i> , <i>O. destructor</i> , <i>O. rupestris</i> e <i>Oligoryzomys</i> sp.1. A elipse branca ADO3 representa a área de diferenciação original de <i>O. chacoensis</i> , <i>O. andinus</i> , <i>O. longicaudatus</i> , <i>O. flavescens</i> , <i>O. nigripes</i> e <i>O. stramineus</i> . As distribuições aproximadas das espécies são: azul = <i>O. microtis</i> , rosa = <i>O. fornesi</i> , vermelhos = <i>Oligoryzomys</i> sp.2 e sp.3, amarelo = <i>O. costaricensis</i> , <i>O. vegetus</i> e <i>O. fulvescens</i> . As setas representam a diversificação dos ancestrais: azul = <i>O. microtis</i> , preta = entres as áreas de diversificação (ADOs) de <i>Oligoryzomys</i> , rosa = <i>O. fornesi</i> , amarela = <i>O. costaricensis</i> , <i>O. vegetus</i> e <i>O. fulvescens</i> , vermelha = <i>Oligoryzomys</i> sp. 2 e sp. 3.	149
Figura 5-2. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de <i>Oligoryzomys</i> . A elipse branca ADO2 representa a área de diferenciação original de <i>O. moojeni</i> , <i>O. utiaritensis</i> , <i>O. delicatus</i> , <i>O. destructor</i> , <i>O. rupestris</i> e <i>Oligoryzomys</i> sp.1 (grupo verde). Os contornos verdes representam a distribuição geográfica atual aproximada dessas espécies. As setas representam a diversificação dos ancestrais de <i>O. rupestris</i> (vermelha), <i>O. moojeni</i> (azul), <i>O. utiaritensis</i> (amarelo), <i>O. destructor</i> (laranja), <i>O. delicatus</i> e <i>Oligoryzomys</i> sp.1 (roxa) a partir da ADO2.	151
Figura 5-3. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de <i>Oligoryzomys</i> . As elipses ADO1 e ADO2 foram descritas nas figuras 5-1 e 5-2. A elipse ADO3 representa a área de diferenciação original de <i>O. chacoensis</i> , <i>O. andinus</i> , <i>O. longicaudatus</i> , <i>O. flavescens</i> (grupo roxo), <i>O. nigripes</i> e <i>O. stramineus</i> (grupo marrom). Os contornos roxos representam a distribuição geográfica atual aproximada de <i>O. chacoensis</i> , <i>O. andinus</i> , <i>O. longicaudatus</i> e <i>O. flavescens</i> . Os contornos marrons representam a distribuição geográfica atual aproximada <i>O. nigripes</i> e <i>O. stramineus</i> . As setas representam a diversificação dos ancestrais de <i>O. longicaudatus</i> (vermelha), <i>O. andinus</i> (amarela), <i>O. chacoensis</i> (azul), <i>O. flavescens</i> (verde), <i>O. nigripes</i>	

(marrom) e *O. stramineus* (branco) a partir da ADO3. As setas pretas pontilhadas representam as possíveis origem da ADO3. 152

Lista de Tabelas

Tabela 3-1. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais com <i>citb</i> , especificando a espécie*, número de campo ou de museu (Número), número de acesso do GenBank, país, região (Estado para o Brasil, EUA, México e Venezuela; Província para Argentina, Chile, Costa Rica, Equador e Panamá; Departamento para Bolívia, Honduras, Paraguai, Peru e Uruguai; Distrito para Suriname), localidade (municipalidade ou localidade regional de origem), tamanho do fragmento em pares de base (Tam.), referência bibliográfica das sequências utilizadas (Ref.)*. n/d significa informação não disponível. Em cinza estão as sequências utilizadas nas análises de datação por relógio molecular.	31
Tabela 3-2. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais com <i>coi</i> , especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil e todas as sequências são inéditas. n/d significa informação não disponível.	36
Tabela 3-3. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais utilizando <i>beta-fibint7</i> , especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil e todas as sequências são inéditas. n/d significa informação não disponível.	39
Tabela 3-4. Lista das amostras utilizadas para detecção de múltiplas cópias dos genes mitocondriais <i>citb</i> e <i>coi</i> , especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o número de clones analisados de <i>citb</i> (C- <i>citb</i>), o número de clones analisados de <i>coi</i> (C- <i>coi</i>) e a realização do FISH (marcado com X).....	41
Tabela 3-5. Lista das amostras utilizadas para análises morfométricas, especificando a espécie*, o número de campo ou museu, o sexo, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil. n/d significa informação não disponível.....	43
Tabela 3-6. Subpopulações de <i>O. nigripes</i> utilizadas para análises com <i>citb</i> . A localidade indica os municípios nos quais estão localizadas as subpopulações, e N indica o número de indivíduos de cada subpopulação. Os estados brasileiros são: Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).	54
Tabela 3-7. Subpopulações de <i>O. nigripes</i> utilizadas para análises com <i>coi</i> . A localidade indica os municípios nos quais estão localizadas as subpopulações, e N indica o número de indivíduos de cada subpopulação. Os estados brasileiros são: Goiás (GO), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).	55
Tabela 4-1. Distâncias genéticas K2P de <i>citb</i> entre espécies de <i>Oligoryzomys</i> . Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável.	67
Tabela 4-2. Distâncias genéticas K2P de <i>coi</i> entre espécies de <i>Oligoryzomys</i> . Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável.	68
Tabela 4-3. Distâncias genéticas K2P de <i>beta-fibint7</i> entre espécies de <i>Oligoryzomys</i> . Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável.	68
Tabela 4-4. Valores de aLRT, <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de <i>Oligoryzomys</i> para o gene <i>citb</i> . Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-2.	70
Tabela 4-5. Valores de aLRT, <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de <i>Oligoryzomys</i> para o gene <i>coi</i> . Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-14.	81
Tabela 4-6. Valores de aLRT, <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de <i>Oligoryzomys</i> para <i>beta-fibint7</i> . Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-20.	87
Tabela 4-7. Tempos até o ancestral comum mais recentes das espécies de <i>Oligoryzomys</i> , em milhões de anos, calculados a partir de <i>citb</i> por relógio molecular relaxado, contendo a média dos valores e os intervalos de 95% mínimos e máximos de maior densidade posterior.....	93
Tabela 4-8. Principais parâmetros calculados pelo programa BEAST para <i>citb</i> , contendo a média dos valores e os intervalos de 95% mínimos e máximos de maior densidade posterior.	93
Tabela 4-9. Listas das subpopulações analisadas discriminando tamanho amostral (<i>n</i>), número de haplótipos de <i>citb</i> , número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (<i>h</i>), diversidade nucleotídica (π), índice de neutralidade F_S para cada subpopulação e para o total dos indivíduos. <i>p</i> = significância de F_S . Em cinza estão os valores significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-6.	96
Tabela 4-10. Cálculo do índice de fixação F_{ST} , para cada par de subpopulações. Os valores em cinza são considerados significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-6.	97
Tabela 4-11. Resumo da Análise Molecular de Variância (AMOVA) com <i>citb</i> para os grupos (ES+RJ) e (PAR+SC+RS). <i>gl</i> =graus de liberdade; <i>p</i> =significância. Em cinza estão os valores significantes.	98

Tabela 4-12. Parâmetros encontrados pelo programa BEAST para as subpopulações de <i>O. nigripes</i> com <i>citb</i> , indicando a média e a estimativa de 95% de densidade posterior máxima e mínima, utilizando <i>O. stramineus</i> como grupo de fora.....	99
Tabela 4-13. Parâmetros estimados pelo programa LAMARC para <i>citb</i> , com o valor da estimativa de máxima verossimilhança (MLE) e os valores de confiança superior e inferior, para as subpopulações de <i>O. nigripes</i> definidas na tabela 3-6. Os valores estão em notação científica para facilitar comparações.	101
Tabela 4-14. Listas das subpopulações analisadas discriminando o tamanho amostral (<i>n</i>), número de haplótipos de <i>coi</i> , número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (<i>h</i>), diversidade nucleotídica (π), índice de neutralidade F_S para cada população e para o total dos indivíduos. <i>p</i> = significância de F_S . Em cinza estão os valores significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-7.	104
Tabela 4-15. Cálculo do índice de fixação F_{ST} , para cada par de subpopulações. Os valores em cinza são significativos. Os códigos das subpopulações estão na tabela 3-7.	105
Tabela 4-16. Resumo da Análise Molecular de Variância (AMOVA) com <i>coi</i> para quatro grupos (GO, ES+RJ, SP+PR, RS+SC). <i>gl</i> = graus de liberdade; <i>p</i> =significância. Em cinza estão os valores significantes.	106
Tabela 4-17. Parâmetros encontrados pelo programa BEAST para as subpopulações de <i>O. nigripes</i> com <i>coi</i> , indicando a média e a estimativa de 95% de densidade posterior máxima e mínima, utilizando <i>O. stramineus</i> como grupo de fora.....	107
Tabela 4-18. Parâmetros estimados pelo programa LAMARC para <i>coi</i> , com o valor da estimativa de máxima verossimilhança (MLE) e os valores de confiança superior e inferior, para as subpopulações de <i>O. nigripes</i> definidas na tabela 3-7. Os valores estão em notação científica para facilitar comparações.	108
Tabela 4-19. Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo para cada uma das 17 variáveis, separados por espécie. As variáveis foram descritas no item 3.5.1.	112
Tabela 4-20. Resultado do teste LSD, mostrando quantas variáveis possuem diferenças significativas (N) entre os pares de espécies da análise morfométricas.	113
Tabela 4-21. Resultados da clonagem de <i>citb</i> , indicando o número de museu ou de campo do espécime (Número), o número de clones sequenciados (<i>n</i>), o número de haplótipos encontrados (<i>h</i>), o número de <i>gaps</i> encontrados em todos os haplótipos (<i>gaps</i>), o número de sítios polimórficos no ADN (Poln), o número de sítios polimórficos únicos (SNP), o número de sítios polimórficos informativos de parcimônia (Parc), o número de substituições de aminoácidos encontrados em todos os haplótipos (Pola) e o número de haplótipos que não apresentaram um códon de parada prematura (<i>stop</i>).	117
Tabela 4-22. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de SVS04 (<i>O. microtis</i>).....	118
Tabela 4-23. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de CRB733 (<i>O. fornesi</i>).	120
Tabela 4-24. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de MN46410 (<i>O. stramineus</i>).	121
Tabela 4-25. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de MN50322 (<i>O. rupestris</i>).	121
Tabela 4-26. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de MN50326 (<i>O. rupestris</i>).	122
Tabela 4-27. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de CRB1425 (<i>O. nigripes</i>).	122
Tabela 4-28. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de CRB1425 (<i>O. nigripes</i>).	123
Tabela 4-29. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de MN50307 (<i>O. moojeni</i>).....	124
Tabela 4-30. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>citb</i> de MN50309 (<i>O. moojeni</i>).....	124
Tabela 4-31. Resultados da clonagem de <i>coi</i> , indicando o número de museu ou de campo do espécime (Número), o número de clones sequenciados (<i>n</i>), o número de haplótipos encontrados (<i>h</i>), o número de <i>gaps</i> encontrados em todos os haplótipos (<i>gaps</i>), o número de sítios polimórficos no ADN (Poln), o número de sítios polimórficos únicos (SNP), o número de sítios polimórficos informativos de parcimônia (Parc), o número de substituições de aminoácidos encontrados em todos os haplótipos (Pola) e o número de sequências que não apresentaram um códon de parada prematura (sem <i>stop</i>).	125
Tabela 4-32. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>coi</i> de CRB1425 (<i>O. nigripes</i>).	125
Tabela 4-33. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>coi</i> de MN50309 (<i>O. moojeni</i>).....	126
Tabela 4-34. Distâncias genéticas K2P entre os clones de <i>coi</i> da a mostra LBCE12186 (<i>O. utaritensis</i>).....	126

Índice

1 -	Introdução	19
1.1	Os roedores sigmodontíneos	19
1.2	O gênero <i>Oligoryzomys</i>	19
1.3	<i>Oligoryzomys</i> e Hantavírus: Importância dos estudos taxonômicos dos reservatórios de zoonoses ...	22
1.4	O uso de marcadores moleculares mitocondriais em estudos evolutivos de roedores	24
2 -	Objetivos	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3 -	Material e Métodos.....	30
3.1	Amostras utilizadas neste trabalho.....	30
3.1.1	Análises com o gene mitocondrial <i>citocromo b</i>	30
3.1.2	Análises com o gene <i>citocromo oxidase subunidade I</i>	35
3.1.3	Análises com o íntron 7 do gene <i>β-fibrinogênio</i>	38
3.1.4	Deteção de pseudogenes	41
3.1.5	Análises morfométricas	42
3.2	Métodos moleculares	45
3.2.1	Isolamento de ADN	45
3.2.2	Amplificação de <i>citb</i>	46
3.2.3	Amplificação de <i>coi</i>	47
3.2.4	Amplificação de <i>beta-fibint7</i>	47
3.2.5	Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências.....	48
3.3	Análises filogenéticas	49
3.3.1	Teste de saturação.....	49
3.3.2	Distâncias moleculares e modelos de evolução molecular	49
3.3.3	Máxima Verossimilhança	50
3.3.4	Inferência Bayesiana.....	51
3.3.5	Relógio molecular	53
3.4	Análises populacionais de <i>Oligoryzomys nigripes</i>	54
3.4.1	Definição das subpopulações e marcadores utilizados	54
3.4.2	Diversidades nucleotídica e haplotípica e distâncias genéticas	55
3.4.3	Índices de fixação e Análise molecular de variância	55
3.4.4	Distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos	56
3.4.5	Testes de neutralidade	57
3.4.6	Coalescência.....	57
3.4.7	Rede de haplótipos	59
3.5	Análises morfométricas	59
3.5.1	Medidas craniométricas	59
3.5.2	Deteção de dimorfismo sexual.....	61
3.5.3	Estatísticas básicas e análise de variância.....	61
3.5.4	Análises multivariadas.....	61
3.6	Deteção de pseudogenes mitocondriais.....	62
3.6.1	Clonagem.....	62
3.6.2	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	63
4 -	Resultados	66
4.1	Distâncias genéticas	66
4.2	Análises filogenéticas com <i>citb</i>	69
4.2.1	Características das sequências	69
4.2.2	ML e BA.....	69
4.3	Análises filogenéticas com <i>coi</i>	80
4.3.1	Características das sequências	80
4.3.2	ML e BA.....	80
4.4	Análises filogenéticas com <i>beta-fibint7</i>	86
4.4.1	Características das sequências	86
4.4.2	ML e BA.....	86
4.5	Relógio molecular de <i>Oligoryzomys</i> a partir de <i>citb</i>	92
4.6	Análises populacionais de <i>O. nigripes</i> com <i>citb</i>	96
4.6.1	Análises populacionais clássicas	96
4.6.2	Análises populacionais por coalescência.....	98
4.6.3	Rede de haplótipos	103
4.7	Análises populacionais de <i>O. nigripes</i> com <i>coi</i>	104

4.7.1	Análises populacionais clássicas	104
4.7.2	Análises populacionais por coalescência	106
4.7.3	Rede de haplótipos	110
4.8	Análises morfométricas	111
4.8.1	Descrição dos dados	111
4.8.2	ANOVA.....	112
4.8.3	Análises multivariadas.....	113
4.9	Detecção de pseudogenes mitocondriais.....	115
4.9.1	Clonagem.....	115
4.9.2	FISH para detecção de cópias nucleares de <i>citb</i>	126
5 -	Discussão.....	129
5.1	Características das sequências e diversidade molecular.....	129
5.2	Sistemática e filogenia de <i>Oligoryzomys</i>	130
5.2.1	<i>Oligoryzomys microtis</i>	131
5.2.2	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	133
5.2.3	<i>Oligoryzomys destructor</i> , <i>Oligoryzomys sp. 2</i> e <i>Oligoryzomys sp. 3</i>	134
5.2.4	<i>Oligoryzomys costaricensis</i> , <i>fulvescens</i> e <i>vegetus</i>	135
5.2.5	<i>Oligoryzomys delicatus</i>	136
5.2.6	<i>Oligoryzomys sp. 1</i> e <i>Oligoryzomys messorius</i>	137
5.2.7	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	138
5.2.8	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	139
5.2.9	<i>Oligoryzomys flavescens</i> , <i>O. andinus</i> , e <i>Oligoryzomys sp. 4</i>	140
5.2.10	<i>Oligoryzomys nigripes</i> e <i>stramineus</i>	141
5.2.11	<i>Oligoryzomys rupestris</i>	143
5.2.12	<i>Oligoryzomys moojeni</i>	143
5.3	Status taxonômico de <i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	144
5.4	Diversidade genética de <i>Oligoryzomys nigripes</i>	145
5.5	História evolutiva de <i>Oligoryzomys</i>	147
5.6	Problemas e limitações do uso de genes mitocondriais em estudos evolutivos	153
6 -	Conclusões	157
7 -	Referências	159
	ANEXO I.....	174
	ANEXO II	175
	ANEXO III.....	177
	ANEXO IV.....	179
	ANEXO V.....	181
	ANEXO VI.....	183
	ANEXO VII	185

Capítulo 1

Introdução

1 - Introdução

1.1 *Os roedores sigmodontíneos*

Os roedores neotropicais sigmodontíneos pertencem à ordem Rodentia, superfamília Muroidea, família Cricetidae e subfamília Sigmodontinae. Os sigmodontíneos são um dos grupos mais diversos de mamíferos, contendo quase 400 espécies, ocupando uma grande variedade de nichos e praticamente toda a América do Sul e Central, e algumas regiões da América do Norte (Wilson e Reeder, 2005). Essa grande diversidade é resultado de uma grande irradiação que ocorreu durante os últimos 7 milhões de anos, provavelmente a partir do norte da América do Sul (Steppan *et al.*, 2004; Weksler, 2006). A história taxonômica dos sigmodontíneos é extremamente complexa, e atualmente se aceita a sua divisão em oito tribos (Musser e Carleton, 2005): Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini. Dentre essas tribos, Oryzomyini é a mais diversa, contendo em torno de 120 espécies, distribuídas em 28 gêneros vivos, além de outros gêneros extintos (Musser e Carleton, 2005; Percequillo *et al.*, 2011; Weksler *et al.*, 2006).

1.2 *O gênero Oligoryzomys*

Membros do gênero *Oligoryzomys* são encontrados nos mais diversos habitats, desde o México até a Terra do Fogo, do nível do mar até cerca de 5000 m acima do nível do mar. São noturnos, terrestres e solitários, e se alimentam de sementes, frutos e insetos, e algumas espécies podem ser pragas em plantações de arroz e outras monoculturas, e também em silos de armazenagem de grãos, possuem tamanho pequeno e comprimento da cauda maior que o corpo, e a coloração do dorso pode variar de castanho-avermelhada a amarelada, com as laterais mais claras e limite definido ou pouco definido com a coloração do ventre, que é esbranquiçada ou amarelada (Bonvicino *et al.*, 2008).

O gênero *Oligoryzomys* é um dos mais complexos e diversos da tribo Oryzomyini. Originalmente descrito como um subgênero de *Oryzomys*, foi elevado à categoria de gênero a partir de dados cariológicos e morfológicos (Carleton e Musser, 1989), e essa hierarquia é aceita até hoje. No último compêndio sobre os mamíferos (Wilson e Reeder, 2005), estão incluídas 18 espécies válidas para o gênero: *O. andinus* (Osgood 1914), *O. arenalis* (Thomas 1913), *O. brendae* Massoia 1983, *O. chacoensis* (Myers & Carleton 1981), *O. delticola*

(Thomas 1917), *O. destructor* (Tschudi 1844), *O. eliurus* (Wagner 1845), *O. flavescens* (Waterhouse 1837), *O. fornesi* (Massoia 1973), *O. fulvescens* (Saussure 1860), *O. griseolus* (Osgood 1912), *O. longicaudatus* (Bennett 1832), *O. magellanicus* (Bennett 1836), *O. microtis* (Allen, 1916), *O. nigripes* (Olfers 1818), *O. stramineus* Bonvicino & Weksler 1998, *O. vegetus* (Bangs 1902) e *O. victus* (Thomas 1898). Posteriormente, duas espécies foram acrescentadas a essa lista: *O. moojeni* Weksler & Bonvicino 2005 e *O. rupestris* Weksler & Bonvicino 2005. Trabalhos recentes (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Hanson *et al.*, 2011) ainda elevaram o status específico de *O. messorius* (Thomas 1901), *O. delicatus* (Allen & Chapman 1897) e *O. costaricensis* (Allen 1893), antes sinônimos de *O. fulvescens*. Além disso, *O. delticola* e *O. eliurus* são considerados sinônimos de *O. nigripes* por diversos autores (Francés e D'Elía, 2006; González-Ittig *et al.*, 2010; Massoia, 1973; Myers e Carleton, 1981; Paresque *et al.*, 2007; Weksler e Bonvicino, 2005). Dessa forma, o número de espécies de *Oligoryzomys* seria 21. Porém, o status taxonômico de várias dessas espécies é controverso, e existem pelo menos 62 nomes específicos para o gênero. Existem ainda na literatura citações de pelo menos três outras espécies de *Oligoryzomys* sem nenhum nome específico associado (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Carleton e Musser, 1989; Miranda *et al.*, 2009). No Brasil existem pelo menos 12 espécies distribuídas em todos os domínios morfoclimáticos (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Bonvicino *et al.*, 2008; Carleton e Musser, 1989; Miranda *et al.*, 2009; Musser e Carleton, 2005; Rosa *et al.*, 2011; Weksler e Bonvicino, 2005), sendo algumas espécies restritas aos domínios de formação aberta, como *O. chacoensis*, *O. moojeni*, *O. rupestris*, *O. fornesi* e *O. stramineus*, outras restritas aos domínios de formação florestal, como *O. microtis*, *O. messorius* e *Oligoryzomys* sp., e outras ocorrendo em ambos, que é o caso de *O. nigripes*, *O. flavescens* e *O. utiaritensis*.

A história evolutiva de *Oligoryzomys* e seus possíveis subgrupos de espécies vêm mudando ao longo do tempo, a partir de novos conhecimentos principalmente relacionados à filogenia molecular. Após diversos trabalhos e compilações sobre o gênero (*e.g.* Cabrera, 1961; Goodwin, 1953; Gyldenstolpe, 1932; Hershkovitz, 1940; Massoia, 1973; Moojen, 1952; Myers e Carleton, 1981), Carleton e Musser (1989) dividiram as 12 espécies conhecidas e mais três não descritas em cinco grupos: Grupo 1 – *fulvescens* (*O. fulvescens*, *O. arenalis* e *O. vegetus*); Grupo 2 – *microtis* (*O. microtis*); Grupo 3 – *andinus* (*O. andinus* e *O. chacoensis*); Grupo 4 – *flavescens* (*O. flavescens*, *Oligoryzomys* sp. A, sp. B e sp. C); e Grupo 5 – *nigripes* (*O. nigripes*, *O. eliurus*, *O. destructor*, *O. longicaudatus* e *O. delticola*). Tanto trabalhos com gene nuclear *IRBP* (Weksler, 2006) como com o gene mitocondrial citocromo *b* (Myers *et al.*, 1995) mostraram o monofiletismo do gênero. Este último trabalho não confirmou alguns dos agrupamentos feitos por Carleton e Musser (1989). Apenas

recentemente começaram a aparecer na literatura trabalhos de filogenia molecular de *Oligoryzomys* (Francés e D'Elía, 2006; González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2010b; Richter *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2007). Todos esses trabalhos comprovaram a monofilia do gênero, porém não há um consenso da posição filogenética da maioria das espécies. Além disso, é possível notar um grande problema na identificação correta das espécies, e um grande número de sequências disponíveis nos bancos de dados públicos pode estar com a identificação específica equivocada. Apesar de esforços de diversos trabalhos, que incluem dados morfológicos (*e.g.*, Bonvicino e Weksler, 1998; Bonvicino e Weksler, 1998; Carleton e Musser, 1995; Massoia, 1973; Myers e Carleton, 1981; Voss *et al.*, 2001), cariológicos (*e.g.*, Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Almeida e Yonenaga-Yassuda, 1991; Aniskin e Volobouev, 1999; Bonvicino *et al.*, 2001; Haiduk *et al.*, 1979; Paresque *et al.*, 2007; Sbalqueiro *et al.*, 1991; Yonenaga *et al.*, 1976) e moleculares (*e.g.*, Francés e D'Elía, 2006; González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 2010b; Rivera *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2009), o gênero nunca foi revisado de forma ampla, e diversos dados taxonômicos, geográficos e cariológicos ainda estão faltando. Além disso, as relações filogenéticas entre as espécies do gênero não são compreendidas em sua totalidade, já que nenhum trabalho incluiu todas as espécies reconhecidas em suas análises.

Estudos populacionais e filogeográficos têm sido realizados em várias espécies da ordem Rodentia, mas poucos foram realizados para espécies de *Oligoryzomys*. Consideramos aqui como filogeografia um campo que lida com a distribuição histórica e geográfica de linhagens genealógicas gênicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies proximamente relacionadas (Avise *et al.*, 1987). Esses estudos são importantes para conhecer a estrutura genética das populações, seu tamanho efetivo, o fluxo gênico entre elas e a história demográfica como um todo. Um estudo com isoenzimas analisou o fluxo gênico de sete populações na Argentina de *Oligoryzomys flavescens* e observaram um alto fluxo entre as populações localizadas mais ao norte com as mais ao sul, ocasionando uma baixa diferenciação genética entre elas (Chiappero *et al.*, 1997). Em outro estudo com isoenzimas, populações de *O. flavescens* e *O. nigripes* no Brasil foram analisadas, também apresentando fluxo gênico alto entre as populações (Perini *et al.*, 2004). Trabalhos semelhantes foram realizados com o gene mitocondrial citocromo *b* para *O. longicaudatus* (Palma *et al.*, 2005) e *O. microtis* (Patton *et al.*, 1996), e resultados semelhantes foram encontrados: baixa diferenciação genética.

No presente trabalho, analisamos a diversidade genética de *O. nigripes* e o status taxonômico de *O. utiaritensis* (Allen 1916), considerada sinônimo júnior de *O. eliurus*

(Carleton e Musser, 1989; Musser e Carleton, 2005; Myers e Carleton, 1981). Para isso, percebeu-se a necessidade de realizar uma análise filogenética que incluísse os dados moleculares disponíveis para *Oligoryzomys*. Porém, uma revisão taxonômica do gênero está além dos objetivos dessa tese, já que para tal são necessários diversos dados que seriam impossíveis de serem produzidos em conjunto com os outros objetivos. Para tal trabalho ser realizado, é necessário um esforço coletivo com diversas frentes de trabalho, onde novos dados cariológicos, morfológicos e moleculares deverão ser compilados com os dados já existentes.

Oligoryzomys nigripes ocorre no Brasil (na Mata Atlântica de Pernambuco ao Rio Grande do Sul, e ao sul do Cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás), no Paraguai (a leste do rio Paraguai), no Uruguai (Departamentos de Salto, Durazno, Colonia e Maldonado); e na Argentina (Províncias de Buenos Aires, Misiones e Chaco) (Weksler e Bonvicino, 2005). Essa espécie apresenta um número diplóide constante de 62 cromossomos e um número fundamental autossômico variável de 78 a 82 (Bonvicino *et al.*, 2001; Paresque *et al.*, 2007). Essa variação no número fundamental deve-se a inversões pericêntricas, que não afetam a meiose dos heterozigotos e, portanto, não é esperada uma desvantagem seletiva nos portadores dessa inversão (Bonvicino *et al.*, 2001).

1.3 Oligoryzomys e Hantavírus: Importância dos estudos taxonômicos dos reservatórios de zoonoses

Em junho de 1993, um novo hantavírus designado *Sin Nombre* foi responsabilizado pela epidemia de uma doença respiratória grave na região Sudoeste dos EUA, representando o primeiro registro da síndrome pulmonar por hantavírus (SPH) no mundo (Nichol *et al.*, 1993). Sabe-se que essa epidemia foi desencadeada por um desequilíbrio da população do roedor *Peromyscus maniculatus* (Childs *et al.*, 1994). Após essa descoberta, diversos novos hantavírus vem sendo descobertos no continente americano, e, com raras exceções de infecção cruzada, cada espécie de hantavírus está associada a uma espécie de roedor (Mills, 2006). Os roedores sigmodontíneos desempenham papel fundamental na manutenção de ciclos parasitários e na dispersão e transmissão de diversas doenças de origem zoonótica (*e.g.* D'Andrea *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006), e são, em sua maioria, os reservatórios de hantavírus nas Américas. Os hantavírus são todos potencialmente patogênicos e transmitidos para os humanos a partir de exposição acidental a secreções e aerossóis contaminados originados de roedores (Mills, 2006; Mills e Childs, 1998; Hjelle e Torres-Pérez, 2010). Na América do Sul, estudos sobre a correlação entre espécies de

hantavírus e de roedores são dificultados pela grande diversidade de sigmodontíneos na região, além do fato de diversas espécies viverem em sintopia, o que oferece a oportunidade de eventos de infecção cruzada e troca de hospedeiro (Chu *et al.*, 2011).

No Brasil, a primeira documentação de casos humanos de SPH ocorreu em dezembro de 1993, no estado de São Paulo (Silva *et al.*, 1997). O aparecimento desse surto foi relacionado a dois fatores: o primeiro, pela ocorrência do fenômeno natural conhecido como “ratada”, que se caracteriza pelo aumento da população de roedores após o aumento da oferta de semestres produzidas durante a floração cíclica de várias espécies de bambus nativos da Mata Atlântica; o segundo está relacionado com o desmatamento de uma área de mata nativa para a construção de um sítio, coincidentemente no momento que estava ocorrendo uma “ratada”. Esse conjunto de fatores provocou uma invasão de roedores silvestres em áreas ocupadas por humanos, desencadeando o surto (Pincelli *et al.*, 2003). A partir do diagnóstico desses primeiros casos, intensificou-se o trabalho de diagnose de SPH em seres humanos e roedores silvestres no Brasil, sendo então identificados novos tipos virais em diversos estados de todas as regiões brasileiras. Neste panorama não só a sorologia humana, mas também a captura, identificação taxonômica e exame sorológico e molecular dos roedores encontrados nas áreas de foco da doença foram essenciais para a caracterização dos reservatórios e suas variantes virais. Várias espécies de roedores sigmodontíneos se apresentam como potenciais reservatórios para os diversos tipos de hantavírus no Brasil, onde podemos destacar os gêneros *Necromys*, *Oligoryzomys*, *Calomys* e *Akodon* (Suzuki *et al.*, 2004).

Espécimes do gênero *Oligoryzomys* com sorologia positiva para hantavírus foram encontrados em áreas endêmicas do Brasil (Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), bem como em áreas sem ocorrência de casos humanos (Rio de Janeiro e Espírito Santo), e em áreas de ocorrência da doença na Argentina, Bolívia, Chile, Peru e Panamá (Chu *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2010; Padula *et al.*, 2000; Romano-Lieber *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). Hoje, sabe-se que três espécies de *Oligoryzomys* são reservatórios de hantavírus em território brasileiro: *O. nigripes* está associada ao vírus *Juquitiba*, responsável pelos primeiros casos descritos acima (Oliveira *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2004), que provocou casos humanos no sul do Brasil; *O. utiaritensis* está associada ao vírus *Castelo dos Sonhos* (Rosa *et al.*, 2011), que provocou casos humanos no Pará e Mato Grosso; e *O. fornesi* está associado ao vírus *Anajatuba*, no Maranhão (Rosa *et al.*, 2010). Outras seis espécies de *Oligoryzomys*, algumas ocorrendo no Brasil, também apresentam hantavírus em outros países da América do Sul do Central: *O. flavescens* foi identificado como reservatório do vírus *Lechiguanas* na Argentina e do vírus *Plata* no Uruguai (Delfraro *et al.*, 2003); *O. longicaudatus* foi identificado como reservatório do vírus *Oran* ao

norte da Argentina e do vírus *Andes* ao sul da Argentina e Chile (Calderón *et al.*, 1999); *O. chacoensis* foi identificado como reservatório do vírus *Bermejo* no Paraguai (Padula *et al.*, 2002); *O. microtis* foi identificado como reservatório do vírus *Rio Mamoré* no Peru e Bolívia (Carroll *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2010); *O. fulvescens* foi identificado como reservatório do vírus *Choclo* no Panamá (Vincent *et al.*, 2000); e *O. delicatus* foi identificado como reservatório do vírus *Maporal* na Venezuela (Hanson *et al.*, 2011).

Uma característica comum à maioria dessas espécies é o comportamento oportunista, sendo umas das primeiras a se instalar próximo a áreas de plantio e também a nidificar em instalações rurais e do peridomicílio em busca de alimento, principalmente em épocas de entressafra (Chu *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). Estudos genéticos filogenéticos, populacionais e filogeográficos de mamíferos reservatórios são essenciais para caracterização da estrutura de suas populações e do fluxo gênico entre elas, além de delimitar as diferentes unidades evolutivas dos roedores, podendo ajudar a compreender a distribuição e dinâmica de transmissão das doenças a elas associadas (Bonvicino *et al.*, 2006).

Apesar da vasta distribuição geográfica de *O. nigripes*, e da detecção de circulação silvestre do hantavírus associado em grande parte dessa distribuição, o perfil epidemiológico da hantavirose neste cenário (Mata Atlântica) é bastante complexo e variado, observando-se, por exemplo, em algumas regiões, ausência de casos humanos de hantavirose apesar da ocorrência do reservatório e do hantavírus patogênico associado (Oliveira *et al.*, 2009). Dessa maneira, o entendimento da variação regional na abundância, distribuição espacial e possíveis variações genéticas intraespecíficas podem ser determinantes para explicar essa complexidade do perfil epidemiológico.

1.4 O uso de marcadores moleculares mitocondriais em estudos evolutivos de roedores

A maior parte dos estudos moleculares citados acima tem como base o sequenciamento do gene mitocondrial citocromo *b*. O uso de marcadores mitocondriais em estudos evolutivos de mamíferos é marcante, e os biólogos evolutivos têm diversos motivos para preferir esse tipo de sequência em detrimento de sequências de ADN nuclear (Awise, 1986): possui estrutura simples, sem a presença de íntrons, elementos de transposição e ADN repetitivo; é fácil de isolar, presente em quantidade superior ao ADN nuclear; não é passível de recombinação, o que pode confundir o sinal filogenético; e apresenta taxas de mutação elevada, o que garante um bom sinal filogenético para espécies que se diferenciaram

recentemente, como os roedores neotropicais. O gene citocromo *b* foi escolhido por ser, nos anos 80, um dos únicos genes mitocondriais a ter a sua estrutura conhecida, além de ser fácil de alinhar e de apresentar sinal filogenético suficiente para definir algumas espécies de mamíferos já definidas por outros métodos (Irwin *et al.*, 1991). Além deste gene, outro marcador que ganhou notoriedade nos últimos anos foi o gene citocromo oxidase subunidade *I*, pois este foi o escolhido para representar o “código de barras do ADN”, uma iniciativa que propõe identificação rápida no nível de espécies a partir do sequenciamento (padronizado para qualquer animal) de uma região de 648 pb deste gene (Hebert *et al.*, 2003). Esse pequeno trecho de ADN mostrou-se suficiente para identificar e separar diversas espécies, de diferentes grupos animais. Existem poucas publicações utilizando essa metodologia no estudo de roedores, e poucas utilizarem roedores sigmodontíneos (Borisenko *et al.*, 2008).

Apesar das diversas vantagens, existem muitas críticas quanto ao uso de ADN mitocondrial em estudos evolutivos. Dentre elas, está a possibilidade de heteroplasmia¹ e introgressão², além do fato de que a seleção sobre os genes mitocondriais, devido a estes codificarem proteínas essenciais para a produção de energia da célula, pode afetar o sinal filogenético (Ballard e Whitlock, 2004; Galtier *et al.*, 2009). Uma outra fonte de problemas é a translocação de sequências mitocondriais no ADN nuclear. Apesar da separação física entre a mitocôndria e o núcleo no interior da célula, fragmentos de ADN mitocondrial são constantemente encontrados no genoma nuclear (Hazkani-Covo *et al.*, 2010), e essas sequências contam histórias evolutivas diferentes. Como essas sequências podem ser extremamente similares ao ADN original mitocondrial, elas podem ser sequenciadas, exclusivamente ou em conjunto com as sequências mitocondriais. Os chamados Numts – do inglês *nuclear mitochondrial DNA sequences* (Antunes *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 1994) – podem ser originados de diferentes porções do genoma mitocondrial, de apenas alguns fragmentos, ou de genes inteiros, e variam muito no grau de similaridade de sua contraparte mitocondrial (Hazkani-Covo *et al.*, 2010). Existem poucos métodos físicos que conseguem evitar a amplificação dos Numts (Calvignac *et al.*, 2011). Uma vez com as sequências em mãos, algumas propriedades podem ser investigadas, como por exemplo, a presença de códons de parada prematuros em sequências codificantes, a composição das bases e as taxas de transição ou transversão diferentes das encontradas normalmente no genoma mitocondrial (Triant e DeWoody, 2007). Porém, se a inserção nuclear for muito recente, não houve tempo

¹ Presença de mais de um tipo de mitocôndria numa célula ou indivíduo, podendo acarretar em mais de um haplótipo mitocondrial em um indivíduo.

² Presença de mitocôndrias de diferentes espécies misturadas em um indivíduo, devido a um cruzamento interespecífico.

para permitir a alteração das propriedades das sequências a ponto dos Numts serem detectados apenas dessa forma. Outros métodos têm sido utilizados para verificar a presença de Numts, como por exemplo, a clonagem molecular (Mirol *et al.*, 2000), a hibridização *in situ* por fluorescências (Lopez *et al.*, 1994) e a análise do genoma completo (Hlaing *et al.*, 2009). Para esta tese, sentiu-se a necessidade de investigar se existem Numts em *Oligoryzomys*, devido a diversos problemas experimentais ocorridos ao longo do trabalho, e também por eles estarem presentes em diversas espécies de roedores (Dubey *et al.*, 2009; González-Ittig e Gardenal, 2008; Mirol *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1992).

Capítulo 2

Objetivos

2 - Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho é analisar a posição filogenética de *O. nigripes* e *O. utiaritensis* dentro do gênero *Oligoryzomys*, através de marcadores moleculares, estudar a diversidade genética e estrutura populacional de *O. nigripes*, e avaliar o status taxonômico de *O. utiaritensis*.

2.2 *Objetivos específicos*

Como objetivos específicos, temos:

- Analisar as relações filogenéticas do gênero *Oligoryzomys* com dois marcadores mitocondriais (citocromo *b* e citocromo oxidase subunidade I) e um marcador nuclear (íntron 7 do gene beta fibrinogênio);
- Comparar as topologias obtidas com os marcadores mitocondriais e o marcador nuclear;
- Estimar os tempos de divergência entre os táxons de *Oligoryzomys* a partir dos dados do gene mitocondrial citocromo *b*;
- Investigar a dinâmica populacional e filogeografia de *O. nigripes* com os genes mitocondriais citocromo *b* e citocromo oxidase subunidade I;
- Avaliar o status taxonômico de *O. utiaritensis* a partir de análises morfométricas com medidas craniométricas de cinco espécies de *Oligoryzomys* e com dados das análises moleculares;
- Investigar a presença de pseudogenes de origem mitocondrial no núcleo em espécimes de *Oligoryzomys*, a partir de clonagem molecular e hibridização *in situ* por fluorescência.

Capítulo 3

Material e Métodos

3 - Material e Métodos

3.1 Amostras utilizadas neste trabalho

A maioria das amostras de fígado utilizadas para sequenciamento neste trabalho foi coletada pela equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LBCE), da Fundação Oswaldo Cruz; outros espécimes foram coletados pela Secretária de Vigilância em Saúde (SVS), Dra. Lena Geise (LG), Dra. Liliani Marília Tiepolo (LMT), Dra. C. R. Bonvicino (CRB). As amostras de crânios utilizadas nas análises morfométricas estão depositadas no Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, ou temporariamente armazenadas no LBCE.

Os próximos subitens descrevem as amostras utilizadas em cada uma das análises realizadas.

3.1.1 Análises com o gene mitocondrial *citocromo b*

Para as análises filogenéticas e populacionais utilizando o gene mitocondrial citocromo *b* (*citb*, ver item 3.2.2), foram sequenciadas 71 amostras, sendo uma de *O. fornesi*, duas de *O. microtis*, 10 de *O. moojeni*, 33 de *O. nigripes*, seis de *O. rupestris*, duas de *O. stramineus* e 17 de *O. utiaritensis*. Além dessas, também foram utilizadas outras 139 sequências disponíveis no GenBank, sendo 131 sequências de *Oligoryzomys* e oito sequências de outros grupos de sigmodontíneos (Tabela 3-1). Não existem sequências disponíveis de *O. victus*, *O. griseleos*, *O. arenalis* e *O. brendae*, e por isso essas espécies ficaram de fora das análises deste trabalho. A única sequência disponível de *O. magellanicus* disponível apresenta tamanho pequeno, e não foi utilizada. A Figura 3-1 mostra um mapa com os pontos de coleta referentes às sequências inéditas utilizadas neste trabalho.

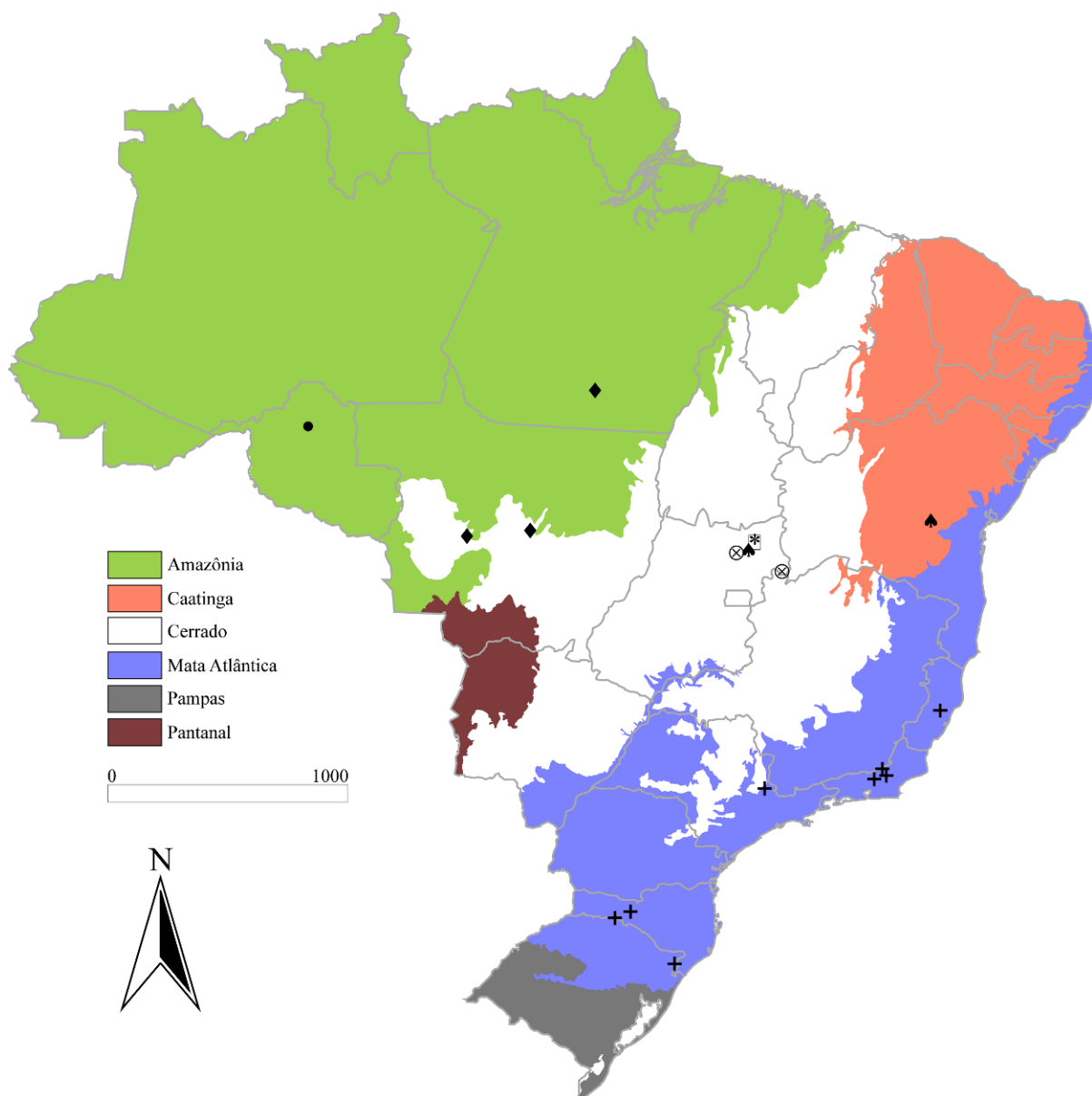


Figura 3-1. Mapa mostrando as localidades das amostras de *citb* aqui sequenciadas, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão listadas na tabela 3-1. A barra de escala está em quilômetros. * - *O. fornesi*, • - *O. microtis*, ⊗ - *O. moojeni*, + - *O. nigripes*, ▲ - *O. rupestris*, □ - *O. stramineus*, ◆ - *O. utiaritensis*.

Tabela 3-1. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais com *citb*, especificando a espécie*, número de campo ou de museu (Número), número de acesso do GenBank, país, região (Estado para o Brasil, EUA, México e Venezuela; Província para Argentina, Chile, Costa Rica, Equador e Panamá; Departamento para Bolívia, Honduras, Paraguai, Peru e Uruguai; Distrito para Suriname), localidade (municipalidade ou localidade regional de origem), tamanho do fragmento em pares de base (Tam.), referência bibliográfica das sequências utilizadas (Ref.)*. n/d significa informação não disponível. Em cinza estão as sequências utilizadas nas análises de datação por relógio molecular.

Espécie	Número	GenBank	País	Região	Localidade	Tam.	Ref.
<i>Oligoryzomys andinus</i>	NK12051	GU393999	Bolívia	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys andinus</i>	NK11547	AY452200	Bolívia	Oruro	n/d	1003	2
<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Jy1332	GU185902	Argentina	Jujuy	San Salvador	790	3
<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Or22496	GU185903	Argentina	Salta	Orán	790	3
<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Or22498	GU185904	Argentina	Salta	Orán	1140	3
<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	TK62932	EU258543	Argentina	Formosa	Las Lomitas	1140	1
<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	NK72388	EU192173	Paraguai	Boquerón	Toledo	976	4
<i>Oligoryzomys destructor</i>	Jy1245	GU185901	Argentina	Jujuy	San Salvador	790	3
<i>Oligoryzomys destructor</i>	PIDBA986	GU185900	Argentina	Salta	Metán	790	3

Continuação da Tabela 3-1.

Espécie	Número	GenBank	País	Região	Localidade	Tam.	Ref.
<i>Oligoryzomys destructor</i>	TEL1481	GU393991	Equador	Pichincha	Tandayapa	800	1
<i>Oligoryzomys destructor</i>	TEL1482	GU393990	Equador	Pichincha	Tandayapa	800	1
<i>Oligoryzomys destructor</i>	TEL1526	GU393992	Equador	Pichincha	Tandayapa	800	1
<i>Oligoryzomys destructor</i>	TEL1479	EU258544	Equador	Pichincha	Tandayapa	1140	1
<i>Oligoryzomys destructor</i>	NK22846	EU192171	Bolívia	Cochabamba	Totora	976	4
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	UP51	GU185924	Argentina	Buenos Aires	La Balandra	951	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	BA850	GU185925	Argentina	Buenos Aires	La Plata	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	O115	GU185919	Argentina	Chaco	Chaco	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	O19	GU185920	Argentina	Chaco	Chaco	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	SLBCH	GU185916	Argentina	Córdoba	Pampa de San Luís	945	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	PL32022	GU185923	Argentina	La Pampa	Luro	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Or22523	GU185914	Argentina	Salta	Orán	1130	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Or22531	GU185913	Argentina	Salta	Orán	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	PV27	GU185921	Uruguai	San José	Puntas de Valdez	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	PV32	GU185922	Uruguai	San José	Puntas de Valdez	1140	3
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1405	EU258545	Brasil	São Paulo	Pedreira	1140	1
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	MN37722	DQ826014	Brasil	Rio Grande do Sul	Charqueadas	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	LF2106	DQ826012	Brasil	Rio Grande do Sul	Mostardas	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	LF1077	DQ826011	Brasil	Rio Grande do Sul	Osório	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	JR02	DQ826007	Brasil	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	LF616	DQ826009	Brasil	Rio Grande do Sul	Rio Grande	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	DS32	DQ826006	Brasil	Rio Grande do Sul	Riozinho	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	LF520	DQ826008	Brasil	Rio Grande do Sul	Sapiranga	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	MN37699	DQ826013	Brasil	Rio Grande do Sul	Tainhas	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	MN37749	DQ826015	Brasil	Santa Catarina	Florianópolis	801	5
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	NK21532	EU192170	Bolívia	Chuquisaca	Padilla	976	4
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1430	GU126528	Brasil	São Paulo	Pedreira	1140	6
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	O114	GU185917	Argentina	Chaco	Chaco	1140	3
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	O140	GU185918	Argentina	Chaco	Chaco	1131	3
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	MN36746	DQ826022	Brasil	Goiás	Minaçu	801	5
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	MN36928	DQ826023	Brasil	Goiás	Minaçu	801	5
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	GD010	AY452199	Argentina	Misiones	Centu Cue	1003	4
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	GD259	EU192158	Paraguai	Paraguari	Rio Tebicuary	976	4
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB733	n/d	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás	828	15
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	RGR383	HM594621	Brasil	Pará	Santana do Araguaia	800	7
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	RGR389	HM594623	Brasil	Pará	Santana do Araguaia	801	7
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	RGR398	HM594619	Brasil	Tocantins	Lagoa da Confusão	801	7
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	RGR533	HM594620	Brasil	Tocantins	Lagoa da Confusão	801	7
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	RGR281	HM594622	Brasil	Tocantins	Pium	801	7
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ROM113156	EU258541	Costa Rica	n/d	n/d	819	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK102042	EU258547	Honduras	Olancho	Catacamas	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK138057	EU258548	México	Chiapas	Mapastepec	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK163370	GU393989	Panamá	Gamboia	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	HGC773	GU393997	Suriname	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK21065	GU393993	Suriname	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK17858	EU258546	Suriname	Nickerie	Sipaliwini Airstrip	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	FHV3967	GU393994	Venezuela	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	FHV3977	GU393995	Venezuela	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	FHV4110	GU393996	Venezuela	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	FN30422	EU294241	n/d	n/d	n/d	801	n/d
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	NK101588	EU192164	Panamá	Los Santos	Península de Azuero	801	4
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	AMNH257262	GU126529	Venezuela	Sucre	Finca Vuelta Larga	1140	6
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	BYU15214	EU294250	Costa Rica	Alajuela	Finca Rosalia	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	BYU15215	EU294252	Costa Rica	Alajuela	Finca Rosalia	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	BYU15217	EU294251	Costa Rica	Alajuela	Finca Rosalia	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	BYU15218	EU294249	Costa Rica	Cartago	Rio Macho	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ROM95928	EU294229	México	Campeche	Champotón	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ROM95930	EU294230	México	Campeche	Champotón	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ASNHC1665	EU294233	México	Chiapas	Berriozabal	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ASNHC1666	EU294234	México	Chiapas	Berriozabal	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ASNHC1668	EU294231	México	Chiapas	Palenque	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ASNHC7202	EU294237	México	Tabasco	El Triunfo	801	8

Continuação da Tabela 3-1.

Espécie	Número	GenBank	País	Região	Localidade	Tam.	Ref.
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ASNHC7203	EU294236	México	Tabasco	El Triunfo	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ROM96127	EU294239	México	Tamaulipas	La Carbonera	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TCWC59325	EU294244	México	Tamaulipas	Los Cedros	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TCWC59327	EU294246	México	Tamaulipas	Los Cedros	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	BYU15797	EU294235	México	Tamaulipas	San José	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	CNMA34237	EU294247	México	Veracruz	Cascadas de Texolo	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	CNMA34236	EU294248	México	Veracruz	Teocelo	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	ROM96523	EU294240	México	Yucatán	Laguna Becanchem	801	8
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	TK138080	DQ227457	Venezuela	Portuguesa	Hato Maporal	1140	8
<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	MVZ154463	GU393998	Argentina	n/d	n/d	1140	1
<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	JCT1960	EU192160	Chile	Magallanes	Isla Navarino	976	4
<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	MVZ155842	U03535	Argentina	Rio Negro	Bariloche	975	9
<i>Oligoryzomys messorius</i>	MN37751	DQ826024	Brasil	Roraima	Surumu	801	5
<i>Oligoryzomys microtis</i>	BYU19014	AY439000	Bolívia	Santa Cruz	Mineros	1140	10
<i>Oligoryzomys microtis</i>	MVZ193858	EU258549	Brasil	Amazonas	Jáinu	1140	1
<i>Oligoryzomys microtis</i>	NK13425	EU192172	Bolívia	Beni	Rurrenabaque	976	4
<i>Oligoryzomys microtis</i>	MNFS1321	U58381	Brasil	Acre	Porongaba	801	11
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS03	n/d	Brasil	Rondônia	Alto Paraíso	1140	15
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS04	n/d	Brasil	Rondônia	Alto Paraíso	1140	15
<i>Oligoryzomys microtis</i>	TTU76249	FJ374766	Peru	Lorento	Zona Marina	1140	12
<i>Oligoryzomys microtis</i>	MVZ190401	HM594624	Brasil	Amazonas	Rio Juruá	801	7
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36220	DQ826016	Brasil	Goiás	Colinas do Sul	801	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36357	DQ826017	Brasil	Goiás	Colinas do Sul	801	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36426	DQ826018	Brasil	Goiás	Colinas do Sul	801	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36832	DQ826019	Brasil	Goiás	Minaçu	801	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN37282	DQ826020	Brasil	Goiás	Uruaçu	801	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN37441	DQ826021	Brasil	Goiás	Uruaçu	794	5
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50287	JQ013772	Brasil	Goiás	Cavalcante	814	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50307	JQ013766	Brasil	Goiás	Cavalcante	765	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50309	JQ013768	Brasil	Goiás	Cavalcante	817	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50314	JQ013770	Brasil	Goiás	Cavalcante	818	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50315	JQ013774	Brasil	Goiás	Cavalcante	780	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50317	JQ013775	Brasil	Goiás	Cavalcante	809	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50319	JQ013767	Brasil	Goiás	Cavalcante	773	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50320	JQ013769	Brasil	Goiás	Cavalcante	818	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	LBCE11615	JQ013771	Brasil	Goiás	Sítio D'Abadia	819	15
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	LBCE11648	JQ013773	Brasil	Goiás	Sítio D'Abadia	830	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	UP45	GU185908	Argentina	Buenos Aires	La Balandra	1140	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LIF122	GU185910	Argentina	Chaco	Isla Cerrito	1140	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	OI105	GU185907	Argentina	Misiones	Uruguai	1140	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	TK65938	EU258550	Paraguai	Itapuã	Ape Aime	1140	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	TK61708	EU258551	Paraguai	Neembuco	Estância Yacaré	1140	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	UFPB357	DQ826004	Brasil	Espírito Santo	Monte Verde	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37493	DQ825993	Brasil	Goiás	Caldas Novas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	JR156	DQ825989	Brasil	Rio Grande do Sul	Bagé	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37513	DQ825995	Brasil	Rio Grande do Sul	Caxias do Sul	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LF2380	DQ825992	Brasil	Rio Grande do Sul	Charqueadas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	AC52	DQ825987	Brasil	Rio Grande do Sul	Mostardas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	JR78	DQ825988	Brasil	Rio Grande do Sul	Mostardas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37633	DQ826000	Brasil	Rio Grande do Sul	Mostardas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37697	DQ826003	Brasil	Rio Grande do Sul	Nonoai	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LF1023	DQ825991	Brasil	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LF606	DQ825990	Brasil	Rio Grande do Sul	Rio Grande	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37531	DQ825996	Brasil	Rio Grande do Sul	São Francisco de Paula	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37565	DQ825997	Brasil	Rio Grande do Sul	Sapiranga	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	ZE72	DQ826005	Brasil	Rio Grande do Sul	Tainhas	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37626	DQ825999	Brasil	Rio Grande do Sul	Tapes	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37501	DQ825994	Brasil	Rio Grande do Sul	Tenente Portela	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37584	DQ825998	Brasil	Rio Grande do Sul	Torres	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37685	DQ826002	Brasil	Santa Catarina	Concórdia	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN37683	DQ826001	Brasil	Santa Catarina	Florianópolis	801	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	GD547	EU192161	Paraguai	Paraguari	Rio Tebucary	976	4

Continuação da Tabela 3-1.

Espécie	Número	GenBank	País	Região	Localidade	Tam.	Ref.
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	GD569	EU192162	Uruguai	Rivera	Lunarejo	976	4
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1422	GU126530	Brasil	São Paulo	Pedreira	1140	6
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS163	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS168	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS169	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS191	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS193	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS195	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS228	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE5572	n/d	Brasil	Minas Gerais	Capitão Andrade	828	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1352	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo	815	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1353	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo	803	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1827	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo	812	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1849	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo	813	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1850	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo	808	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1356	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro	819	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE2082	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis	781	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE2095	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis	818	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN71983	GQ259904	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN71984	GQ259905	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	MN71985	GQ259906	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1986	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba	803	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT298	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	810	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT302	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	827	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT333	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	818	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1904	n/d	Brasil	Santa Catarina	Itá	800	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1984	n/d	Brasil	Santa Catarina	Itá	813	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6902	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6914	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8057	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8089	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8091	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8092	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8160	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá	1140	15
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1424	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira	800	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	MN50322	JQ013763	Brasil	Goiás	Alto Paraíso	1140	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	MN50326	JQ013764	Brasil	Goiás	Alto Paraíso	1108	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	LG214	n/d	Brasil	Bahia	Itaête	1140	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	LG228	n/d	Brasil	Bahia	Itaête	1140	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	MN50286	n/d	Brasil	Goiás	Alto Paraíso	1140	15
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	MN50286	n/d	Brasil	Goiás	Alto Paraíso	1140	15
<i>Oligoryzomys</i> sp.	MN37756	DQ826025	Brasil	Amapá	Tartarugalzinho	801	5
<i>Oligoryzomys</i> sp.	RGR280	HM594618	Brasil	Tocantins	Pium	801	7
<i>Oligoryzomys</i> sp. 1	MIC210	EU192167	Argentina	Catamarca	Ambato	976	4
<i>Oligoryzomys</i> sp. 1	MIC210	EU192168	Argentina	Catamarca	Ambato	976	4
<i>Oligoryzomys</i> sp. 2	MIC203	EU192169	Argentina	Catamarca	Ambato	976	4
<i>Oligoryzomys</i> sp. B	MUSA2625	EU192159	Peru	Puno	San/dia	976	4
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46410	JQ013747	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás	1140	15
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	UFPB1825	DQ826026	Brasil	Goiás	Fazenda Regalito	794	5
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	UFPB1827	DQ826027	Brasil	Goiás	Fazenda Regalito	801	5
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	CRB607	n/d	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás	828	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75616	JQ013754	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	828	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75619	JQ013749	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75620	JQ013755	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75622	JQ013756	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75625	JQ013752	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	960	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75626	JQ013751	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS306	JQ013765	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	772	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS357	JQ013750	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75592	JQ013753	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1138	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75593	JQ013758	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1140	15
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	MN75594	JQ013759	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1140	15

Continuação da Tabela 3-1.

Espécie	Número	GenBank	País	Região	Localidade	Tam.	Ref.
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75596	JQ013748	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1140	15
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75597	JQ013757	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1140	15
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75598	JQ013760	Brasil	Mato Grosso	Sapezal	1140	15
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75609	JQ013762	Brasil	Pará	Castelo dos Sonhos	841	15
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75612	JQ013776	Brasil	Pará	Castelo dos Sonhos	826	15
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75613	JQ013761	Brasil	Pará	Castelo dos Sonhos	1140	15
<i>Oligoryzomys vegetus</i>	KU142065	EU192165	Costa Rica	Punta Arenas	Monteverde	976	4
<i>Holochilus chacarius</i>	Roro007	GU185898	Argentina	Chaco	Selvas de Río Oro	1140	3
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	USNM549548	AF108695	Brasil	Pará	Altamira	1140	13
<i>Microryzomys minutus</i>	MVZ166666	EU258535	Peru	Cuzco	Paucartambo	1140	1
<i>Neacomys minutus</i>	AMNH272867	EU579502	Peru	n/d	n/d	1140	1
<i>Oecomys concolor</i>	MN37763	FJ361051	n/d	n/d	n/d	1140	n/d
<i>Oreoryzomys balneator</i>	AMNH268144	EU579510	Peru	Cajamarca	Chaupe	1140	n/d
<i>Oryzomys palustris</i>	SBI01	FJ974118	EUA	Flórida	Lee County	1140	14
<i>Zygodontomys brevicaudata</i>	AMNH257321	EU579521	Venezuela	Sucre	Finca Vuelta Larga	1140	n/d

* Para as sequências retiradas do GenBank, o nome da espécie é o mesmo depositado, independente das conclusões das análises realizadas neste trabalho; para as sequências inéditas, as espécies indicadas são resultado das conclusões tiradas de identificação morfológica, cariológica ou das análises filogenéticas deste trabalho.

** Referências: 1 – Hanson *et al.*, 2011; 2 – Palma *et al.*, 2005; 3 – González-Ittig *et al.*, 2010; 4 – Palma *et al.*, 2010b; 5 – Miranda *et al.*, 2009; 6 – Percequillo *et al.*, 2011; 7 – Rocha *et al.*, 2011; 8 – Rogers *et al.*, 2009; 9 – Smith e Patton, 1993; 10 – Carroll *et al.*, 2005; 11 – Patton e Silva, 1995; 12 – Richter *et al.*, 2010; 13 – Smith e Patton, 1999; 14 – Hanson *et al.*, 2010; 15 – Presente trabalho.

3.1.2 Análises com o gene citocromo oxidase subunidade I

Para as análises filogenéticas e populacionais utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*coi*, ver item 3.2.3), foram sequenciadas 103 amostras, sendo três de *O. flavescens*, 12 de *O. fornesi*, uma de *O. microtis*, 12 de *O. moojeni*, 65 de *O. nigripes*, três de *O. rupestris*, duas de *O. stramineus* e cinco de *O. utiariensis*. Além dessas, outras sete sequências de cricetídeos, disponíveis no GenBank foram utilizadas: *Cricetulus griseus* (NC_007936), *Eothenomys chinensis* (NC_013571), *Mesocricetus auratus* (NC_013276), *Microtus kikuchii* (NC_003041), *Microtus levis* (NC_008064) e *Proedromys sp.* (NC_013563). Os números de acesso dessas amostras referem-se ao genoma mitocondrial completo, e a sequência de *coi* foi selecionada a partir da anotação. Existem poucas sequências de *coi* de *Oligoryzomys* no GenBank, e todas elas são referentes ao pequeno trecho do código de barras do ADN, e por isso não foram utilizadas nas análises deste trabalho. A Tabela 3-1 sumariza as sequências inéditas para este gene e a Figura 3-1 mostra o mapa com os pontos de coletas.



Figura 3-2. Mapa mostrando as localidades referentes às novas sequências de *coi*, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-2. A barra de escala está em quilômetros. Δ - *O. flavescens*, * - *O. fornesi*, • - *O. microtis*, ⊗ - *O. moojeni*, + - *O. nigripes*, ♣ - *O. rupestris*, □ - *O. stramineus*, ♦ - *O. utiaritensis*.

Tabela 3-2. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais com *coi*, especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil e todas as sequências são inéditas. n/d significa informação não disponível.

Espécie	Campo	Museu	País	Estado	Município
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1405	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1932	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1990	MN62161	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB708	n/d	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB733	n/d	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB747	n/d	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE12111	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Cassilândia
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5519	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Aquidauana
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5689	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5690	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5718	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5719	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5720	n/d	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá

Continuação Tabela 3-2.

Espécie	Campo	Museu	País	Estado	Município
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2788	n/d	Brasil	Mato Grosso	São José do Xingu
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2793	n/d	Brasil	Mato Grosso	São José do Xingu
<i>Oligoryzomys microtis</i>	CRB1449	n/d	Brasil	Tocantins	Faz. Osara
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1012	MN50287	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1018	MN50314	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1053	MN50317	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1054	MN50318	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1055	MN50316	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1056	MN50319	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1057	MN50320	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1058	MN50321	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB902	MN50308	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB937	MN50378	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB948	MN50309	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB979	MN50311	Brasil	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1247	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1407	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1414	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1422	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1425	n/d	Brasil	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1909	MN62108	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1927	MN62122	Brasil	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1984	MN62158	Brasil	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1985	MN62159	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1986	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1995	MN62162	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1999	MN62165	Brasil	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10041	n/d	Brasil	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10058	n/d	Brasil	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10100	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10106	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10111	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10112	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10113	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10114	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10115	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10135	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10136	n/d	Brasil	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1356	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1357	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1456	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1459	MN60622	Brasil	Rio de Janeiro	Sapucaia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1460	MN60623	Brasil	Rio de Janeiro	Sapucaia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1466	MN60629	Brasil	Rio de Janeiro	Sapucaia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1470	MN60633	Brasil	Rio de Janeiro	Sapucaia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1658	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1660	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1661	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1827	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1828	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1830	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1845	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE1848	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Nova Friburgo
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE2578	n/d	Brasil	Rio de Janeiro	Sumidouro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE5570	n/d	Brasil	Minas Gerais	Capitão Andrade
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE5585	n/d	Brasil	Minas Gerais	Capitão Andrade
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6468	MN71983	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6469	MN71984	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6470	MN71985	Brasil	Rio de Janeiro	Teresópolis
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6902	MN69919	Brasil	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6914	MN69921	Brasil	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6957	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá

Continuação Tabela 3-2.

Espécie	Campo	Museu	País	Estado	Município
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8057	n/d	Brasil	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8089	MN69934	Brasil	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8092	MN69935	Brasil	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8762	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8765	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8778	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8779	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8780	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8781	n/d	Brasil	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT298	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT302	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT303	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT311	n/d	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS168	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS191	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS193	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS221	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS228	n/d	Brasil	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1079	MN50322	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1109	MN50325	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1110	MN50326	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	CRB607	MN34439	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	CRB677	MN46409	Brasil	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12174	MN75595	Brasil	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12186	MN75598	Brasil	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12225	MN75599	Brasil	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS288	MN75612	Brasil	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS299	MN75616	Brasil	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis

* as espécies indicadas são resultado das conclusões tiradas de identificação morfológica, cariológica ou das análises filogenéticas deste trabalho.

3.1.3 Análises com o íntron 7 do gene β -fibrinogênio

Para as análises filogenéticas e populacionais utilizando o íntron 7 do gene nuclear beta-fibrinogênio (*beta-fibint7*, ver item 3.2.4) foram sequenciadas 100 amostras, sendo uma de *O. flavescens*, cinco de *O. fornesi*, 11 de *O. microtis*, nove de *O. moojeni*, 51 de *O. nigripes*, três de *O. rupestris*, uma de *O. stramineus* e 19 de *O. utiaritensis*. Além dessas, outras quatro sequências de sigmodontíneos disponíveis no GenBank foram utilizadas: *Oryzomys palustris* (AY274219), *Oryzomys couesi* (EU652903), *Holochilus chacarius* (EU652904) e *Zygodontomys brevicauda* (EU652905). Não existem sequências de *beta-fibint7* de *Oligoryzomys* disponíveis no GenBank. A Tabela 3-3 sumariza as sequências inéditas e a Figura 3-3 mostra o mapa com os pontos de coleta.



Figura 3-3. Mapa mostrando as localidades referentes às novas sequências de *beta-fibin7*, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-3. A barra de escala está em quilômetros. Δ - *O. flavescens*, * - *O. fornesi*, • - *O. microtis*, \otimes - *O. moojeni*, + - *O. nigripes*, \blacktriangle - *O. rupestris*, \square - *O. stramineus*, \blacklozenge - *O. utiaritensis*.

Tabela 3-3. Lista das amostras utilizadas para análises filogenéticas e populacionais utilizando *beta-fibin7*, especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil e todas as sequências são inéditas. n/d significa informação não disponível.

Espécie	Campo	Museu	Estado	Município
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CRB1430	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB1675	MN62640	Bahia	Jaborandi
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2788	n/d	Mato Grosso	São José do Xingú
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2793	n/d	Mato Grosso	São José do Xingú
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2823	n/d	Mato Grosso	São José do Xingú
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB2826	n/d	Mato Grosso	São José do Xingú
<i>Oligoryzomys microtis</i>	CRB1448	n/d	Tocantins	São Sebastião do Tocantins
<i>Oligoryzomys microtis</i>	CRB1450	n/d	Tocantins	São Sebastião do Tocantins
<i>Oligoryzomys microtis</i>	CRB1451	n/d	Tocantins	São Sebastião do Tocantins
<i>Oligoryzomys microtis</i>	CRB1452	n/d	Tocantins	São Sebastião do Tocantins
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS03	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS04	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS17	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS21	n/d	Rondônia	Alto Paraíso

Continuação da Tabela 3-3.

Espécie	Campo	Museu	Estado	Município
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS62	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS75	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS93	n/d	Rondônia	Alto Paraíso
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1022	MN50287	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1045	MN50315	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1053	MN50317	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1056	MN50319	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB1057	MN50320	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB875	MN50307	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB948	MN50309	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	LBCE11615	n/d	Goiás	Sítio D'Abadia
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	LBCE11648	n/d	Goiás	Sítio D'Abadia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1209	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1387	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1407	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1414	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1422	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1424	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1427	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1436	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1437	n/d	São Paulo	Pedreira
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1892	MN62096	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1902	n/d	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1909	MN62108	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1916	MN62113	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1927	MN62122	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1970	MN62150	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1979	MN62158	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1984	MN62158	Santa Catarina	Itá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1985	MN62159	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1986	n/d	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1990	MN62161	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1999	MN62165	Rio Grande do Sul	Aratiba
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10017	n/d	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10041	n/d	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10053	n/d	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10058	n/d	Paraná	General Carneiro
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10100	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10112	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10113	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10114	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10115	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10135	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE10136	n/d	Paraná	Paranaguá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6469	MN71984	Rio de Janeiro	Teresópolis
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8057	n/d	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8089	MN69934	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8091	n/d	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8092	MN69935	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8160	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8762	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8765	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8778	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8779	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8780	n/d	Goiás	Luziânia
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT298	n/d	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT302	n/d	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT303	n/d	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT322	n/d	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS169	n/d	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS191	n/d	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS195	n/d	Espírito Santo	Santa Teresa

Continuação da Tabela 3-3.

Espécie	Campo	Museu	Estado	Município
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS221	n/d	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS228	n/d	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1079	MN50322	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1110	MN50326	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1141	MN50286	Goiás	Alto Paraíso de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	CRB607	MN34439	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12159	MN75592	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12170	MN75593	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12173	MN75594	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12174	MN75595	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12184	MN75596	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12185	MN75597	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12529	MN75600	Mato Grosso	Peixoto de Azevedo
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12531	MN75601	Mato Grosso	Peixoto de Azevedo
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS288	MN75612	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS293	MN75613	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS299	MN75616	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS306	n/d	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS312	MN75619	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS327	MN75620	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS337	MN75622	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS357	n/d	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS398	MN75625	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	SVS399	MN75626	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis

* as espécies indicadas são resultado das conclusões tiradas de identificação morfológica, cariológica ou das análises filogenéticas deste trabalho.

3.1.4 Detecção de pseudogenes

Para a detecção de múltiplas cópias dos genes mitocondriais analisados neste trabalho, foram utilizadas duas técnicas: clonagem (item 3.6.1) e FISH (hibridização *in situ* por fluorescência; item 3.6.2). A Tabela 3-4 resume essas informações.

Tabela 3-4. Lista das amostras utilizadas para detecção de múltiplas cópias dos genes mitocondriais *ctb* e *coi*, especificando a espécie*, o número de campo, o número de museu, o número de clones analisados de *ctb* (C-*ctb*), o número de clones analisados de *coi* (C-*coi*) e a realização do FISH (marcado com X).

Espécie	Campo	Museu	C- <i>ctb</i>	C- <i>coi</i>	FISH
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	CRB733	n/d	4	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys microtis</i>	SVS04	n/d	4	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB875	MN50307	8	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	CRB948	MN50309	5	5	n/d
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	CRB1425	n/d	4	7	n/d
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LMT302	n/d	12	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE13642	n/d	n/d	n/d	X
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE14231	n/d	n/d	n/d	X
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1079	MN50322	7	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	CRB1110	MN50326	7	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	CRB691	MN46410	4	n/d	n/d
<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	LBCE12186	MN75598	n/d	3	n/d

* as espécies indicadas são resultado das conclusões tiradas de identificação morfológica, cariológica ou das análises filogenéticas deste trabalho.

3.1.5 Análises morfométricas

Para as análises morfométricas (item 3.5) foram utilizados 132 espécimes, sendo 12 de *O. fornesi*, 21 de *O. moojeni*, 47 de *O. nigripes*, 13 de *O. stramineus* e 39 de *O. utiaritensis*. A Figura 3-4 mostra os locais de coleta desses espécimes. A Tabela 3-5 sumariza as informações desses espécimes.



Figura 3-4. Mapa mostrando as localidades referentes aos espécimes utilizados nas análises morfométricas, indicando as paisagens morfoclimáticas brasileiras. As localidades de coleta estão indicadas na tabela 3-5. A barra de escala está em quilômetros. * - *O. fornesi*, ⊗ - *O. moojeni*, + - *O. nigripes*, □ - *O. stramineus*, ◆ - *O. utiaritensis*.

Tabela 3-5. Lista das amostras utilizadas para análises morfométricas, especificando a espécie*, o número de campo ou museu, o sexo, o estado e o município de origem. Todos os espécimes foram coletados no Brasil. n/d significa informação não disponível.

Espécie	Número	Sexo	Estado	Município
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10900	F	Goiás	Aporé
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE5450	n/d	Goiás	Aporé
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE9438	F	Goiás	Aporé
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10851	M	Goiás	Mambaí
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10852	M	Goiás	Mambaí
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10859	F	Goiás	Mambaí
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10880	n/d	Goiás	Mambaí
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE10885	n/d	Goiás	Mambaí
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE6789	M	Goiás	Serranópolis
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE6859	M	Goiás	Serranópolis
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE6862	M	Goiás	Serranópolis
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	LBCE8509	F	Goiás	Serranópolis
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50287	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50307	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50308	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50309	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50310	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50311	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50312	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50313	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50314	M	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50315	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50316	n/d	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50317	n/d	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50318	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50319	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50320	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN50321	F	Goiás	Cavalcante
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36220	M	Goiás	Colinas do Sul
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36357	M	Goiás	Colinas do Sul
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36426	M	Goiás	Colinas do Sul
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN37441	M	Goiás	Uruaçu
<i>Oligoryzomys moojeni</i>	MN36832	n/d	Goiás	Minaçu
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6922	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6910	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6911	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6949	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE6953	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7326	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7329	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7343	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7344	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7345	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE7346	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8093	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8096	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8098	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8100	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8103	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8108	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8109	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8115	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8160	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8923	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8926	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8928	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8934	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE8960	M	Santa Catarina	Jaborá

Continuação da Tabela 3-5.

Espécie	Número	Sexo	Estado	Município
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9607	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9718	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9721	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9722	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9786	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9791	M	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	LBCE9841	F	Santa Catarina	Jaborá
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS163	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS166	F	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS168	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS169	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS191	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS194	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS195	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS221	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS228	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS229	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS230	F	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS232	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS233	M	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS235	F	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SVS236	F	Espírito Santo	Santa Teresa
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	LBCE5220	F	Bahia	Curuçá
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN34439	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46409	n/d	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46411	n/d	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46412	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46413	F	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46414	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46417	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46421	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46429	F	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46430	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46433	M	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys stramineus</i>	MN46435	n/d	Goiás	Teresina de Goiás
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75603	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75604	M	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75605	M	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75606	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75608	M	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75609	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75610	M	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75611	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75612	M	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75613	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75614	F	Pará	Altamira (Castelo dos Sonhos)
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75631	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75634	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75635	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75636	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75640	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75644	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75653	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75654	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75656	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75658	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75660	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75667	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75669	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75616	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75618	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75619	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis

Continuação da Tabela 3-5.

Espécie	Número	Sexo	Estado	Município
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75621	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75622	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75623	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75624	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75625	F	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75626	M	Mato Grosso	Campo Novo do Parecis
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75590	M	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75591	F	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75592	F	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75593	M	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75596	F	Mato Grosso	Sapezal
<i>Oligoryzomys utiariensis</i>	MN75597	F	Mato Grosso	Sapezal

* as espécies indicadas são resultado das conclusões tiradas de identificação morfológica, cariológica ou das análises filogenéticas deste trabalho.

3.2 Métodos moleculares

3.2.1 Isolamento de ADN

O ADN foi isolado de amostras de fígado preservados em etanol 100%, tendo como base o protocolo padrão de extração via fenol-clorofórmio (Sambrook e Russell, 2001). A extração foi realizada utilizando os seguintes passos:

- Cortar o tecido com bisturi e acrescentar em um tubo de 1,5 mL 500 µL de tampão de lise (100 mM NaCl; 10 mM TRIS pH 7,5; 5 mM EDTA) + 50 µL de SDS 10% + 2 µL de RNase (20 mg/mL) + 5 µL de Proteinase XIV (20 mg/mL);
- Deixar agitando em temperatura ambiente *overnight* ou até o tecido estiver completamente dissolvido;
- Adicionar no mesmo tubo 500 µL de fenol, agitar e depois centrifugar por 10 min a 13200 rpm;
- Retirar o sobrenadante com uma pipeta e passar para outro tubo de 1,5 mL;
- Adicionar partes iguais de clorofórmio e fenol (250 µL de cada), agitar e centrifugar por 8 min a 13200 rpm;
- Retirar o fenol, que está na fase inferior, adicionar 500 µL de clorofórmio, agitar e centrifugar 8 min a 13200 rpm;
- Retirar o sobrenadante, passar para outro tubo de 1,5 mL e adicionar 1 mL etanol absoluto gelado;
- Centrifugar por 30 min a 13200 rpm;
- Descartar o etanol e adicionar 200 µL de etanol 70%;
- Centrifugar por 10 min a 13200 rpm;
- Descartar o etanol 70%, deixar secar e adicionar 10 a 100 µL de H₂O estéril;

- Deixar *overnight* em temperatura ambiente.
- Armazenar à -20°C .

Para verificar as condições, concentração e integridade do ADN, uma alíquota de 2 μl foi submetida a eletroforese em tampão NaOH (10 mM de NaOH e 45 mM de ácido bórico) em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio em uma concentração final de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ e observado em um transiluminador com luz ultravioleta.

3.2.2 Amplificação de *citb*

Um fragmento contendo a parte inicial de *citb* (801 pb) de *O. nigripes* foi amplificado utilizando os iniciadores L14724 (5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3'; Irwin *et al.*, 1991) e MVZ 16 (5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'; Smith e Patton, 1993). Um fragmento contendo *citb* completo (1140 pb) das outras espécies de *Oligoryzomys* foi amplificado utilizando os iniciadores L14724 e Citb-Rev (5'-GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG-3'; Casado *et al.*, 2010). Para maiores informações sobre os iniciadores utilizados para o *citb*, veja Figura 3-5. Para um total de 50 μL de reação foi adicionado ADN (de 250 μg a 1 μg), 10 mM de dNTPs, 10 μM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen™), tampão de amplificação (1x) e 4 mM de MgCl_2 . As reações foram submetidas a seguinte ciclagem, em um termociclador automático: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, pareamento a 55 a 58°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, e uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 7 min.

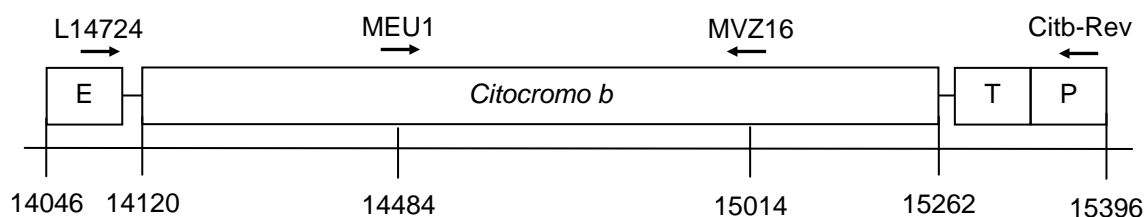


Figura 3-5. Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo, adaptado de Irwin *et al.* (1991). Maiores informações sobre a sequência dos iniciadores estão no texto. Retângulos representam o gene *citb* e a região que o flanqueia: os genes ARNt de Ácido Glutâmico (E), ARNt de Treonina (T) e ARNt de Prolina (P). Números estão de acordo com a mesma região no genoma do ADNmt de *Microtus levis* no GenBank (número de acesso: NC_008064).

Os produtos obtidos para esse e os outros marcadores moleculares foram verificados através de eletroforese em tampão NaOH (10 mM de NaOH e 45 mM de ácido bórico) em gel

de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em uma concentração final de 0,3 µg/ml e observado em um transiluminador com luz ultravioleta.

3.2.3 Amplificação de *coi*

Como não existe sequência completa de *coi* nem sequência completa do genoma mitocondrial de *Oligoryzomys*, iniciadores para amplificação e sequenciamento deste gene foram desenhados a partir do genoma mitocondrial completo disponível no GenBank de cinco espécies de Cricetideos: *Cricetulus griseus* (NC_007936), *Eothenomys chinensis* (NC_013571), *Mesocricetus auratus* (NC_013276), *Microtus kikuchii* (NC_003041), *Microtus levis* (NC_008064) e *Proedromys* sp. (NC_013563). Os iniciadores externos desenhados para amplificação foram: COI_Oligo_F (5'-GAAYTTGCAATTCGATRTGA-3') e COI_Oligo_R (5'-GGTTATGRWGYTGGCTTGAAA-3'), que amplificam a totalidade do gene, 1545 pb. Adicionalmente, foram desenhados iniciadores internos para sequenciamento: COI_in_F (5'-TCWGGGGCTCCAATTATY-3') e COI_in_R (5'-RATA ATTGGAGCCCCWGA-3'). As posições desses iniciadores estão indicadas na Figura 3-6.

Para um total de 50 µL de reação foi adicionado ADN (de 250 µg a 1 µg), 10 mM de dNTPs, 10 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen™), tampão de amplificação (1x) e 1,5 mM de MgCl₂. As reações foram submetidas a seguinte ciclagem, em um termociclador automático: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, pareamento a 50°C por 55 s e extensão a 72°C por 50 s, e uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min e uma extensão final a 72°C por 10 min.

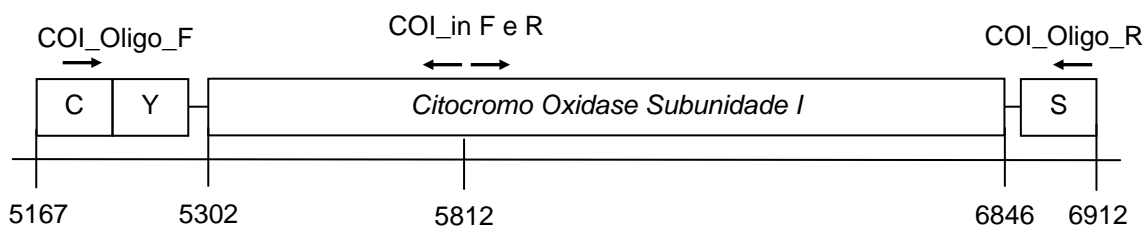


Figura 3-6. Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo. Maiores informações sobre a sequência dos iniciadores estão no texto. Retângulos representam o gene *coi* e a região que o flanqueia: os genes ARNt de Cisteína (C), ARNt de Tirosina (Y) e ARNt de Serina (S). Números estão de acordo com a mesma região no genoma do ADNmt de *Microtus levis* no GenBank (número de acesso: NC_008064).

3.2.4 Amplificação de *beta-fibint7*

O fragmento contendo o íntron 7 do gene nuclear beta-fibrinogênio (634 pb) foi amplificado utilizando os iniciadores β17-mammL (5' - CACAACGGCATGTTCTTCAGC

AC – 3') e β fib-mammU (5' – ACCCCAGTAGTATCTGCCGTTTGGATT – 3') (Matocq *et al.*, 2006). Para um total de 50 μ L de reação foi adicionado ADN (de 250 μ g a 1 μ g), 10 mM de dNTPs, 10 μ M de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen™), tampão de amplificação (1x) e 2 mM de MgCl₂. As reações foram submetidas a seguinte ciclagem, em um termociclador automático: 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 60°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, e uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e uma extensão final a 72°C por 7 min.

3.2.5 Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o conjunto de reagentes GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE™ Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em tampão NaOH (10 mM de NaOH e 45 mM de ácido bórico) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em uma concentração final de 0,3 μ g/mL e observado em um transiluminador com luz ultravioleta.

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems™) na Plataforma de Sequenciamento da Divisão de Genética (INCA) e na Plataforma Genômica do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS/FIOCRUZ). Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram:

- Para *citb*, os mesmos utilizados na amplificação, e os iniciadores internos MEU1 (5'–ACAACCATAGCAACAGCATTCGT–3'; Bonvicino e Moreira, 2001) para *O. nigripes*, e MVZ16 para *O. utiaritensis* e *O. moojeni*;
- Para *beta-fibint7*, os mesmo utilizados na amplificação;
- Para *coi*, os mesmos utilizados na amplificação, mais os iniciadores internos COI_in_F e COI_in_R.

Os eletroferogramas foram editados utilizando o programa ChromasPro 1.5 (McCarthy, 1998) e as sequências foram alinhadas manualmente utilizando o programa BioEdit 8.0 (Hall, 1999).

3.3 *Análises filogenéticas*

3.3.1 **Teste de saturação**

A partir de um determinado momento desde o tempo da divergência entre um par de sequências, as sequências não são mais informativas sobre como aconteceu a evolução entre elas. Depois desse ponto, essas sequências alcançam a saturação de substituições. Isso se deve ao acúmulo de múltiplas substituições por posição, levando a subestimação do número de substituições que realmente aconteceram (Philippe e Forterre, 1999). Uma forma simples de detectar esse problema é comparar a taxa de transição (s) e transversão (v) entre um par de sequências, levando em consideração que as transições são mais frequentes do que as transversões. Dessa forma, plotando o número observado de transições e transversões contra as distâncias genéticas corrigidas (ver próximo item), ambas as taxas devem aumentar com o aumento da divergência genética, com as transições sendo mais frequentes do que as transversões. Entretanto, após atingir a saturação, a taxa de transversão, apesar de menos frequente, pode ultrapassar a taxa de transição, pois existe um maior número possível de transversões (oito) do que de transições (quatro). Essa análise foi realizada com o programa DAMBE (*Data Analysis and Molecular Biology and Evolution*, versão 5.2; Xia e Xie, 2001).

3.3.2 **Distâncias moleculares e modelos de evolução molecular**

Como mostrado no item anterior, a simples observação entre o número observado de diferenças em cada sítio pode não representar a real diferença genética entre um par de sequências. Para isso, é necessário utilizar métodos estatísticos para inferir a distância genética esperada. Existem diversos tipos de distâncias genéticas disponíveis, e a diferença entre eles é basicamente o nível de complexidade esperada na evolução das sequências. Nesse trabalho, a distância genética Kimura 2-parâmetros (K2P; Kimura, 1980) foi utilizada. K2P corrige para múltiplas substituições na mesma posição levando em conta a diferença de frequência entre transições e transversões, assumindo que as frequências dos quatro nucleotídeos são as mesmas e que as taxas de substituições não variam entre as posições. Esse método parece inadequado para sequências codificantes mitocondriais, já que a composição de AT é maior do que de GC (Gibson *et al.*, 2005), e a taxa de substituição na terceira posição dos códons é mais provável devido às substituições sinônimas de aminoácidos. Porém, K2P pode ser considerado um método eficiente para avaliar a divergência genética entre grupos intimamente ligados (Tamura e Kumar, 2002). Além disso, como diversos trabalhos utilizam essa distância para *citb* em mamíferos (*e.g.*, Bradley e Baker, 2001; Smith e Patton, 1993;

Smith e Patton, 1999), para fins de comparação essa distância genética foi utilizada para os três marcadores moleculares analisados. As distâncias genéticas médias entre os espécimes da mesma espécie e a distância média entre as espécies (excluindo as distâncias médias dentro das espécies, utilizando a opção “*net distance*”) de *Oligoryzomys* foram estimadas no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*, versão 5.0; Tamura *et al.*, 2011).

Para os métodos filogenéticos, é necessário escolher um modelo de evolução molecular dos marcadores genéticos. Existem diversos modelos de substituição disponíveis, porém, devido à limitação de alguns programas, o modelo escolhido foi o GTR (*General Time Reversible*; Rodríguez *et al.*, 1990). O modelo GTR assume uma taxa diferente para cada uma das seis substituições possíveis de nucleotídeos e uma taxa diferente para a frequência de cada uma das quatro bases. Para corrigir a heterogeneidade de substituições sítio-específicas, o método mais comum é o uso da distribuição de probabilidades contínuas gama (Γ ; Yang, 1994), onde o parâmetro de forma (α) é o responsável pelo grau de heterogeneidade entre as taxas. Quando $\alpha < 1$, há indicação de grande variação entre as taxas. Como usar uma distribuição contínua é computacionalmente inviável, a distribuição Γ usada em análises moleculares assume uma distribuição discreta com um número finito de categorias onde dentro de cada uma delas as taxas são igualmente prováveis. Nesse trabalho, foram utilizadas oito categorias, contemplando um maior número de taxas, incluindo possíveis sítios invariáveis. Os parâmetros descritos anteriormente foram determinados pelo programa jModelTest (versão 0.1.1; Posada, 2008) para cada um dos três marcadores moleculares utilizados nesse estudo. Para os cálculos das distâncias, descritos no parágrafo anterior, também foi levado em consideração o valor de α .

3.3.3 Máxima Verossimilhança

O método de Máxima Verossimilhança (ML; Felsenstein, 1981) utiliza critérios estatísticos para estimar diferentes parâmetros, a fim de maximizar a probabilidade dos dados observados. No caso de sua aplicação para inferências filogenéticas, esse método considera a probabilidade que uma árvore filogenética seja criada a partir dos dados observados, dado um modelo evolucionário específico. Considerando $L(\tau, \theta) = \Pr(\text{dados} | \tau, \theta)$ como a função de verossimilhança da probabilidade condicional de obter as sequências, dada uma hipótese contendo τ (a árvore e seus tamanhos de ramo) e θ (os parâmetros do modelo de substituição), a ML procura a estimativa de máxima verossimilhança maximizando o valor dessa probabilidade. Porém, é inviável encontrar a melhor árvore no enorme espaço de todas as

topologias possíveis. Dessa forma, diversas heurísticas podem ser utilizadas para apresentar árvores mais adequadas.

Neste trabalho foram escolhidos dois programas para as análises ML por diferirem na heurística utilizada, além de permitirem utilizar métodos diferentes para o suporte dos ramos. O programa PhyML (versão 3.0; Guindon *et al.*, 2010) utiliza o método de heurística NNI (*nearest neighbor interchange*) e o suporte de ramos aRLT (*approximate likelihood-ratio test*; Anisimova e Gascuel, 2006). Já o programa RaxML (versão 7.2.7; Pfeiffer e Stamatakis, 2010) utiliza o método de heurística SPR-LSR (*subtree pruning and regrafting – lazy subtree rearrangement*) e o *bootstrap* (bs) para suporte de ramos (Felsenstein, 1985).

O programa PhyML foi executado a partir do servidor *South of France Bioinformatics Platform* (disponível em <http://www.atgc-montpellier.fr/>; Guindon e Gascuel, 2003) utilizando os seguintes parâmetros para todas as análises realizadas: modelo de substituição GTR, equilíbrio de frequências otimizado, proporção de sítios variáveis estimado, oito categorias de taxa de substituição, α estimado, árvore inicial BioNJ, tipo de melhora da árvore NNI, topologia e tamanhos de ramo otimizados, aLRT SH-like. O programa RaxML foi executado a partir do servidor CIPRES *Science Gateway* (disponível em <http://www.phylo.org>; Miller *et al.*, 2010) utilizando os seguintes parâmetros para todas as análises: utilização de GTRGAMMA para a fase de *bootstrap* e para a árvore final, 1000 interações de *bootstrap*, computação da árvore consenso através da regra da maioria estendida. As árvores foram visualizadas e editadas pelo programa FigTree (versão 1.3.1; Rambaut, 2009).

3.3.4 Inferência Bayesiana

O uso da inferência Bayesiana (BA) na filogenia é recente (Huelsenbeck *et al.*, 2001). A BA utiliza um conhecimento anterior (*prior*) para tirar conclusões sobre a probabilidade de um evento. Considerando $f(\tau, \theta) = f(\tau, \theta) \cdot f(\text{dados} | \tau, \theta)$ como a função de probabilidade posterior (pp) de obter τ e θ dadas as sequências disponíveis, a BA leva em consideração a distribuição de probabilidade do *prior* escolhido e a função de verossimilhança, vista no item anterior, para calcular a distribuição de probabilidade posterior. Em linhas gerais, a BA fornece a probabilidade de todos os valores possíveis de τ e θ depois que o *prior* foi atualizado com os dados disponíveis nas sequências.

Computacionalmente é inviável estimar a distribuição da probabilidade posterior, pois a maior parte da probabilidade posterior é provável de estar concentrada em uma pequena parte do vasto espaço de parâmetros. Para que essas regiões sejam vistas de forma eficiente, a

BA utiliza a amostragem pela cadeia Monte Carlo de Markov (MCMC) As cadeias de Markov são um conjunto de algoritmos para amostragem de funções de probabilidade posterior que possuem a propriedade de convergirem para um estado de equilíbrio, independente do estágio inicial de busca. Sua ideia central se baseia em fazer pequenas alterações aleatórias em um parâmetro, e depois aceitar ou rejeitar o novo estado baseado na razão da probabilidade posterior entre o estado inicial e o novo estado alterado. Se for permitido à cadeia executar um número suficiente de gerações, onde as pequenas alterações são feitas, o tempo que se gasta num intervalo específico, ou no valor, de um determinado parâmetro é proporcional à probabilidade posterior daquele intervalo ou valor. É a partir desse número de gerações que é calculado o valor de suporte dos ramos em uma topologia: a proporção de gerações em que a probabilidade de uma determinada topologia converge para uma mesma área do espaço de parâmetros determina a probabilidade posterior daquela topologia. Como a maioria dos problemas filogenéticos é complexa, utilizar apenas a MCMC pode ser ineficiente. Por esse motivo, a maioria dos programas que utilizam BA faz a MCMC em conjunto com o acoplamento de Metropolis, e esse método ficou conhecido como MCMCMC. Ele se baseia em amostragens simultâneas que utilizam diversas cadeias quentes para acelerar a eficiência da cadeia fria (que seria a cadeia principal).

Como a cadeia começa de uma árvore ao acaso, a verossimilhança inicial da cadeia é muito baixa. Quando a cadeia se move para regiões com a probabilidade posterior maior, a verossimilhança aumenta rapidamente. Essa fase inicial da MCMC é chamada *burn-in*, e é retirada da análise final. Quando a cadeia atinge uma distribuição estacionária, os valores de verossimilhança tendem a alcançar um platô, visível em um gráfico das gerações em relação à verossimilhança alcançada. Esse é o denominado gráfico dos *traces* e a visualização dele é importante para saber se as cadeias convergiram para a probabilidade posterior alvo.

Nesse trabalho, as inferências filogenéticas pelo método bayesiano foram feitas através do programa MrBayes (versão 3.1.2; Ronquist e Huelsenbeck, 2003), a partir do servidor CIPRES *Science Gateway*. A configuração padrão do programa foi utilizada em todas as análises, exceto pelos parâmetros a seguir: seis tipos de substituições, variação das taxas entre sítios gama, oito categorias da distribuição gama, 100.000.000 de gerações MCMC, duas corridas independentes com seis cadeias em cada, amostragem a cada 1.000 gerações, *burn-in* de árvores e parâmetros igual a 1.000. A qualidade das corridas foi avaliada pela convergência entre as corridas independentes (através dos gráficos de densidade marginal e dos *traces*), e pela verificação do ESS (tamanho amostral efetivo) de todos os parâmetros, realizados com o programa TRACER (versão 1.5; Rambaut e Drummond, 2007). ESS é uma

medida para avaliar a eficiência com que a MCMC amostra a distribuição posterior dos parâmetros, onde $ESS > 200$ indica estimativas mais acuradas.

As árvores foram visualizadas e editadas pelo programa FigTree (versão 1.3.1; Rambaut, 2009).

3.3.5 Relógio molecular

A mesma abordagem bayesiana pode ser aplicada para estimativas de tempos de divergências, entre outros diversos parâmetros, através do programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*; versão 1.6.1; Drummond e Rambaut, 2007), executado através do servidor CIPRES *Science Gateway*. Outros usos das análises através do BEAST serão apresentados no item 3.4.6. As estimativas dos tempos de divergência foram realizadas apenas com *citb*, e com apenas alguns indivíduos descritos em 3.1.1, além da adição de um grupo externo (ver abaixo). Foram utilizados 52 indivíduos, de 20 grupos encontrados na filogenia mostrada em 4.2 (Tabela 3-1). Buscou-se usar pelo menos dois indivíduos de cada grupo.

A calibração do relógio molecular foi feita de três formas. Primeiro, foi utilizado um *prior* de relógio molecular relaxado não correlacionado (Drummond *et al.*, 2006). No relógio relaxado não correlacionado, os diversos ramos podem apresentar ritmos de evolução diferente, e esse ritmo pode ser calculado independentemente através de uma distribuição dos valores de taxa de substituição de nucleotídeos. Primeiro, foi usada a taxa média de substituição para gêneros da subfamília Arvicolinae (que também fazem parte de Cricetidae) de 0,066 sítios por milhão de anos, indo de 0,038 a 0,093, aproximada para uma distribuição normal com o parâmetro forma 10 e o parâmetro escala 0,006 (parâmetro *uclid.mean* do BEAST; Weksler *et al.*, 2010). Segundo, utilizamos a informação de tempo de divergência o ancestral comum mais recente (tMRCA, um dos parâmetros calculados pelo BEAST) de *Rhipidomys* inferida através quatro marcadores moleculares nucleares (Steppan *et al.*, 2004). Para isso, foi adicionada uma sequência de *Rhipidomys macconnelli* (AF108681) e utilizada como *prior* uma distribuição normal de média 6,8 milhões de anos e desvio padrão de 0,73 de tMRCA da raiz da árvore. Terceiro, usamos a informação de datação fóssil de *O. longicaudatus*, que possui um grande registro fóssil (Pardiñas, 2008; Pardiñas *et al.*, 2002) comparado às outras espécies do gênero, considerando como *prior* de tMRCA desse grupo uma distribuição linear de limite superior 780 mil anos e limite inferior 110 mil anos.

As outras configurações para essa análise foram: separação de 20 grupos baseados na filogenia mostrada em 4.2.2; modelo de substituição nucleotídica GTR com oito categorias de

gama, frequências de bases estimadas, partição em posições dos códons, *prior* da árvore baseada no processo de especiação de Yule, árvore inicial gerada por UPGMA, otimização automática dos operadores, 200.000.000 cadeias de Markov, amostradas a cada 1.000 gerações.

A análise foi corrida duas vezes e depois checada para convergência da mesma forma descrita em 3.3.4. O programa TreeAnnotator foi utilizado para anotar as árvores com os valores da mediana e dos valores de 95% superior e inferior da estimativa de maior densidade posterior (HPD), juntamente com a probabilidade posterior dos cladogramas. O programa LogCombiner foi utilizado para combinar as estimativas dos parâmetros e das árvores das duas corridas independentes. Ambos os programas fazem parte do pacote BEAST.

3.4 Análises populacionais de *Oligoryzomys nigripes*

3.4.1 Definição das subpopulações e marcadores utilizados

Devido ao fato do marcador *beta-fibint7* apresentar distâncias interespecíficas baixas e, por consequência, apresentar uma diversidade nucleotídica e haplotípica baixa, para as análises intraespecíficas de *O. nigripes* foram utilizados apenas *coi* e *citb*. Para *citb* foram consideradas cinco subpopulações, baseadas nas diferentes localidades das amostras descritas em 3.1.1 (Tabela 3-6). Nem todas as sequências foram utilizadas, devido ao tamanho amostral pequeno em algumas localidades.

Tabela 3-6. Subpopulações de *O. nigripes* utilizadas para análises com *citb*. A localidade indica os municípios nos quais estão localizadas as subpopulações, e N indica o número de indivíduos de cada subpopulação. Os estados brasileiros são: Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

Subpopulação	Localidade	N
ES	Santa Teresa/ES	7
RJ	Nova Friburgo, Sumidouro e Teresópolis/RJ	10
SC	Itá e Jaborá/SC e Aratiba/RS	10
RS	São Francisco de Paula, Sapiranga, Torres, Tainhas e Cambará do Sul/RS	8
PAR	Paraguari, Itapuã e Neembuco, no Paraguai	3

Para *coi* foram consideradas sete subpopulações, baseadas nas diferentes localidades das amostras descritas em 3.1.2, considerando apenas localidades com mais de dois indivíduos amostrados (Tabela 3-7). Nem todas as sequências foram utilizadas, devido ao tamanho amostral pequeno em algumas localidades.

Tabela 3-7. Subpopulações de *O. nigripes* utilizadas para análises com *coi*. A localidade indica os municípios nos quais estão localizadas as subpopulações, e N indica o número de indivíduos de cada subpopulação. Os estados brasileiros são: Goiás (GO), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

Subpopulação	Localidade	N
GO	Luziânia/GO	6
ES	Santa Teresa/ES	5
RJ	Sumidouro, Nova Friburgo, Sapucaia e Teresópolis	18
SP	Pedreira/SP	5
PR	Paranaguá/PR	9
SC	Jaborá e Itá/SC, Aratiba/RS	13
RS	Cambará do Sul/RS	4

3.4.2 Diversidades nucleotídica e haplotípica e distâncias genéticas

Os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica são importantes índices de diversidade que avaliam o grau de polimorfismo de um marcador genético em uma população. A diversidade nucleotídica (π) é a probabilidade de duas posições homólogas escolhidas ao acaso serem diferentes. A diversidade haplotípica (h) é o equivalente a heterozigosidade de marcadores diplóides, e é definida como a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso serem diferentes. Ambos os valores foram estimados pelo programa Arlequin (versão 3.5; Excoffier e Lischer, 2010) para cada uma das subpopulações consideradas para os dois marcadores moleculares. Em todas as análises realizadas no programa Arlequin foram utilizados *coi* e *citb*, e foi utilizada a distância genética K2P, como descrita no item 3.3.2, e uma taxa de transição/transversão de 4,0 para os marcadores mitocondriais, valores esses estimados no programa MEGA (versão 5.0; Tamura *et al.*, 2011).

3.4.3 Índices de fixação e Análise molecular de variância

O índice de fixação F (Wright, 1922) é até hoje de grande importância e constitui uma das bases da genética de populações. Um dos principais efeitos da subdivisão de uma subpopulação é a redução da heterozigosidade observada (H), e essa redução foi formalizada por uma série de estatísticas F hierarquizadas: F_{IS} (a redução média da H em nível individual devido ao cruzamento não aleatório dentro de uma subpopulação – coeficiente de endocruzamento), F_{ST} (a redução média da H em uma subpopulação relativo a população total devido a deriva genética entre as subpopulações – índice de fixação) e F_{IT} (a redução média de H a nível individual em relação a população total – índice de fixação global). Esses índices

se relacionam diretamente com o tempo de divergência entre as subpopulações em número de gerações ou com o número de migrantes entre as subpopulações. Apesar das estatísticas F terem sido descritas para o uso com frequências alélicas, elas foram adaptadas para os dados de sequências nucleotídicas. No lugar de comparar H , compara-se π dentro e entre as subpopulações. Diversas adaptações foram feitas para esse tipo de dado, mas todos com o mesmo intuito. Nesse trabalho, foram utilizadas as estatísticas Φ (Excoffier *et al.*, 1992) implementadas pelo programa Arlequin (versão 3.5; Excoffier e Lischer, 2010), com a mesma interpretação dos resultados indicados por F (Wright, 1965): entre 0 e 0,05 como indicativo de pouca diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 como indicativo de diferenciação genética moderada, entre 0,15 e 0,25 como indicativo de uma grande diferenciação genética, e acima de 0,25 como indicativo de uma diferenciação genética extrema.

A análise de variância adaptada para dados moleculares (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), executada pelo programa Arlequin (versão 3.5; Excoffier e Lischer, 2010), é baseada nos índices Φ e testa uma estrutura genética particular, hierarquizando a variância total em componentes de covariação interindividuais e interpopulacionais. Dessa forma, a estatística Φ subdivide-se em: Φ_{CT} (correlação de haplótipos aleatórios entre grupos de subpopulações), Φ_{SC} (correlação de haplótipos aleatórios entre subpopulações de um mesmo grupo) e Φ_{ST} (correlação de haplótipos aleatórios entre todas as subpopulações, independente do grupo a qual pertence). A significância dos índices de fixação foi testada usando uma abordagem de permutação não paramétrica (10.000 permutações), consistindo na permutação de haplótipos, indivíduos ou populações, entre indivíduos, populações ou grupos de populações.

Para *citb* foram testados dois grupos de subpopulações (ES+RJ e PAR+SC+RS; Tabela 3-6). Para *coi* foi testado quatro grupos de subpopulações (GO1, ES+RJ, SP+PR e RS+SC; Tabela 3-7). Esses grupos foram escolhidos baseados na distância geográfica. Outros agrupamentos também foram testados previamente (não mostrado), porém todos levaram ao mesmo resultado.

3.4.4 Distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos

A distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos (*mismatch distribution*; Schneider e Excoffier, 1999), foi utilizada para estimar um possível evento demográfico passado. Geralmente essa distribuição é multimodal em amostras de populações que atingiram equilíbrio demográfico, refletindo os efeitos da deriva genética. Porém, essa distribuição é unimodal em populações que passaram por uma expansão demográfica recente

(Rogers e Harpending, 1992) ou por uma expansão geográfica com altos níveis de migração entre os demes vizinhos (Ray *et al.*, 2003). O gráfico dessa distribuição gerado para os dados observados foi comparado com simulações de expansão demográfica e expansão geográfica. Intervalos de confiança foram calculados baseados em 1000 réplicas de *bootstrap* e nível de significância de 0,05 usando o desvio da soma de quadrados entre as distribuições observadas e esperadas. Essas análises foram feitas no programa Arlequin (versão 3.5; Excoffier e Lischer, 2010), considerando todos os indivíduos como uma população, pois o número de indivíduos em cada subpopulação é muito pequeno.

3.4.5 Testes de neutralidade

Os testes de neutralidade seletiva distinguem uma sequência que evolui por deriva, ou seja, neutralmente, de sequências que evoluíram por outros processos que não o acaso. Esses processos, além de incluírem a seleção natural, podem levar em consideração alterações demográficas (Depaulis *et al.*, 2003), sem distinção entre eles. Se uma população está no equilíbrio deriva-mutação, é provável que essas populações tenham sofrido alterações demográficas recentes. Nesse trabalho foi utilizado o teste de Fu (F_s ; Fu, 1997), estimado pelo programa Arlequin (versão 3.5; Excoffier e Lischer, 2010). Um valor negativo indica um excesso de número de alelos, o que seria esperado de uma população em expansão ou seleção purificadora atuando no *locus*; já um valor positivo indica uma deficiência de alelos, o que é esperado de um gargalo populacional recente ou vantagem de heterozigotos. Se as variações são neutras (no sentido explicado acima) essas estatísticas serão indistinguíveis de zero. A significância dessas estatísticas (p) é testada através da geração de amostras ao acaso sobre a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio.

3.4.6 Coalescência

A teoria da coalescência relaciona os padrões de ancestralidade comum dentro de uma amostra de uma população com o tamanho e estrutura da população em geral (Kingman, 2000). Essa relação é resultado de uma ideia simples da genética de populações: quanto maior uma população, menor a probabilidade de se encontrar um par de indivíduos aparentados ao acaso. Dentre diversos programas que incorporam o conceito de coalescência em seus cálculos, dois foram escolhidos para esse trabalho: BEAST (versão 1.6.1; Drummond e

Rambaut, 2007) e LAMARC (*Likelihood Analysis with Metropolis Algorithm using Random Coalescence*; versão 2.0; Kuhner, 2006).

O programa BEAST pode calcular um extenso número de parâmetros a partir de sequências nucleotídicas, como introduzido no item 3.3.5. Para essas análises, foram acrescentadas sequências de *O. stramineus*, por ser grupo irmão de *O. nigripes* em todas as análises filogenéticas aqui realizadas, tanto com *citb* quanto com *coi* (ver resultados em 4.2.2 e 4.3.2). Boa parte das configurações já descritas no item 3.3.5 foi também utilizada nas análises a nível populacional. Para valores de *priors* de alguns parâmetros, resultados das análises descritas em 3.3.5 foram utilizados: taxa do relógio molecular relaxado e tempo até o ancestral comum mais recente de *O. nigripes* e *O. stramineus*. Para o *prior* da árvore, utilizando alguns resultados das análises populacionais tradicionais, foi escolhido o parâmetro “Coalescência: Crescimento por Expansão”. A partir daí três outros parâmetros foram calculados: tamanho populacional coalescente (θ), taxa de crescimento (g) e tamanho da população ancestral. O parâmetro tamanho populacional é definido por $\theta=2N_e\mu$ para dados mitocondriais, onde N_e é o tamanho populacional efetivo e μ é a taxa de mutação por geração. A taxa de crescimento é definida dentro da equação $\theta(t)=\theta_i e^{-gt}$, onde t indica o tempo que se passou (em gerações) em relação ao tamanho da população moderna (θ_i). Assim como θ , g é escalonado em relação à taxa de mutação por geração. Não é o intuito desse trabalho estimar números absolutos de θ , g e t , que aqui irão ser úteis para comparações entre as subpopulações definidas e entre os marcadores mitocondriais (assumindo que eles evoluem sob a mesma taxa). Por isso serão realizadas apenas comparações relativas de tamanho e taxa de crescimento populacional.

O programa LAMARC possui algumas vantagens para análises populacionais em relação ao BEAST. O único parâmetro que o BEAST calcula separadamente para as populações é tMRCA. Apesar do LAMARC não calcular esse parâmetro, ele calcula θ e g para cada uma das populações separadamente, além de calcular também a taxa de migração M (definida por $M=m/\mu$, onde m é a chance de uma linhagem migrar por geração) para todas as combinações possíveis par a par de populações. Apesar do LAMARC também poder utilizar o método bayesiano, nesse trabalho as inferências foram calculadas por máxima verossimilhança (também utilizando MCMC), o que torna possível a comparação dos mesmos parâmetros sob a ótica de métodos diferentes. As configurações do programa, para análise de ambos marcadores mitocondriais, foram: modelo GTR de substituição nucleotídica com oito categorias; 20 cadeias iniciais com 1.000 genealogias gravadas e *burn-in* 1.000; quatro cadeias finais com 100.000 genealogias gravadas e *burn-in* 1.000; quatro buscas simultâneas,

com uma cadeia fria e três quentes. As taxas de mutação e frequências das bases foram estimadas de acordo com o item 3.3.2.

3.4.7 Rede de haplótipos

Para detectar se existe alguma associação geográfica entre os haplótipos de *citb* e *coi* foi realizada uma análise de *median-joining* (MJ; Bandelt *et al.*, 1999). A MJ constrói uma rede de haplótipos, em um método que combina as técnicas de árvore de extensão mínima e máxima parcimônia. Além da relação entre os haplótipos existentes, a MJ também infere os chamados vetores médios, que podem representar haplótipos extintos ou não amostrados na população. Essa análise considera apenas os sítios invariáveis, e os sítios com ambiguidades foram excluídos.

Essa análise foi realizada no programa NETWORK (versão 4.6.1; Forster, 2010), utilizando todos os espécimes *O. nigripes* listados nas tabelas 3-1 e 3-2, para *citb* e *coi*, respectivamente.

3.5 Análises morfométricas

3.5.1 Medidas craniométricas

A fim de realizar comparações morfométricas entre espécies (descritas na Tabela 3-5) foram tiradas 17 medidas cranianas (Figura 3-7), baseadas em Bonvicino e Weksler (1998): GSL (comprimento máximo do crânio), CIL (comprimento do côndilo-incisivo), M1M (largura palatal tomada na parte externa dos alvéolos dos molares), LD (comprimento do diástema), PB (comprimento da ponte palatal), LIF (comprimento do forâmeme incisivo), BIF (largura do forâmeme incisivo), RL (comprimento do rosto), BRO (largura do rosto), CH (altura do crânio), BB (largura do crânio), LM (comprimento da série molar maxilar), BM1 (largura do primeiro molar maxilar), LIB (menor largura interorbital), ORL (comprimento orbital), ZB (largura do zigomático), BZP (largura da placa zigomática). Todas as medidas foram tomadas utilizando um paquímetro digital.

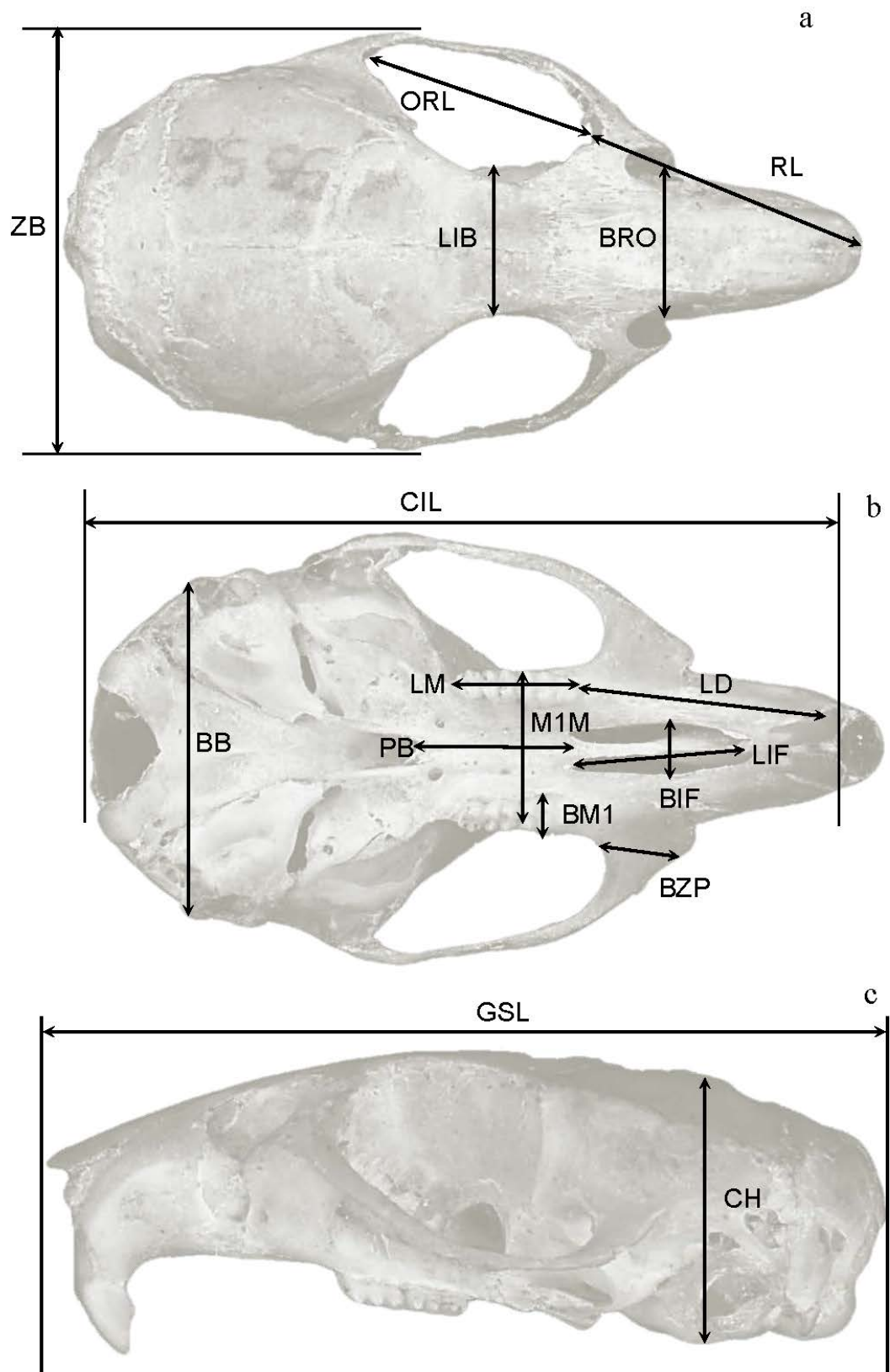


Figura 3-7. Visões (a) superior, (b) inferior e (c) lateral de um crânio de *Oligoryzomys*, indicando as 17 medidas cranianas utilizadas para as análises morfométricas.

Apenas animais com todas as medidas completas foram utilizados nas análises. Foram excluídos animais jovens (sem todos os dentes nascidos e funcionais). Todas as análises descritas nos itens a seguir foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (versão 7.0; StatSoft, 2004), e o valor de significância para todos os teste foi de 0,05.

3.5.2 Detecção de dimorfismo sexual

A verificação da presença de dimorfismo sexual entre as medidas cranianas é importante para o planejamento de como fazer as análises: machos e fêmeas separadamente ou juntos. Para isso foi realizado um teste *t* independente agrupando por sexo, para cada uma das espécies analisadas. Além do valor de *t*, gráficos de *Box & Whisker* para cada variável também foram utilizados para comparação.

3.5.3 Estatísticas básicas e análise de variância

As estatísticas descritivas aferidas foram média, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão. Também foi verificado se todas as variáveis se encaixavam em uma distribuição normal, um pré-requisito para várias análises.

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) simples para comparar se há diferença entre as médias das variáveis nas diferentes espécies (Sokal e Rohlf, 1994). Apesar do teste *t* também comparar médias, em casos onde há mais de dois grupos a ANOVA diminui a chance de cometer um erro do tipo I. Uma vez detectada diferença entre as médias, pode-se conhecer quais são as variáveis que causam essas diferenças, aplicando o teste *post hoc* LSD de Fisher (*Least Significant Difference*).

3.5.4 Análises multivariadas

As análises multivariadas permitem a análise simultânea das várias medidas de cada indivíduo. Dessa maneira, é possível descrever o padrão da variação morfológica, cujo papel pode ser de grande importância para descrever as relações filogenéticas entre grupos. Os métodos multivariados mais utilizados em morfometria são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante (Reis, 1988). Nesse tipo de análise, é necessário uniformizar as variáveis, para que algumas variáveis (principalmente as de maior valor) não

dominem a covariância existente (Sokal e Rohlf, 1994). Para isso, todos os valores foram transformados em logaritmos naturais (\ln).

O padrão de discriminação entre espécies pode ser examinado por meio da análise das funções discriminantes com variáveis canônicas (Strauss, 2010). Como os grupos precisam ser definidos *a priori*, podemos utilizar o resultado da ANOVA para verificar se é relevante ou não realizar essa análise. Para visualizar como cada função discriminante contribui para a discriminação dos grupos foram feitos gráficos de dispersão dos escores canônicos para os pares de funções canônicas (raiz canônica), com elipses de 95% de intervalo ao redor dos dados.

A PCA para estudos morfométricos utiliza a matriz de covariâncias entre as variáveis, transformando-as em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, os componentes principais (Sokal e Rohlf, 1994). De um modo geral, o primeiro componente principal pode ser relacionado com o tamanho, e os componentes subsequentes com a forma (Reis, 1988). As diferenças entre forma e tamanho tem papel crucial na diferenciação morfométrica entre os grupos (Creighton e Strauss, 1986). Para visualizar como cada componente principal contribui para a separação dos grupos foram feitos gráficos de dispersão entre os escores das componentes principais (CP) que explicam a maior parte da variação dos dados (1 e 2), com elipses de 95% de intervalo ao redor dos centróides. Além disso, o gráfico das correlações entre as 17 variáveis e as componentes principais 1 e 2 foi analisado para entender como cada variável se comporta: se ela refere-se a variação de forma ou tamanho.

3.6 Detecção de pseudogenes mitocondriais

3.6.1 Clonagem

Para avaliar quantos possíveis haplótipos diferentes dos genes mitocondriais havia em cada indivíduo (ver Tabela 3-4 para a quantidade de espécies e indivíduos analisado para cada gene mitocondrial), foi utilizada a técnica de clonagem molecular. Produtos de PCR amplificados como descritos em 3.2.2 e 3.2.3 foram utilizados para clonagem no conjunto de reagentes TOPO TA Cloning® (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. Tanto as células competentes quanto o meio líquido para transformação também foram provenientes do conjunto de reagentes.

Após a clonagem, pelo menos dez colônias de cada reação foram verificadas para presença do inserto através de PCR, utilizando os iniciadores M13F (5' – GTAAAACGACG GCCAG – 3') e M13R (5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'). Para um total de 50 μ L de

reação foi adicionado uma colônia, 10 mM de dNTPs, 10 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen™), tampão de amplificação (1x) e 1,5 mM de MgCl₂. As reações foram submetidas a seguinte ciclagem, em um termociclador automático: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, e uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e uma extensão final a 72°C por 7 min. As etapas subsequentes foram feitas de acordo com o item 3.2.5, e o sequenciamento foi realizado com os mesmo iniciadores da amplificação.

A taxa de erro da Taq polimerase é, no mínimo, uma substituição a cada 9.000 nucleotídeos polimerizados, e uma deleção/inserção em 41.000 nucleotídeos polimerizados, (Tindall e Kunkel, 1988). Embora seja extremamente difícil calcular um valor esperado final de quantas mutações são resultados de erro da Taq polimerase, existem duas informações importantes a serem consideradas: aproximadamente 70% das mutações são transições, e essa diferença entre transições e transversões se deve ao fato de aproximadamente 56% das mutações serem T↔C, enquanto que todas as outras mutações ocorrem na mesma frequências (Tindall e Kunkel, 1988).

O programa DAMBE (*Data Analysis and Molecular Biology and Evolution*, versão 5.2; Xia e Xie, 2001) foi utilizado para estimar a matriz de substituição, verificar quantidade de diferenças entre as sequências, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, assim como distâncias genéticas entre os grupos. As análises filogenéticas foram realizadas de acordo com os itens 3.3.3 e 3.3.4, utilizando apenas algumas das sequências descritas nos itens 3.1.1 e 3.1.2: 80 para *citb* e 50 para *coi*, sempre utilizando pelo menos dois indivíduos de cada grupo encontrado nas análises filogenéticas mostradas em 4.2.2 e 4.3.2.

3.6.2 Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

A fim de avaliar a possível presença de cópias do gene mitocondrial *citb* no genoma nuclear, foi realizada uma hibridização *in situ* por fluorescência (Langer-Safer *et al.*, 1982). O FISH é uma técnica muito utilizada para detectar diversos tipos de aberrações cromossômicas e presença ou ausência de sequências específicas nos cromossomos através de sondas marcadas com fluorocromos. Nesse trabalho, a sonda para *citb* foi sintetizada através da técnica de *nick translation* (Rigby *et al.*, 1977), onde a ação conjunta de DNase I e DNA polimerase I faz com que sejam incorporados dUTPs marcados nas sequências alvo.

Para a realização do *nick translation* utilizou-se como sequência alvo um plasmídeo contendo um trecho de *citb*, clonado como descrito no item anterior, e o plasmídeo pDa2 (Silva *et al.*, 1995), que contém um trecho do ADNr 28S de *Didelphis* e pode ser usado como

controle positivo da marcação do FISH. Ambos os plasmídeos foram purificados utilizando o conjunto de reagentes QIAfilter® Plasmid Midi Purification (QIAGEN®), seguindo as instruções do fabricante.

Após a purificação, foi utilizado o conjunto de reagentes Nick Translation System (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante, e a reação foi realizada com 1µg dos plasmídeos e dUTP marcado com fluoresceína para *citb* e dUTP marcado com rodamina para ADNr. Após a checagem do sucesso da reação através de gel de agarose 0,8%, a reação foi precipitada a 1000 rpm por 30 min a 4°C e os produtos ressuspensos em 10 µL de tampão de hibridização (50% formamida, 10% dextran sulfato e 2x SSC pH 7).

Os cromossomos e núcleos metafásicos foram obtidos através de cultura de curto prazo de medula femoral, seguindo o seguinte protocolo:

- Incubadas por duas horas a 37°C em tubos de 15 mL contendo meio estéril (80% RPMI, 20% soro fetal bovino, 5 µg/mL de brometo de etídio e 10⁻⁶ M de colchicina);
- Centrifugar por 10 min e descartar o sobrenadante;
- Adicionar 10 mL de KCl (0,075 M) e deixar 30 min a 37°C;
- Adicionar 2 mL de Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético glacial);
- Centrifugar por 10 min, descartar o sobrenadante e repetir o processo;
- Armazenas a -20°C até o uso;
- No dia de iniciar o FISH, centrifugar as células por 15 min, descartar o sobrenadante;
- Adicionar 1 mL de Carnoy e pingar uma gota em lâmina lavada previamente e deixada em solução de metanol 70%;
- Flambar a lâmina cuidadosamente;
- Seguir o FISH, cujo protocolo completo está no Anexo I.

Capítulo 4

Resultados

4 - Resultados

4.1 Distâncias genéticas

As distâncias genéticas K2P foram inferidas entre as espécies e entre os indivíduos de uma mesma espécie. Para *citb*, as distâncias médias entre as espécies variaram de 1,8% entre *O. flavescens* e *O. andinus* até 18,7% entre *O. destructor* e *O. fulvescens*. Já as distâncias médias entre indivíduos da mesma espécie variaram de 9,1% em *Oligoryzomys* sp. 2 a 0,1% em *O. destructor*. A Tabela 4-1 sumariza esses dados.

Para *coi*, as distâncias médias entre as espécies variaram de 6,2% entre *O. nigripes* e *O. stramineus*, até 27,5% entre *O. fornesi* e *O. utiaritensis*. Já as distâncias médias entre indivíduos da mesma espécie variaram de 0% em *O. stramineus* e *O. rupestris* até 2,1% em *O. fornesi*. A Tabela 4-2 sumariza esses dados.

Para *beta-fibint7*, as distâncias médias entre as espécies variaram de 0,4% entre *O. fornesi* e *O. microtis* até 5,3% entre *O. flavescens* e *O. stramineus*. Já as distâncias médias entre indivíduos da mesma espécie variaram de 0% em *O. rupestris* até 1,58% em *O. flavescens*. A Tabela 4-3 sumariza esses dados.

Tabela 4-1. Distâncias genéticas K2P de *citb* entre espécies de *Oligoryzomys*. Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 - <i>O. andinus</i>	3,2																				
2 - <i>O. chacoensis</i>	9,7	5,1																			
3 - <i>O. costaricensis</i>	11,0	12,3	2,0																		
4 - <i>O. delicatus</i>	10,8	11,1	9,7	2,1																	
5 - <i>O. destructor</i>	13,3	15,0	13,3	12,3	0,1																
6 - <i>O. flavescens</i>	1,8	9,0	9,5	9,8	13,8	3,0															
7 - <i>O. fornesi</i>	16,4	15,0	14,5	17,6	16,7	16,7	1,9														
8 - <i>O. fulvescens</i>	14,5	12,5	14,0	9,8	18,7	14,3	13,6	1,8													
9 - <i>O. longicaudatus</i>	3,7	9,8	10,6	9,3	15,1	3,6	17,3	12,6	1												
10 - <i>O. messorius</i>	10,9	10,7	12,1	11,2	14,9	10,7	17,0	15,3	12,8	n/d											
11 - <i>O. microtis</i>	14,1	13,2	16,0	12,1	16,7	13,3	13,9	14,5	14,2	16,4	6,9										
12 - <i>O. moojeni</i>	10,4	9,1	10,3	6,6	11,4	9,9	14,0	12,2	10,4	11,2	9,9	2,9									
13 - <i>O. nigripes</i>	12,2	8,8	12,2	9,1	15,6	11,1	17,0	12,6	9,6	12,7	14,4	9,8	1,0								
14 - <i>O. rupestris</i>	10,8	11,0	11,7	6,3	9,9	9,9	17,3	11,8	10,2	11,5	12,4	7,5	9,2	3,9							
15 - <i>Oligoryzomys</i> sp. 1	14,0	14,6	13,4	8,2	14,4	14,1	17,8	14,8	15,6	14,4	15,9	9,6	13,5	8,9	0,6						
16 - <i>Oligoryzomys</i> sp. 2	11,9	10,6	12,3	13,9	16,1	11,8	16,1	13,6	14,5	14,7	13,7	11,2	15,9	12,3	15,5	9,1					
17 - <i>Oligoryzomys</i> sp. 3	11,6	11,7	13,6	12,8	15,0	13,1	14,0	12,4	15,0	15,4	13,2	8,5	14,4	10,2	14,8	5,6	1,0				
18 - <i>Oligoryzomys</i> sp. 4	3,3	9,5	11,0	11,5	15,4	2,3	18,6	15,6	4,9	11,2	13,7	11,8	11,1	10,5	16,7	14,3	14,5	n/d			
19 - <i>O. stramineus</i>	10,2	7,7	12,5	11,0	14,0	9,7	16,7	12,5	10,6	12,2	14,3	9,0	6,5	10,0	15,2	11,1	12,1	11,3	0,2		
20 - <i>O. utiaritensis</i>	13,2	14,3	14,3	7,7	13,7	12,9	17,0	14,8	12,5	15,6	13,1	7,1	13,4	8,1	9,3	16,2	13,6	15,0	12,5	0,5	
21 - <i>O. vegetus</i>	14,2	11,8	10,8	11,3	16,3	13,3	14,0	10,1	14,7	13,4	13,2	10,0	12,2	11,5	14,0	13,5	12,3	14,7	11,7	14,0	0,7

Tabela 4-2. Distâncias genéticas K2P de *coi* entre espécies de *Oligoryzomys*. Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 - <i>O. flavescens</i>	1,1							
2 - <i>O. fornesi</i>	21,0	2,1						
3 - <i>O. microtis</i>	21,4	19,4	n/d					
4 - <i>O. moojeni</i>	14,4	23,3	24,7	0,4				
5 - <i>O. nigripes</i>	15,0	22,3	19,5	18,1	0,8			
6 - <i>O. rupestris</i>	17,6	22,9	24,4	14,6	18,4	0,0		
7 - <i>O. stramineus</i>	17,0	24,0	20,3	18,2	6,2	17,0	0,0	
8 - <i>O. utiaritensis</i>	17,0	27,5	22,5	6,8	18,5	14,9	18,7	1,1

Tabela 4-3. Distâncias genéticas K2P de *beta-fibini7* entre espécies de *Oligoryzomys*. Na diagonal inferior estão as distâncias médias entre os grupos, e em cinza as distâncias médias dentro dos grupos. Os valores estão em porcentagem. n/a – não aplicável.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 - <i>O. flavescens</i>	1,58							
2 - <i>O. fornesi</i>	1,47	n/d						
3 - <i>O. microtis</i>	1,54	0,37	0,40					
4 - <i>O. moojeni</i>	2,17	2,14	2,36	0,03				
5 - <i>O. nigripes</i>	1,50	1,73	1,67	2,58	0,03			
6 - <i>O. rupestris</i>	3,32	3,33	3,27	1,37	2,84	0,00		
7 - <i>O. stramineus</i>	5,28	4,67	5,05	4,74	2,59	5,09	n/d	
8 - <i>O. utiaritensis</i>	0,98	1,88	2,05	1,41	1,77	2,74	4,34	0,05

4.2 Análises filogenéticas com *citb*

4.2.1 Características das sequências

Foram encontrados 583 sítios variáveis e 210 haplótipos (considerando sítios ambíguos) entre as 210 sequências de *citb* (Tabela 3-1) utilizadas. O modelo de evolução molecular escolhido, para todas as análises filogenéticas, foi GTR+ Γ . Os parâmetros estimados foram: frequências das bases (A=0,3345; C=0,3499 ; G=0,0531; T=0,2626), taxas de mutação (A-C=0,4857; A-G=8,0668; A-T=0,6527; C-G=0,9486; C-T=4,4217; G-T=1) e α (0,28). A proporção s/v estimada é de 4,07. A Figura 4-1 mostra que, considerando todas as posições, as sequências saturam a partir da distância genética de aproximadamente 18%.

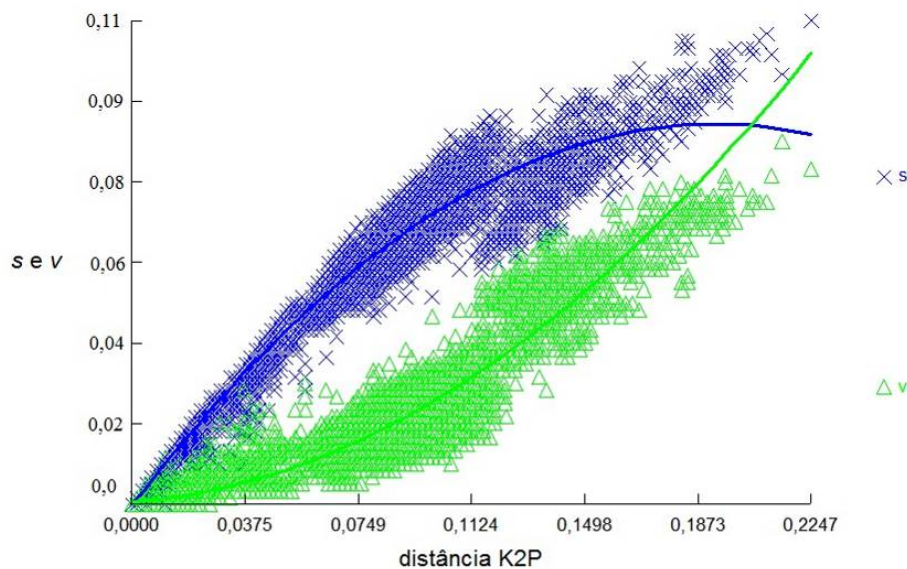


Figura 4-1. Gráficos das taxas de transição e transversão (*s* e *v*) versus distância genética K2P de *citb*.

4.2.2 ML e BA

As árvores construídas por ML e por BA apresentam topologia similar na monofilia de *Oligoryzomys* e nos ramos terminais, com diferenças no arranjo interno, discutidas nas páginas seguintes. As Figura 4-2 e 4-3 mostram as topologias da ML e BA, respectivamente. A Tabela 4-4 mostra os valores de aRLT, *bootstrap* (bs) e probabilidade posterior (pp) dos principais grupos encontrados e de todas as espécies.

Tabela 4-4. Valores de aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de *Oligoryzomys* para o gene *citb*. Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-2.

Grupo	aLRT	bs	pp
<i>Oligoryzomys</i>	1	98	1
<i>O. microtis</i>	0,92	93	1
<i>O. fornesi</i> + vermelho + amarelo + verde + roxo + marrom	0,64	98	0,53
<i>O. fornesi</i>	1	96	1
vermelho + amarelo + verde + roxo + marrom	0,86	98	0,57
vermelho	0,99	98	1
<i>Oligoryzomys</i> sp. 2	1	98	1
<i>Oligoryzomys</i> sp. 3	0,88	88	1
amarelo + verde + roxo + marrom	0,89	93	0,55
amarelo	0,81	87	0,97
<i>O. costaricensis</i>	1	87	1
<i>O. vegetus</i> + <i>O. fulvescens</i>	0,9	89	0,97
<i>O. vegetus</i>	1	89	1
<i>O. fulvescens</i>	1	89	1
verde + roxo + marrom	0,73	91	0,55
<i>O. messorius</i> + verde	<0,5	90	<0,5
verde	0,93	81	0,87
<i>O. destructor</i> + <i>O. rupestris</i>	<0,5	77	0,78
<i>O. destructor</i>	1	77	1
<i>O. rupestris</i>	0,99	87	1
<i>Oligoryzomys</i> sp. 1+ <i>O. delicatus</i>	<0,5	75	<0,5
<i>Oligoryzomys</i> sp. 1	1	74	1
<i>O. delicatus</i>	1	78	1
<i>O. moojeni</i> + <i>O. utiaritensis</i>	0,98	89	0,87
<i>O. moojeni</i>	1	87	1
MN36426 + MN50307 + <i>O. utiaritensis</i>	0,93	76	0,99
<i>O. utiaritensis</i>	1	87	1
roxo + marrom	0,86	99	0,58
roxo	0,78	89	<0,5
<i>O. chacoensis</i>	0,91	95	0,62
<i>O. longicaudatus</i> + <i>O. andinus</i> + <i>Oligoryzomys</i> sp. 4 + <i>O. flavescens</i>	1	89	1
<i>O. longicaudatus</i>	1	89	1
<i>O. andinus</i> + <i>Oligoryzomys</i> sp. 4 + <i>O. flavescens</i>	0,94	80	1
<i>O. andinus</i>	0,98	80	0,5
<i>Oligoryzomys</i> sp. 4 + <i>O. flavescens</i>	0,87	85	<0,5
<i>O. flavescens</i>	0,86	88	<0,5
<i>O. flavescens</i> var1	0,89	80	0,5
<i>O. flavescens</i> var2	0,96	86	1
<i>O. flavescens</i> var3	0,82	86	1
<i>O. flavescens</i> var4	0,99	97	0,87
marrom	1	99	1
<i>O. stramineus</i>	1	99	1
<i>O. nigripes</i>	1	98	1

Grupos externos

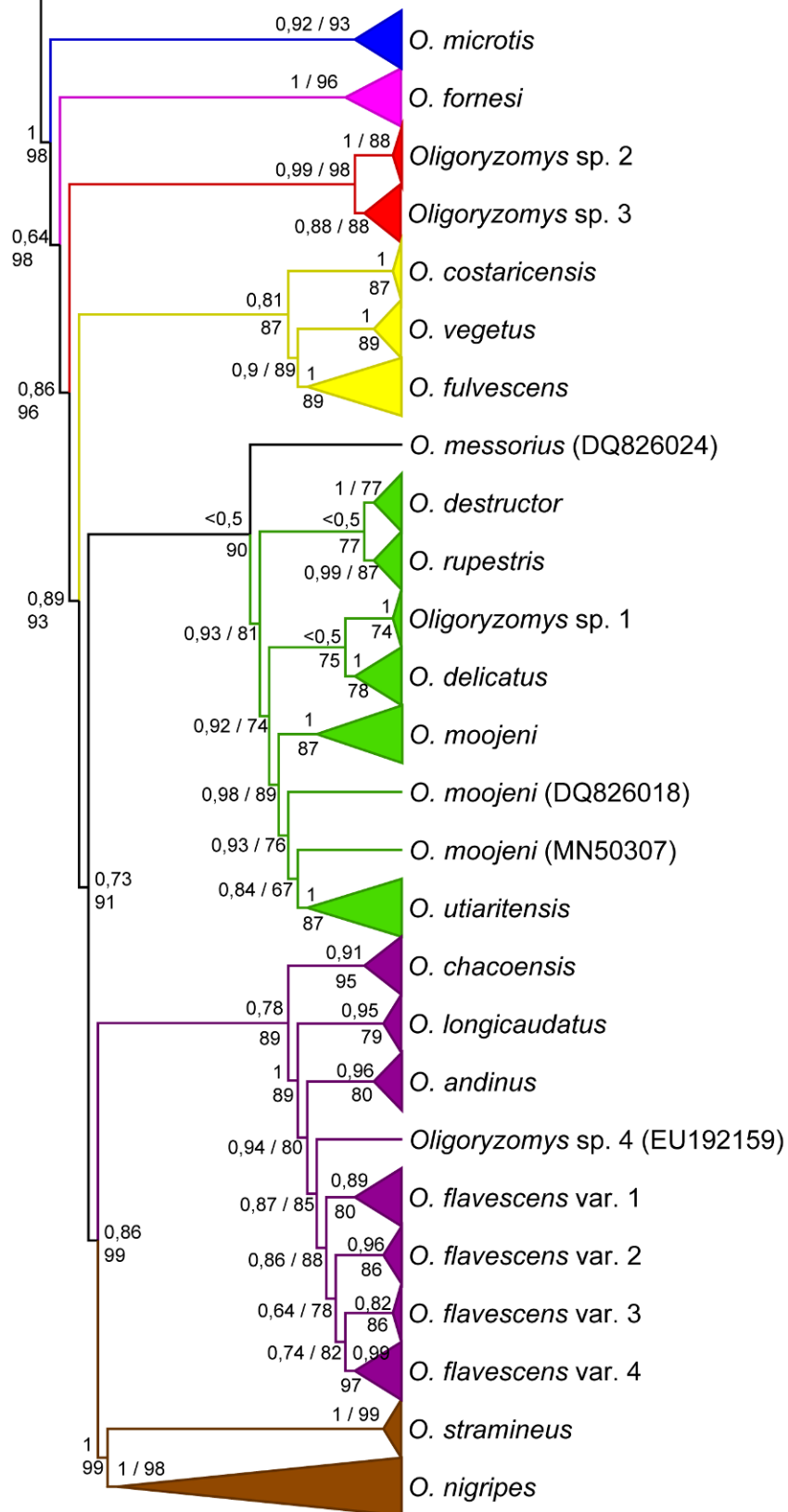


Figura 4-2. Árvore de ML de *citb* com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores. Acima dos nós são os valores de aLRT, e abaixo os valores de *bootstrap*. Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de *bootstrap* acima de 50 foram considerados.

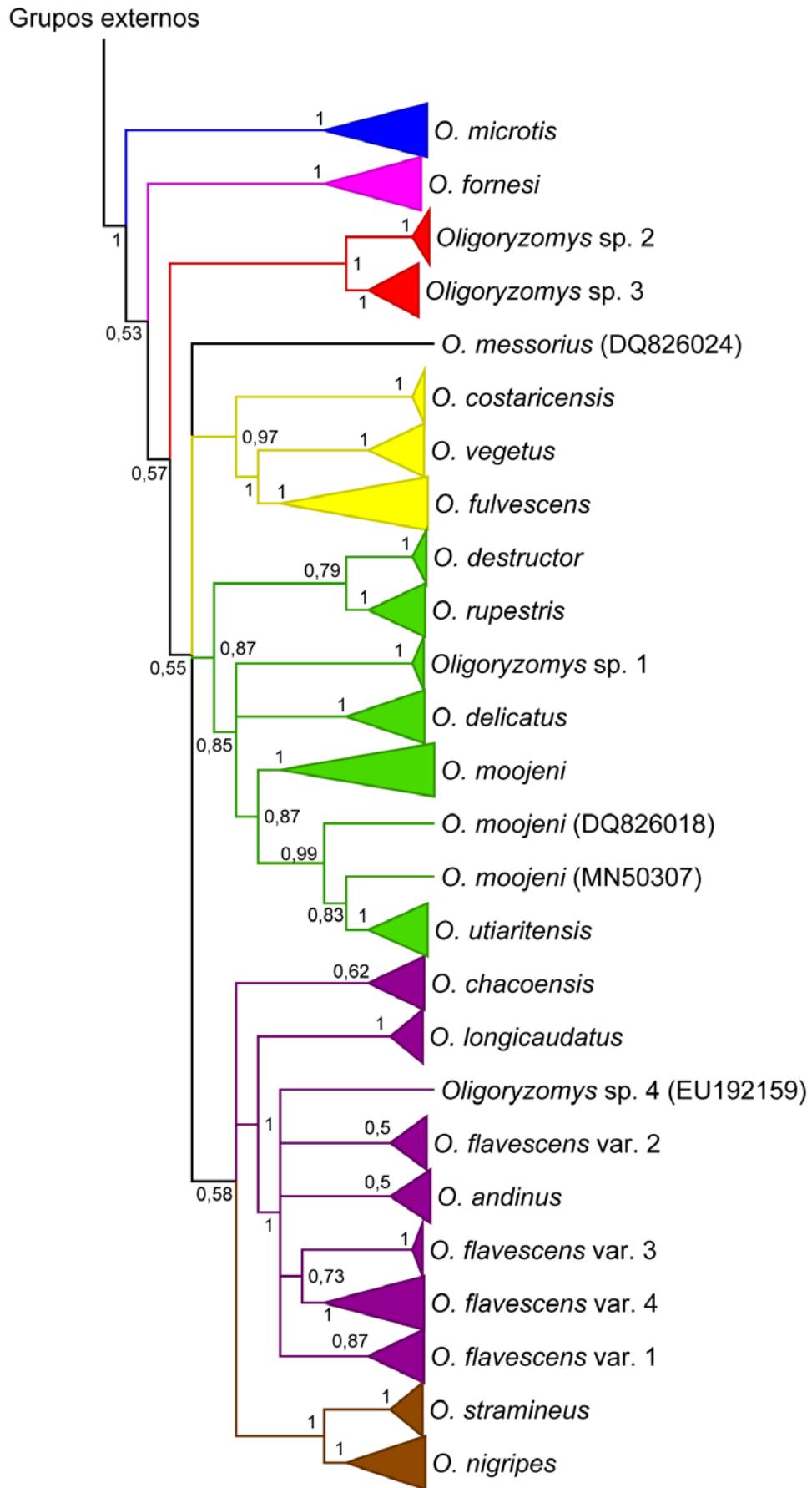


Figura 4-3. Árvore de BA de *citb* com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores. Os valores próximos aos nós são valores acima de 0,5 de probabilidade posterior.

Em todas as análises, *Oligoryzomys* é um grupo monofilético com alto suporte (aLRT=1, bs=98, pp=1), e a maioria das espécies aparece como monofilética, exceto *O. moojeni* e *O. flavescens*. Alguns nomes utilizados para as espécies consideradas nas árvores não são os mesmos do GenBank, e essas incongruências serão discutidas mais adiante.

Oligoryzomys microtis é a primeira linhagem a se diferenciar, seguida por *O. fornesi* (aLRT=0,64, bs=98, pp=0,53), porém esta última posição não possui um suporte alto na maioria das análises. Em seguida aparece o grupo vermelho composto por *Oligoryzomys* sp. 2 e *Oligoryzomys* sp. 3 (aLRT=0,53, bs=98, pp=0,57); depois aparece os outros cinco grupos de espécies: *messorius*, amarelo, verde, roxo e marrom, com o amarelo (aLRT=0,89, bs=93, pp<0,5), como grupo irmão dos outros, composto pelo verde + *O. messorius* (aLRT=0,73, bs=91, pp<0,5), e por último roxo e marrom juntos (aLRT=0,86, bs=99, pp=0,58). Pode-se perceber que a topologia do grupo “amarelo, verde, roxo e marrom” não é suportada pela BA. Outra observação importante é que a espécie *O. messorius* apresenta posições diferentes entre ML e BA, e mesmo assim com suporte baixo em ambas. Por esse motivo *O. messorius* foi considerada com posição indefinida.

O grupo amarelo, fortemente suportado, é composto por *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens* (aLRT=0,81, bs=87, pp=0,97), com *O. vegetus* e *O. fulvescens* mais próximas entre si (aLRT=0,9, bs=89, pp=0,97).

O grupo verde, fortemente suportado, é composto por *O. destructor*, *O. rupestris*, *Oligoryzomys* sp. 1, *O. delicatus*, *O. moojeni* e *O. utiaritensis* (aLRT=0,93, bs=81, pp=0,97), com diversos subgrupos: *O. destructor* e *O. rupestris* (aLRT<0,5, bs=77, pp=0,78), *Oligoryzomys* sp. 1 e *O. delicatus* (aLRT<0,5, bs=75; pp<0,5; portanto sem definição), *O. moojeni* e *O. utiaritensis* (aLRT=0,98, bs=89, pp=0,87). Importante notar é que *O. moojeni* não é reciprocamente monofilética em relação à *O. utiaritensis*, com dois indivíduos (MN36426 e MN50307) sendo mais relacionados com *O. utiaritensis* (aLRT=0,93, bs=76, pp=0,99). Essa relação será discutida exaustivamente em itens subsequentes.

O grupo roxo é composto por *O. chacoensis*, *O. longicaudatus*, *O. andinus*, *Oligoryzomys* sp. 4 e *O. flavescens* (aLRT=0,78, bs=89, pp<0,5), com *O. chacoensis* a espécie com primeira diferenciação (aLRT=1, bs=89, pp=1), seguido por *O. longicaudatus* (aLRT=0,94, bs=80, pp=1), *O. andinus* (aLRT=0,87, bs=85, pp<0,5), *Oligoryzomys* sp. B (aLRT=0,86, bs=88, pp<0,5, aqui definido como *Oligoryzomys* sp. 4), e *O. flavescens*. A inclusão de *O. chacoensis* no grupo roxo é suportada apenas na ML. Percebe-se que a relação entre *Oligoryzomys* sp. 4, *O. andinus*, *O. flavescens* e suas diversas linhagens também não é suportada pela BA. Além disso, analisando a BA e ML, *O. flavescens* possui pelo menos quatro linhagens diferentes. Essas relações serão discutidas adiante.

O grupo marrom é composto por *O. stramineus* e *O. nigripes* (aLRT=1, bs=99, pp=1).

A seguir as relações intraespecíficas serão detalhadas, e as definições do nome utilizado para as sequências do GenBank explicadas. A Figura 4-4 mostra *O. microtis* e *O. fornesi* monofiléticas (aLRT=0,92, bs=93, pp=1 e aLRT=1, bs=96, pp=1, respectivamente). O indivíduo RGR280, identificado como *Oligoryzomys* sp., faz parte do complexo de espécies *O. microtis*, com pelo menos três linhagens diferentes. *Oligoryzomys fornesi* também apresentou estruturação filogenética.

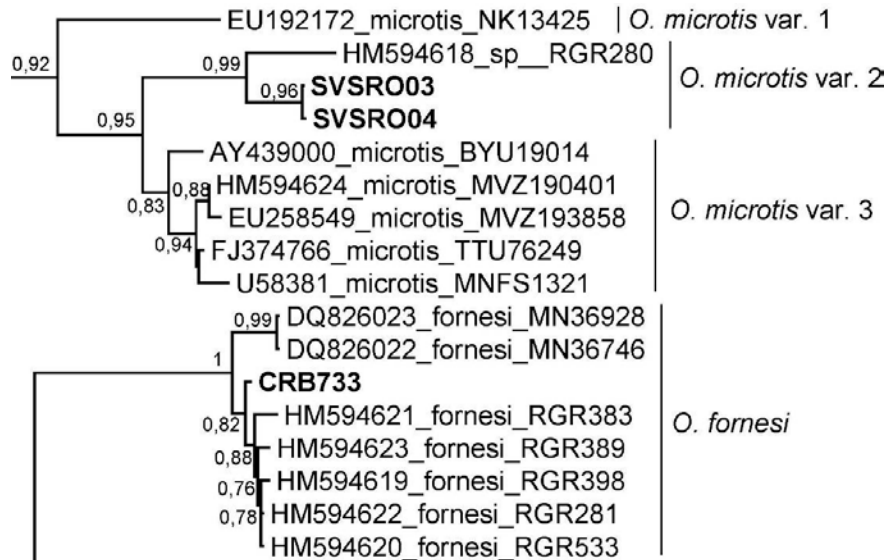


Figura 4-4. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de *O. microtis* e *O. fornesi* a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.

A Figura 4-5 mostra o grupo vermelho que apresentou uma estruturação genética e por isso foi subdividido em *Oligoryzomys* sp. 2 (dois espécimes da Bolívia, NK21532 e NK22846) e *Oligoryzomys* sp. 3 (cinco espécimes da Argentina, MIC210, MIC211, MIC203, Jy1245 e PIDBA986). Essa denominação foi dada porque a maioria das sequências de *O. destructor* e *O. flavescens* está em outros clados, e porque sequenciamos *O. flavescens* com identificação comprovada por análise cariotípica e morfológica.

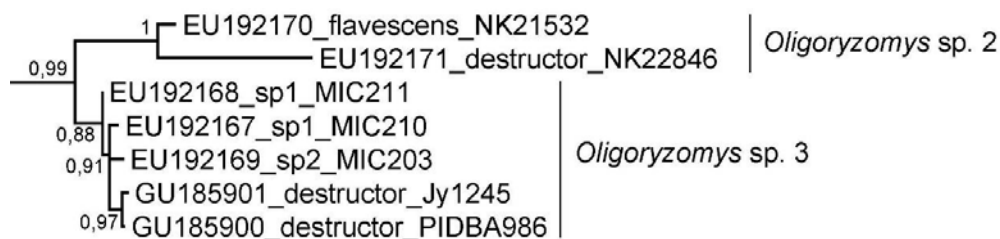


Figura 4-5. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo vermelho, *Oligoryzomys* sp. 2 e sp. 3, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-6 mostra as relações intraespecíficas do grupo amarelo representada por três linhagens de *O. fulvescens* recuperadas como monofiléticas (aLRT=1, bs=87, pp=1, aLRT=1, bs=89, pp=1 e aLRT=1, bs=89, pp=1, respectivamente), aqui designadas *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens* (veja explicação na discussão).

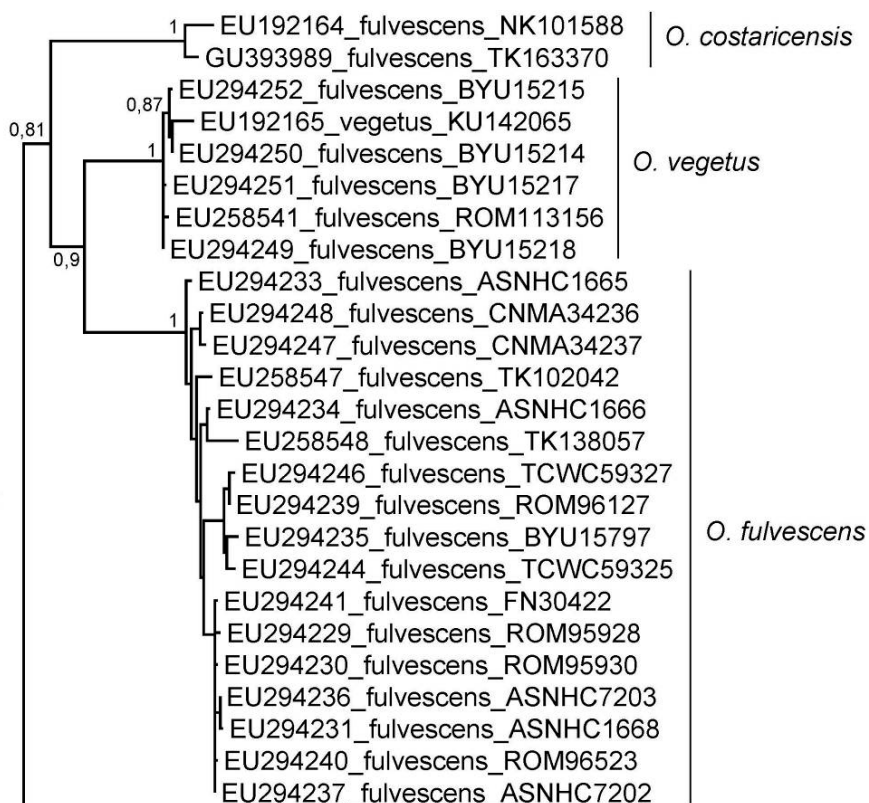


Figura 4-6. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo amarelo, representado por *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens*, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Os valores intraespecíficos de *O. vegetus* e *O. fulvescens* não foram mostrados.

A Figura 4-7 mostra as relações intraespecíficas de parte do grupo verde (*O. destructor* e *O. rupestris*), além de *O. messorius*, representado por um espécime coletado em Roraima, com posição filogenética incerta. A monofilia de *O. destructor* e *O. rupestris* é bem

suportada (aLRT=1, bs=77, pp=1 e aLRT=0,99, bs=87, pp=1, respectivamente). *Oligoryzomys rupestris* apresentou estruturação genética, com suporte alto.

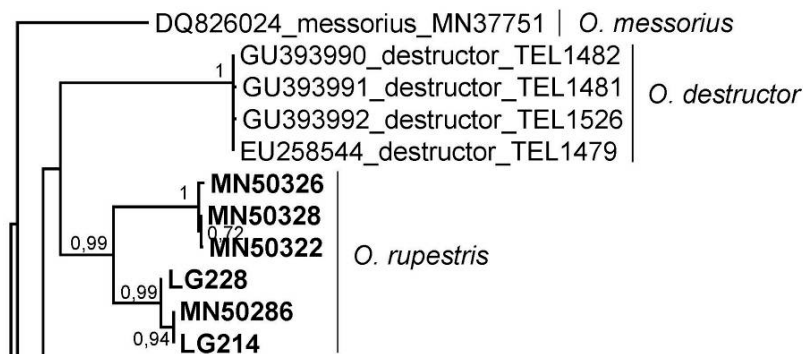


Figura 4-7. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por *O. destructor* e *O. rupestris*, além de *O. messorius*, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.

A Figura 4-8 mostra as relações intraespecíficas de outra parte do grupo verde, incluindo sequências identificadas no GenBank como *O. fulvescens* e *Oligoryzomys* sp., que se dividiram em dois grupos monofiléticos (respectivamente aLRT=1, bs=74, pp=1 e aLRT=1, bs=78, pp=1), aqui designados *O. delicatus* e *Oligoryzomys* sp. 1 (veja explicação na discussão).

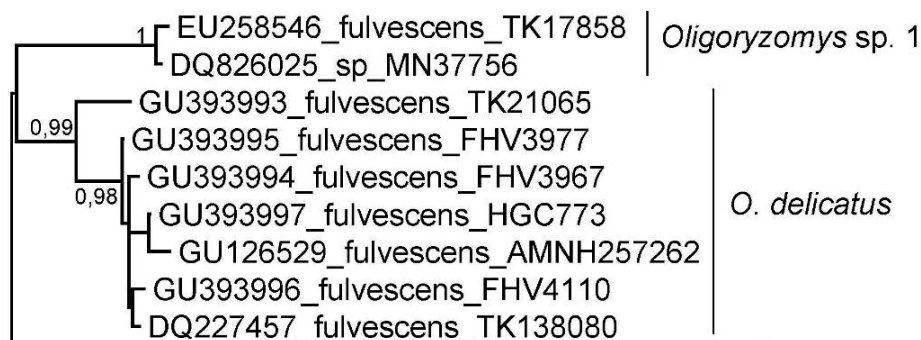


Figura 4-8. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por *Oligoryzomys* sp. 1 e *O. delicatus*, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-9 representa a última parte do grupo verde, que inclui as espécies *O. moojeni* e *O. utiaritensis*. Como visto acima, *O. utiaritensis* é monofilético (aLRT=1, bs=87, pp=1), porém apenas parte de *O. moojeni* forma um grupo monofilético (aLRT=1, bs=87, pp=1). Dois espécimes de *O. moojeni*, MN36426 e MN50307 agrupam com *O. utiaritensis* (aLRT=0,93, bs=76, pp=0,99).

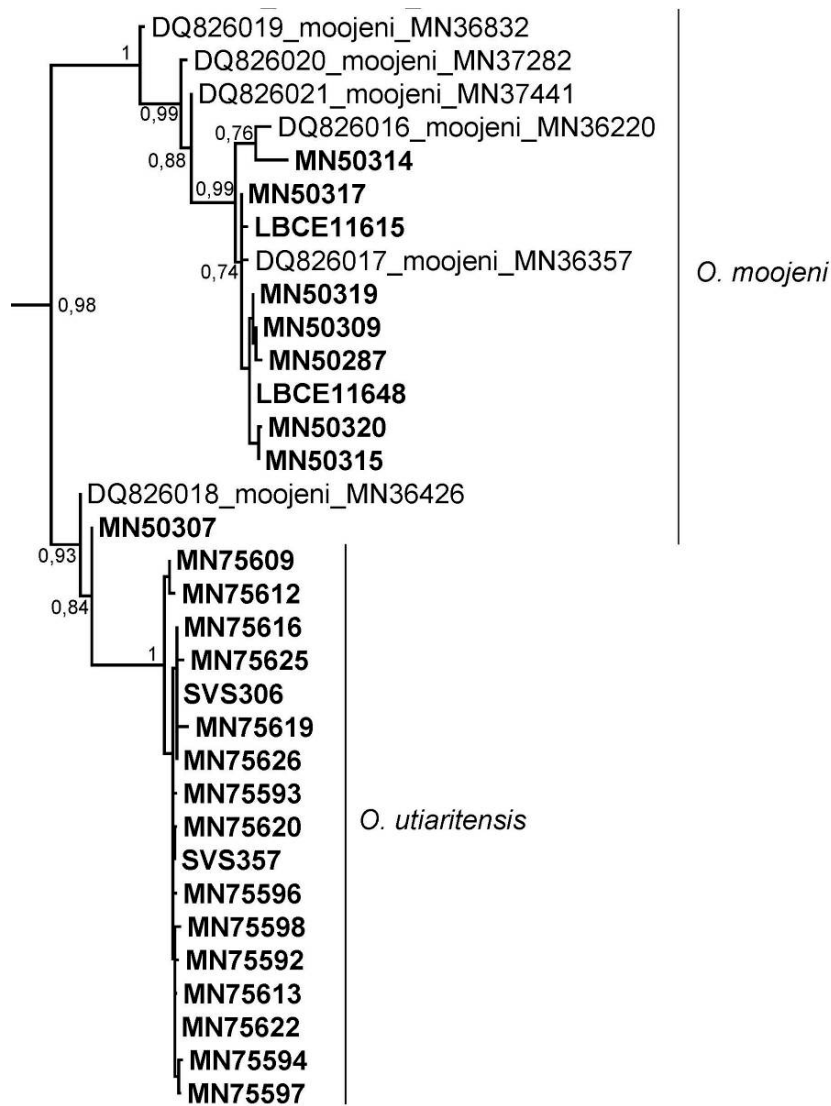


Figura 4-9. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo verde, representado por *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.

A Figura 4-10 apresenta a primeira parte do grupo roxo, que inclui *O. chacoensis* e *O. longicaudatus*, ambas monofiléticas (aLRT=0,91, bs=95, pp=0,62 e aLRT=1, bs=89, pp=1, respectivamente). Dentro de *O. chacoensis* é perceptível uma diferenciação intraespecífica, com o espécime NK72388 do Paraguai (próximo da localidade tipo) se separando dos demais espécimes da Argentina. Apesar de haver muitas sequências de *O. longicaudatus* no Genbank, a maioria delas contém uma região muito pequena de *citb*, e por isso apenas os três espécimes com as maiores sequências foram usados.



Figura 4-10. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo roxo, representado por *O. chacoensis* e *O. longicaudatus*, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.

A Figura 4-11 representa as relações intraespecíficas da última parte do grupo roxo, incluindo sequências identificadas como *O. andinus*, *O. flavescens*, *O. fornesi* e *Oligoryzomys* sp. B, essa última considerada aqui como *Oligoryzomys* sp. 4. Aqui subdividimos *O. flavescens* (incluindo também alguns espécimes identificados como *O. fornesi*) em quatro variações, e a identidade de cada linhagem será discutida posteriormente. *Oligoryzomys andinus* é monofilético (aLRT=0,98, bs=80, pp=0,5), porém *O. flavescens* só é monofilética na ML (aLRT=0,86, bs=88).

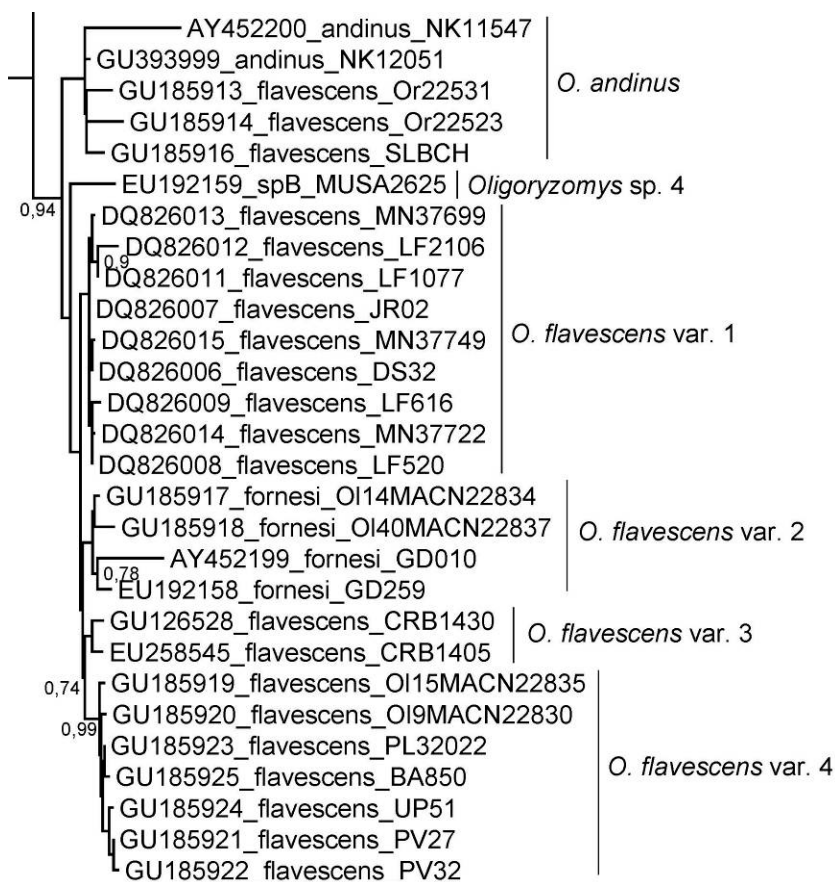


Figura 4-11. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo roxo, representado por *O. andinus*, *Oligoryzomys* sp. 4, *O. flavescens* e suas quatro linhagens diferentes, a partir de *citb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-12 representa o grupo marrom, que inclui *O. stramineus* e *O. nigripes*, ambas monofiléticas (aLRT=1, bs=99, pp=1 e aLRT=1, bs=98, pp=1, respectivamente). Todos os espécimes utilizados nas análises populacionais (item 4.6) estão incluídos aqui.

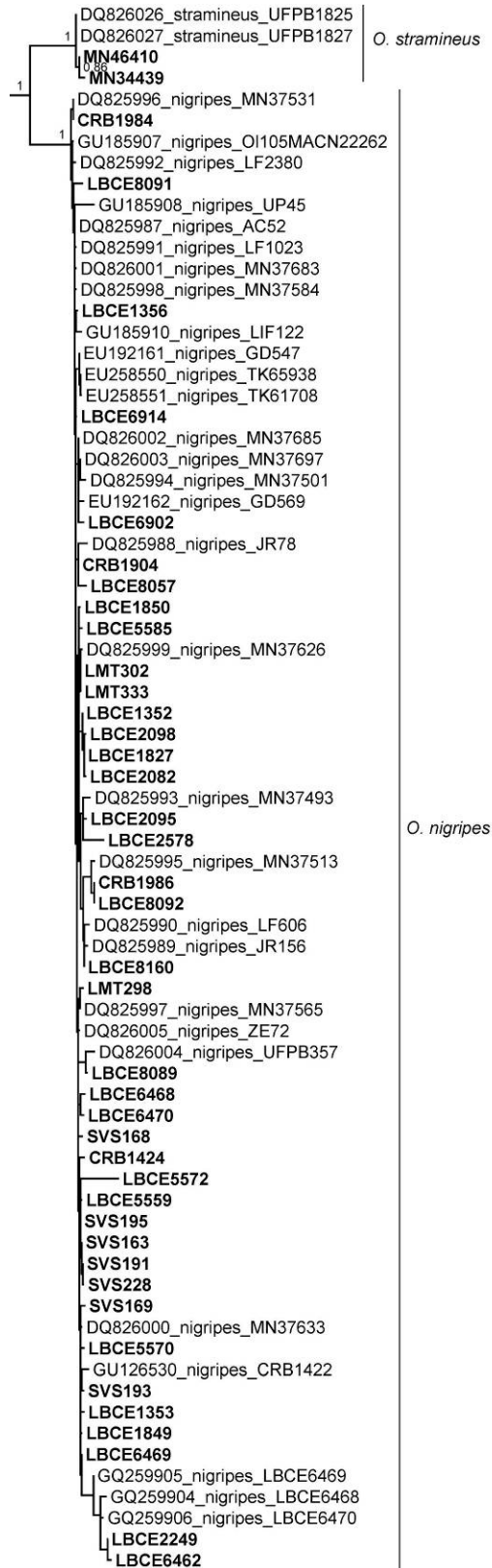


Figura 4-12. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte do grupo marrom, representado por *O. stramineus* e *O. nigripes*, a partir de *cttb*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5. Espécimes em negrito representam sequências inéditas.

4.3 Análises filogenéticas com *coi*

4.3.1 Características das sequências

Foram encontrados 644 sítios variáveis e 108 haplótipos entre os 108 indivíduos utilizados (Tabela 3-2). O modelo de evolução molecular escolhido foi GTR+ Γ e os parâmetros estimados foram: frequências das bases (A=0,3188; C=0,2765; G=0,1123; T=0,2924), taxas de mutação (A-C=1,1441; A-G=9,3411; A-T=2,5665; C-G=0,4225; C-T=12,7325; G-T=1), e α (0,161).

A proporção s/v estimada é de 5,25. A Figura 4-13 mostra que as sequências saturam a partir da distância genética de aproximadamente 20%.

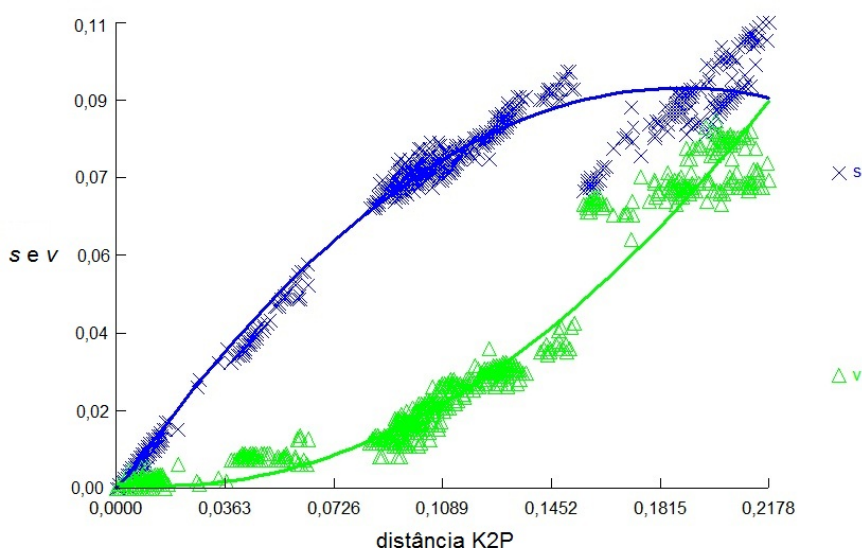


Figura 4-13. Gráficos das taxas de transição e transversão (s e v) versus distância genética K2P de *coi*.

4.3.2 ML e BA

No geral, as árvores construídas por ML e por BA apresentam topologia similares, com *Oligoryzomys* monofilético com alto suporte, e a maioria das espécies também monofiléticas, com algumas diferenças discutidas nas páginas seguintes. As Figura 4-14 e Figura 4-15 mostram as topologias da ML e BA, respectivamente. A Tabela 4-5 mostra os valores de aRLT, *bootstrap* e probabilidade posterior dos principais grupos encontrados e de todas as espécies.

Tabela 4-5. Valores de aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de *Oligoryzomys* para o gene *coi*. Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-14.

Grupo	aLRT	bs	pp
<i>Oligoryzomys</i>	1	98	1
azul + rosa + roxo + verde separados de marrom	0,51	76	<0,5
rosa + azul	1	86	0,87
<i>O. fornesi</i>	1	90	1
roxo + verde	0,68	73	0,6
<i>O. flavescens</i>	1	96	1
verde	1	93	0,89
<i>O. rupestris</i>	1	97	1
<i>O. utiaritensis</i> + <i>O. moojeni</i>	1	99	1
<i>O. utiaritensis</i>	1	98	1
<i>O. moojeni</i>	1	99	1
marrom	0,75	86	0,96
<i>O. stramineus</i>	1	99	1
<i>O. nigripes</i>	1	98	1

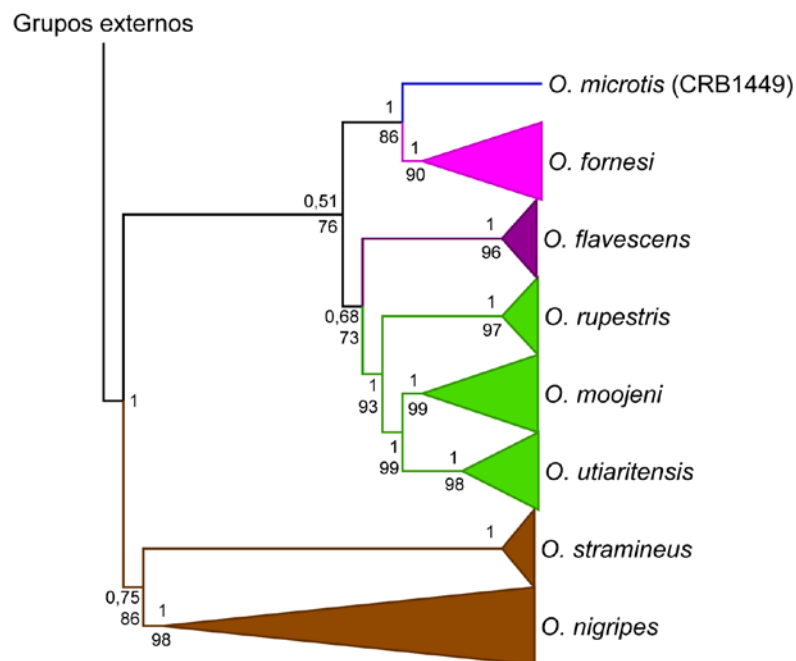


Figura 4-14. Árvore de ML de *coi* com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores acima dos nós são o suporte por aLRT, e os valores abaixo dos nós são o suporte por *bootstrap*. Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de *bootstrap* acima de 50 foram considerados.

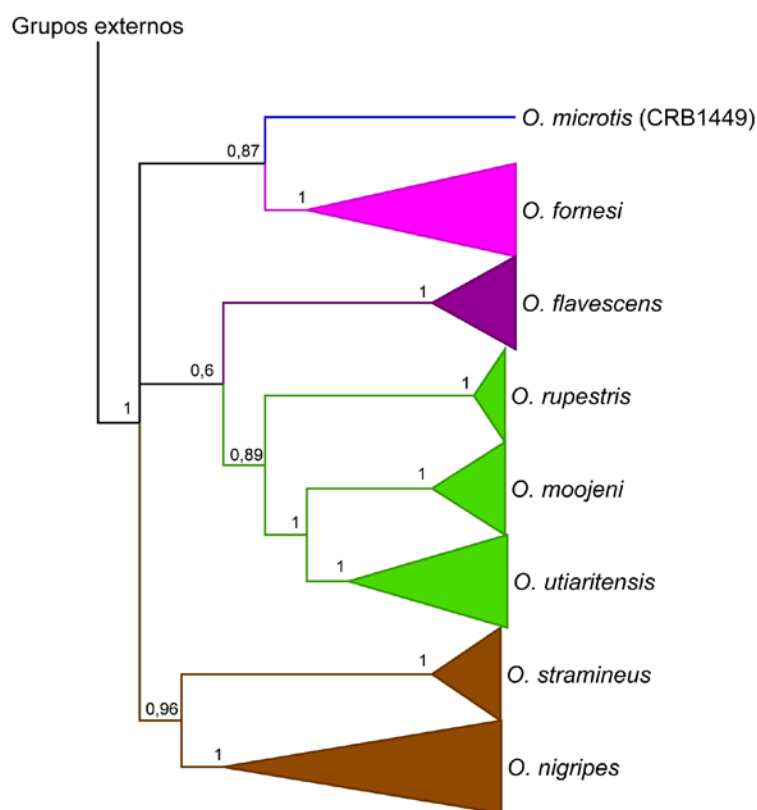


Figura 4-15. Árvore de BA de *coi*, com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores próximos aos nós são o suporte pela probabilidade posterior. Apenas valores acima de 0,5 foram considerados.

Algumas espécies consideradas nas árvores não foram encontradas como monofiléticas, e apenas grupos com suporte alto em pelo menos duas análises foram considerados. Os grupos de cores foram os mesmo considerados nas análises com *citb*.

A primeira subdivisão que acontece apenas na ML é uma dicotomia, onde o grupo marrom se separou dos demais grupos, porém com baixo suporte (aLRT=1, bs<50, pp<0,5). O grupo marrom representado pelas espécies *O. stramineus* e *O. nigripes* teve suporte alto (aLRT=0,75, bs=86, pp=0,96) em ambas as análises. Os demais grupos se dividem em dois, o primeiro clado inclui os grupos azul (*O. microtis*) + rosa (*O. fornesi*) com suporte alto, e o segundo os grupos roxo (*O. flavescens*) + verde (*O. rupestris*, *O. moojeni* e *O. utiaritensis*), porém com baixo suporte (aLRT=0,51, bs=76) e não foi encontrado na BA. O grupo azul+rosa apresentou suporte alto (aLRT=1, bs=86, pp=0,87). O clado formado pelo grupos roxo (*O. flavescens*) + verde apresentou suporte moderado (aLRT=0,68, bs=73, pp=0,6). O grupo verde apresentou alto suporte (aLRT=1, bs=93, pp=0,89), com *O. rupestris* sendo o clado irmão do grupo formado por *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, e que teve suporte alto (aLRT=1, bs=99, pp=1).

A Figura 4-16 mostra as relações intraespecíficas de *O. fornesi* e *O. microtis*. Tanto na ML quanto na BA, o único espécime de *O. microtis* (CRB1449) diferencia-se dos outros espécimes de *O. fornesi*, que se apresentou como monofilético (aLRT=1, bs=90, pp=1) Foi encontrada estruturação genética em *O. fornesi*, em ambas as análises, com pelo menos três grupos distintos e com alto suporte: um grupo contendo espécimes do Pantanal (LBCE 5689, 5690, 5119, 5718, 5719 e 5720) e um espécime do Cerrado do Mato Grosso do Sul (LBCE12111), um grupo contendo espécimes do Cerrado de Goiás (CRB 708, 733 e 747) e outro grupo contendo espécimes do Cerrado do Mato Grosso (CRB 2788 e 2793).

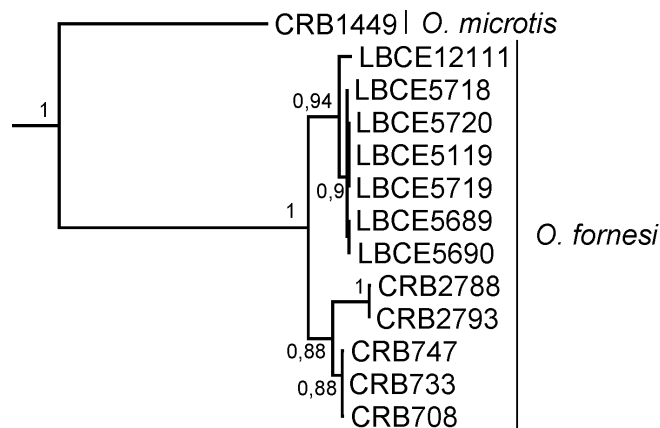


Figura 4-16. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas de parte dos grupos rosa e azul, representados por *O. fornesi* e *O. microtis*, a partir de *coi*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-17 mostra as relações intraespecíficas do grupo verde, representado por *O. rupestris*, *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, além do único representante do grupo roxo, *O. flavescens*. As quatro espécies são monofiléticas, com alto suporte. Há ainda o agrupamento de *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, encontrado em ambas as análises com alto suporte (aLRT=1, bs=93, pp=1).

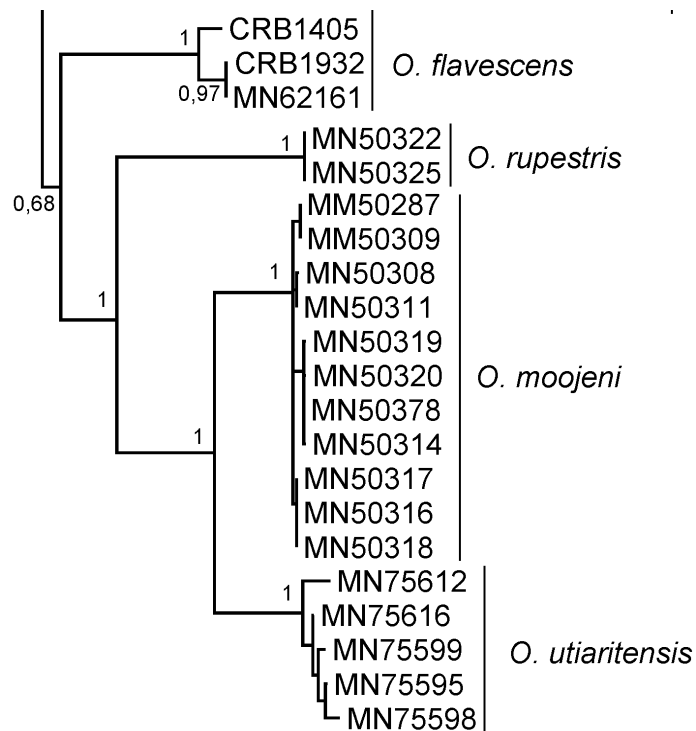


Figura 4-17. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo roxo, representado por *O. flavescens*, e do grupo verde, representados por *O. moojeni*, *O. utiaritensis* e *O. rupestris*, a partir de *coi*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

Na Figura 4-18 mostra as relações intraespecíficas do grupo marrom, representado por *O. stramineus* e *O. nigripes*. Ambas apareceram como monofiléticas, com alto suporte.

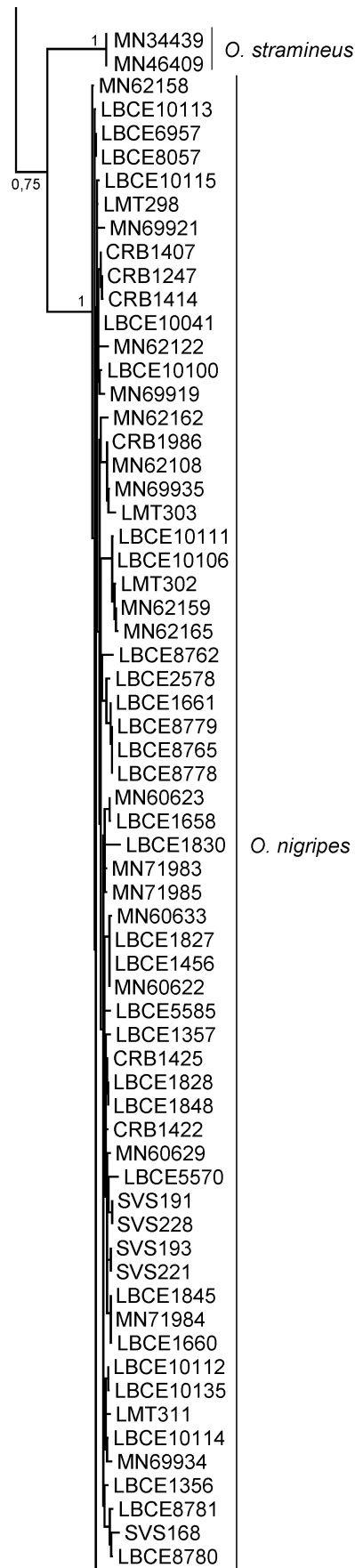


Figura 4-18. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo marrom, representado por *O. stramineus* e *O. nigripes*, a partir de *coi*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

4.4 Análises filogenéticas com *beta-fibint7*

4.4.1 Características das sequências

Foram encontrados 126 sítios variáveis e 70 haplótipos entre os 104 indivíduos utilizados (Tabela 3-3). O modelo de evolução molecular escolhido foi GTR+ Γ , e os parâmetros estimados foram: frequências das bases (A=0,3147; C=0,1988; G=0,1836; T=0,3028), taxas de mutação (A-C=0,592; A-G=5,2119; A-T=0,3764, C-G=0,8323, C-T=3,503, G-T=1) e α (0,44). A proporção s/v estimada é de 3,82. A Figura 4-19 também mostra que, considerando todas as posições, as sequências parecem não saturar nunca.

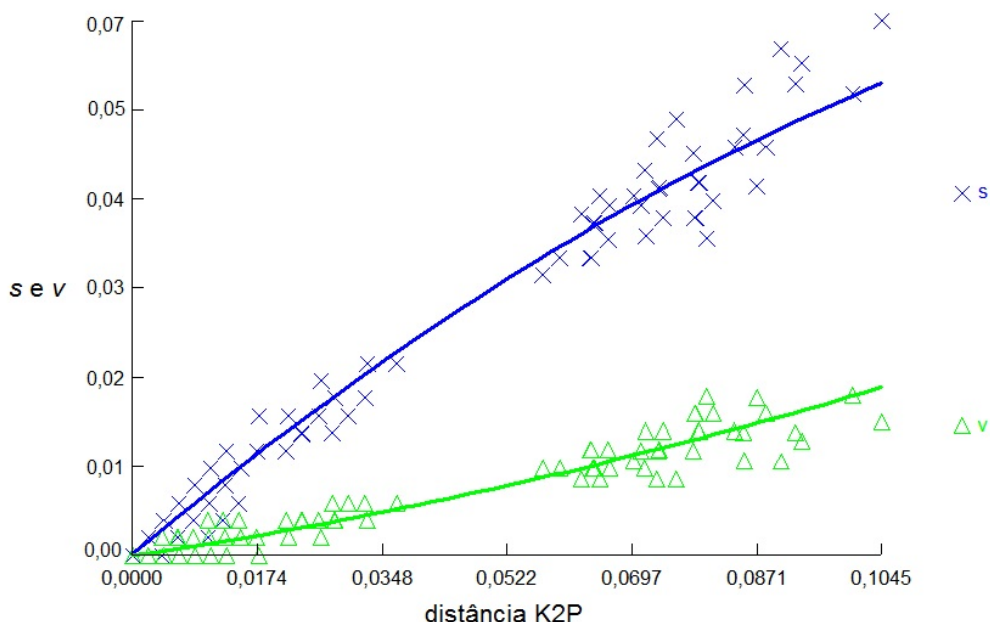


Figura 4-19. Gráficos das taxas de transição e transversão (*s* e *v*) versus distância genética K2P de *beta-fibint7* considerando todas as posições.

4.4.2 ML e BA

As árvores construídas por ML e por BA apresentam topologia similar, com o gênero e as espécies de *Oligoryzomys* monofiléticos, com pequenas diferenças discutidas nas páginas seguintes. As Figura 4-20 e Figura 4-21 mostram as topologias da ML e BA, respectivamente. A Tabela 4-6 mostra os valores de aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior dos principais grupos encontrados e de todas as espécies.

Tabela 4-6. Valores de aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior dos grupos encontrados nas análises filogenéticas de *Oligoryzomys* para *beta-fibint7*. Os códigos das cores dos diferentes grupos considerados estão indicados na Figura 4-20.

Grupo	aLRT	bs	pp
<i>Oligoryzomys</i>	1	99	1
<i>O. flavescens</i>	<0,5	62	0,51
verde	0,63	72	1
<i>O. rupestris</i> + <i>O. moojeni</i>	0,89	92	1
<i>O. rupestris</i>	1	98	1
<i>O. moojeni</i>	0,9	97	0,94
<i>O. utiaritensis</i>	0,87	90	0,67
rosa + azul + marrom	<0,5	<50	0,81
rosa + azul	0,78	80	1
<i>O. fornesi</i>	0,86	87	1
<i>O. microtis</i>	0,86	88	1
marrom	0,8	89	1
<i>O. nigripes</i>	0,82	90	0,96

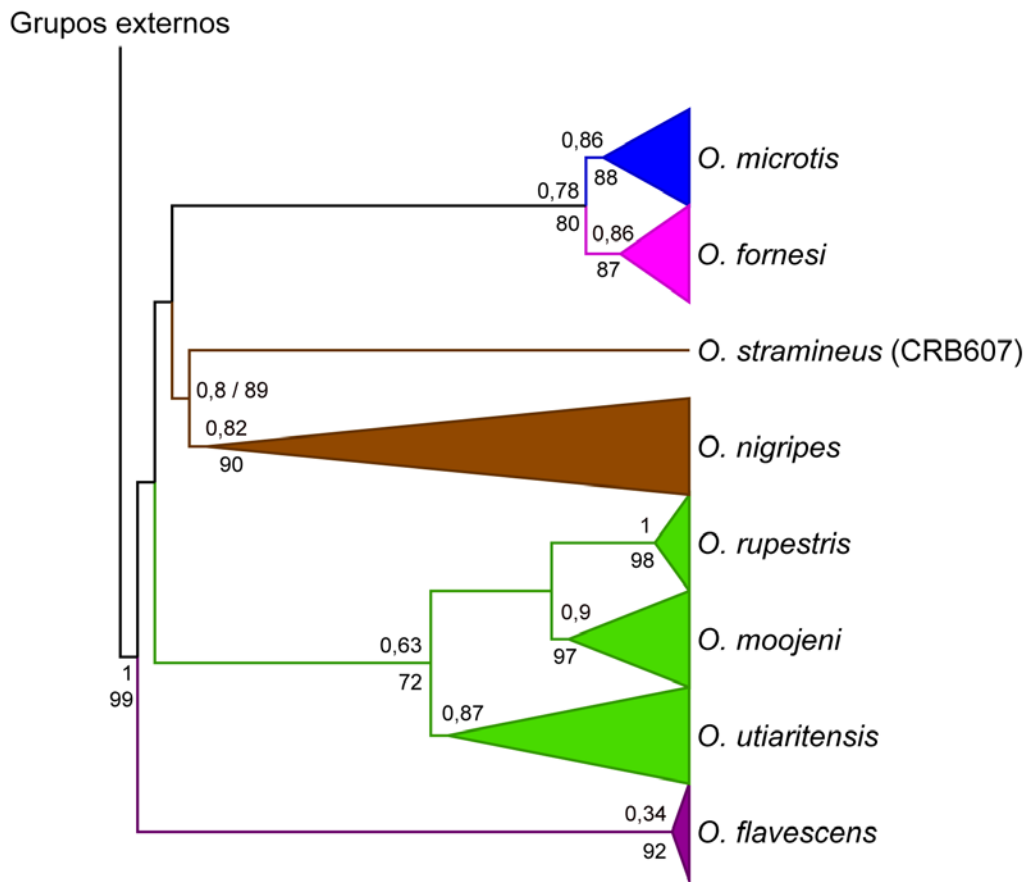


Figura 4-20. Árvore de ML de *beta-fibint7* com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores acima dos nós são o suporte por aLRT, e os valores abaixo dos nós são o suporte por *bootstrap*. Apenas valores de aLRT acima de 0,5 e de *bootstrap* acima de 50 foram considerados.

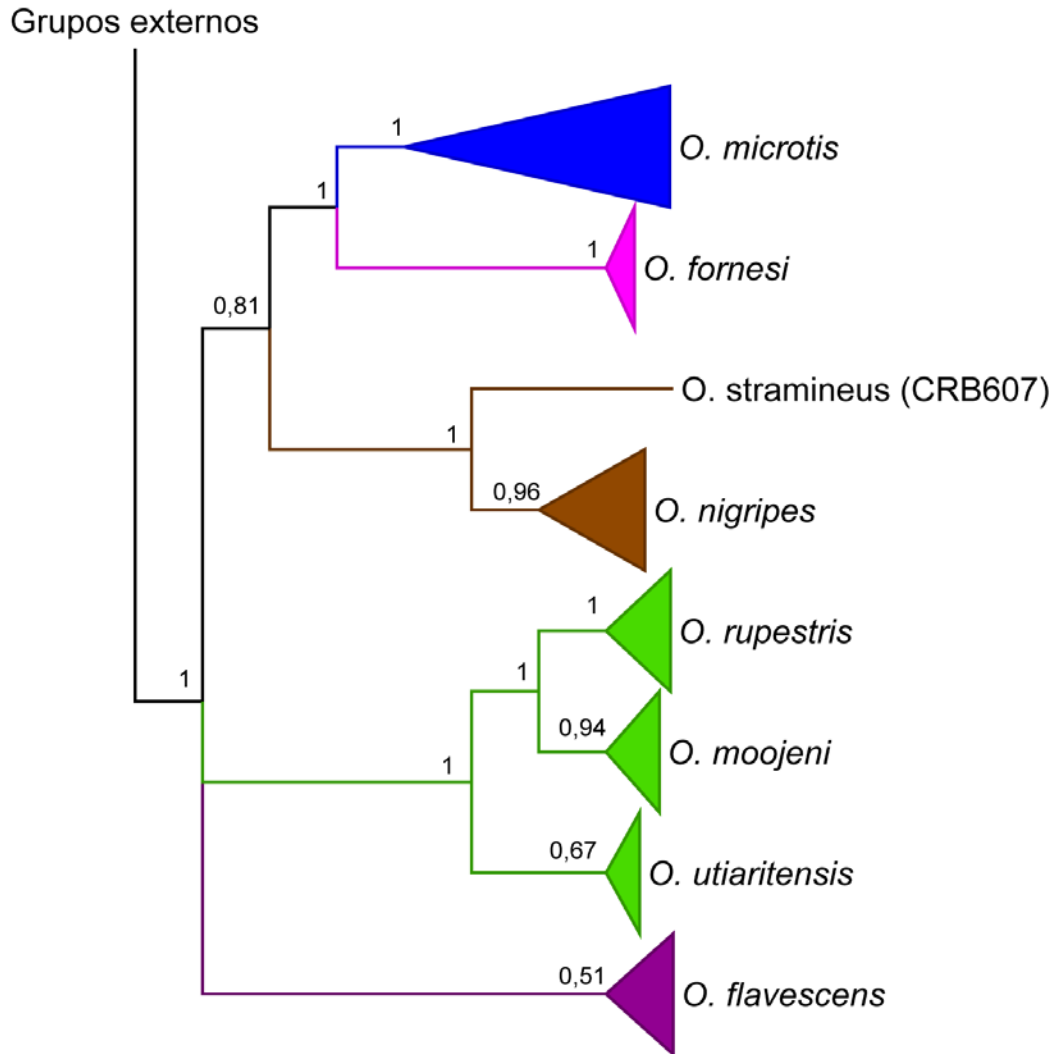


Figura 4-21. Árvore de BA de *beta-fibint7* com os ramos intraespecíficos colapsados e os grupos diferenciados por cores diferentes. Os valores próximos aos nós são o suporte pela probabilidade posterior. Apenas valores acima de 0,5 foram considerados.

As cores dos grupos foram as mesmas consideradas nas análises com *citb* e *coi*. Nenhuma das análises suportou uma divisão inicial. As espécies foram subdivididas em grupo roxo, grupo verde, grupo rosa junto com azul e grupo marrom. O grupo roxo, representado aqui apenas por *O. flavescens*, apresentou suporte baixo (aLRT<0,5, bs=62, pp=0,51). Já o grupo verde, composto por *O. rupestris*, *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, apresentou suporte moderado (aLRT=0,63, bs=72, pp=1), *O. rupestris* e *O. moojeni* formando um grupo com suporte alto (aLRT=0,89, bs=92, pp=1). O grupo rosa, composto por *O. fornesi*, e o grupo azul, representado por *O. microtis*, também formaram um grupo com alto suporte (aLRT=0,78, bs=80, pp=1). O grupo marrom é composto por *O. stramineus* e *O. nigripes*, e apresentou um suporte alto (aLRT=0,8, bs=89, pp=1).

As topologias interespecíficas a serem mostradas são as de ML. A Figura 4-22 mostra as relações intraespecíficas do grupo roxo e do grupo verde. Como dito acima, o suporte de *O. flavescens* é baixo. Já o grupo verde apresentou todas as espécies monofiléticas com suporte alto.

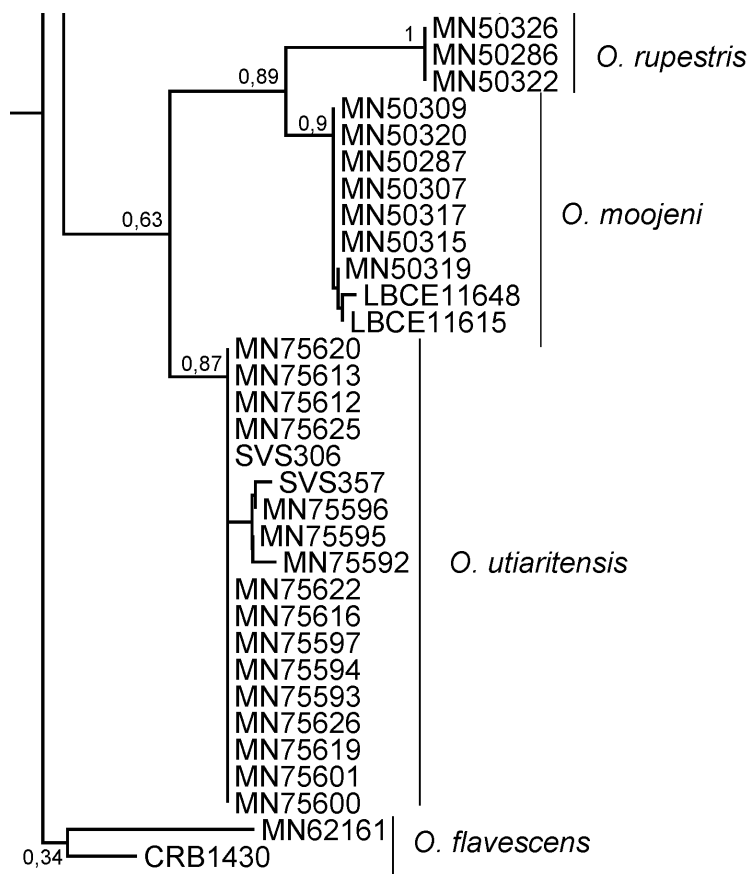


Figura 4-22. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo verde, representado por *O. rupestris*, *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, além do grupo roxo, representado por *O. flavescens*, a partir de *beta-fibint7*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-23 apresenta as relações intraespecíficas do grupo azul, representado por *O. microtis* e *O. fornesi*, ambas monofiléticas com alto suporte. É possível notar uma estruturação genética, encontrada tanto em ML quanto em BA e com suporte alto em ambas dentro de *O. microtis*, entre espécimes do Tocantins (CRB 1450, 1448, 1452 e 1451) e espécimes de Rondônia (SVS 03, 04, 17, 21, 62, 75 e 93).

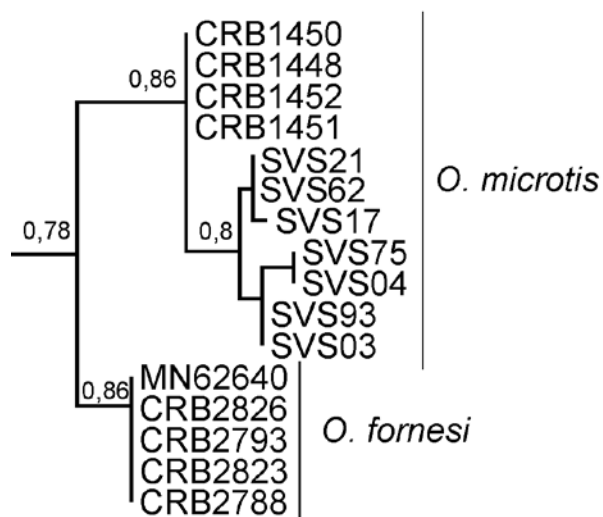


Figura 4-23. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo rosa, representado por *O. fornesi*, e do grupo azul, representado por *O. microtis*, a partir de *beta-fibint7*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

A Figura 4-24 apresenta as relações intraespecíficas do grupo marrom, composto por *O. stramineus* e *O. nigripes*, com *O. nigripes* monofilético e com alto suporte.

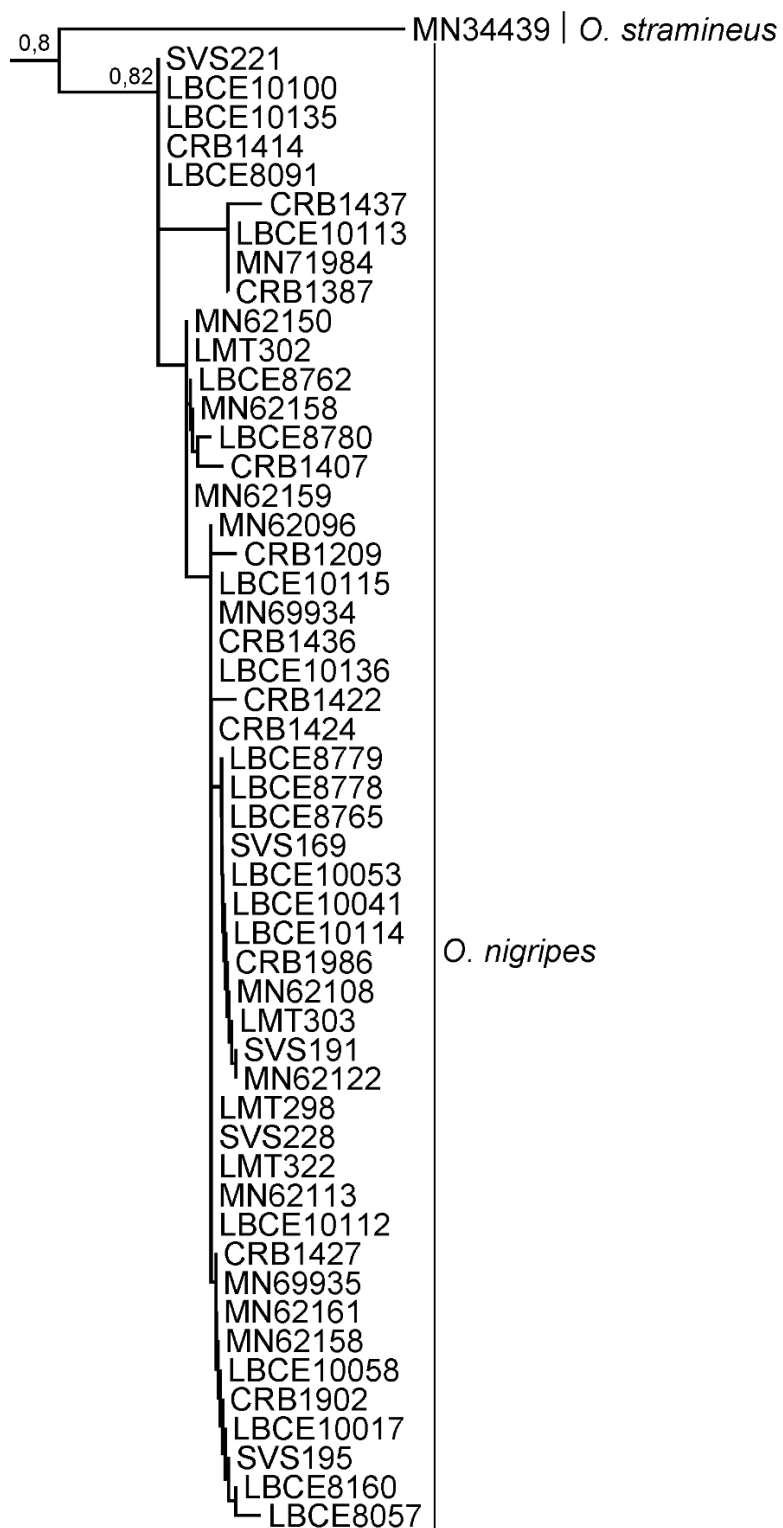


Figura 4-24. Topologia de ML mostrando as relações intraespecíficas do grupo marrom, representado por *O. stramineus* e *O. nigripes*, a partir de *beta-fibint7*. Os números representam valores de aLRT, e mostrados apenas valores acima de 0,5.

4.5 Relógio molecular de *Oligoryzomys* a partir de *citb*

A Tabela 4-7 resume os resultados da datação por relógio molecular relaxado de *Oligoryzomys* por *citb*. A Figura 4-25 mostra o gráfico dos *traces* da probabilidade posterior dos parâmetros encontrados, indicando a convergência dentro e entre as duas corridas independentes. Todos os parâmetros tiveram ESS>200.

O tempo até ancestral comum mais recente de todos os espécimes utilizados nessa análise é de aproximadamente 6,4 milhões de anos e a diferenciação de *Oligoryzomys* ocorreu há aproximadamente 4,1 milhões de anos. Dentre as espécies de *Oligoryzomys*, a diferenciação mais antiga é de *O. microtis*, há aproximadamente 2,5 milhões de anos. Após, temos *Oligoryzomys* sp. 2 há aproximadamente 906 mil anos, seguidos por *O. fornesi* e *O. moojeni* há aproximadamente 550 mil anos. Depois temos *O. flavescens*, *O. costaricensis*, *O. vegetus*, *O. delicatus*, *O. andinus*, *O. longicaudatus* e *O. fulvescens* se diferenciando entre 400 e 250 mil anos. *O. nigripes* diferenciou-se há 195 mil anos. *Oligoryzomys* sp. 1 e *O. utiaritensis* diferenciaram-se há aproximadamente 157 mil anos, seguidos por *O. chacoensis*, *O. stramineus* e *Oligoryzomys* sp. 3, com diferenciação entre 115 e 90 mil anos atrás. As espécies mais recentes foram *O. rupestris* e *O. destructor*, com diferenciação há aproximadamente 33 e 23 mil anos atrás, respectivamente.

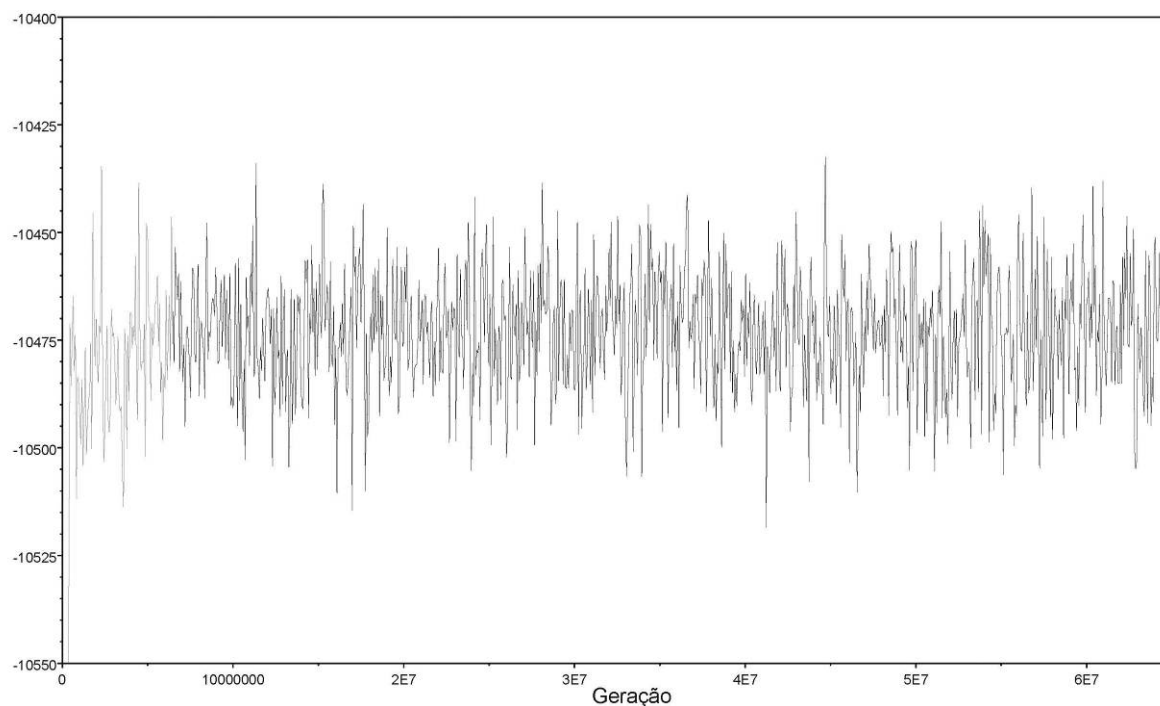


Figura 4-25. Gráfico dos *traces* referente à probabilidade posterior dos parâmetros encontrados pelo programa BEAST para *citb*.

Tabela 4-7. Tempos até o ancestral comum mais recentes das espécies de *Oligoryzomys*, em milhões de anos, calculados a partir de *citb* por relógio molecular relaxado, contendo a média dos valores e os intervalos de 95% mínimos e máximos de maior densidade posterior.

Grupo	Média	95% mín.	95% máx.
Raíz	6,410	4,953	7,814
<i>Oligoryzomys</i>	4,138	2,502	5,950
<i>O. microtis</i>	2,571	1,326	3,908
<i>Oligoryzomys</i> sp. 2	0,906	0,392	1,528
<i>O. moojeni</i>	0,570	0,178	1,099
<i>O. fornesi</i>	0,544	0,192	0,971
<i>O. flavescens</i>	0,399	0,160	0,698
<i>O. costaricensis</i>	0,373	0,109	0,728
<i>O. vegetus</i>	0,343	0,088	0,673
<i>O. delicatus</i>	0,328	0,110	0,602
<i>O. andinus</i>	0,294	0,091	0,556
<i>O. longicaudatus</i>	0,286	0,091	0,537
<i>O. fulvescens</i>	0,249	0,062	0,509
<i>O. nigripes</i>	0,195	0,061	0,365
<i>Oligoryzomys</i> sp. 1	0,157	0,026	0,334
<i>O. utiaritensis</i>	0,157	0,046	0,298
<i>O. chacoensis</i>	0,115	0,020	0,249
<i>Oligoryzomys</i> sp. 3	0,109	0,009	0,256
<i>O. stramineus</i>	0,090	0,008	0,210
<i>O. rupestris</i>	0,033	0,000	0,088
<i>O. destructor</i>	0,023	0,000	0,074

A Tabela 4-8 mostra os outros parâmetros calculados pelo programa BEAST. A taxa encontrada do relógio molecular é de 0,0375 substituições por sítio a cada milhão de anos, e o desvio padrão dessa taxa é maior que zero. Além disso, a covariância entre os ramos é negativa. A taxa de mutação na 3ª posição do códon é aproximadamente 50x maior do que a taxa de mutação da 2ª posição do códon e aproximadamente 6x maior do que a taxa na 1ª posição do códon. A Figura 4-26 mostra o gráfico da densidade dos valores da taxa de mutação, ilustrando essa diferença.

Tabela 4-8. Principais parâmetros calculados pelo programa BEAST para *citb*, contendo a média dos valores e os intervalos de 95% mínimos e máximos de maior densidade posterior.

Parâmetro	Média	95% mín.	95% máx.
Taxa do relógio molecular	0,0375	0,0245	0,0523
Desvio padrão do relógio	0,482	0,2677	0,7075
Covariância entre os ramos	-0,0003	-0,198	0,2074
Taxa de mutação 1a	0,3955	0,3155	0,4790
Taxa de mutação 2a	0,0515	0,0386	0,0659
Taxa de mutação 3a	2,5530	2,4690	2,6348

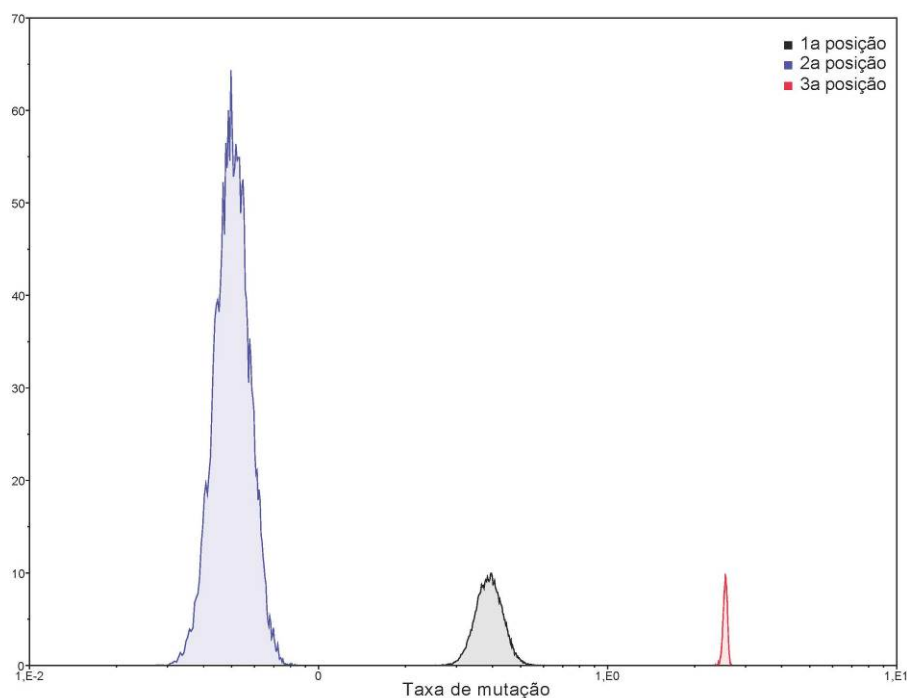


Figura 4-26. Gráfico da densidade posterior das taxas de mutação entre as três posições dos códons de *citb*.

A Figura 4-27 mostra a árvore encontrada nessas análises, anotada com a média dos valores do tempo até o último ancestral comum dos diferentes grupos. Algumas das posições filogenéticas encontradas são diferentes das análises filogenéticas com *citb* mostradas em 4.2.2: *O. fornesi* é o terceiro grupo mais basal de *Oligoryzomys*; *O. moojeni* não agrupa com *O. utiaritensis* e é a espécie mais basal do grupo verde; *O. chacoensis* agrupa-se com as espécies do grupo marrom. Todas as espécies são monofiléticas com suporte igual a 1.

A separação entre o grupo vermelho e as outras espécies ocorreu há 3,36 milhões de anos (intervalo de 95% de 2,05 – 4,78 milhões de anos). A separação entre *O. fornesi* ocorreu há 3,07 milhões de anos (2,45- 3,70). A separação entre as espécies do grupo amarelo ocorreu há 2,78 milhões de anos (2,07-3,48). A separação entre as espécies do grupo verde e as espécies dos grupos roxo e marrom ocorreu há 2,55 milhões de anos (1,57-3,58). Dentro do grupo verde, a primeira separação foi de *O. moojeni*, há 2,30 milhões de anos (1,62–2,90), seguido pela separação entre *O. delicatus* + *Oligoryzomys* sp. 1 e *O. rupestris* + *O. destructor* + *O. utiaritensis*, há 1,8 milhão de anos (1,38–2,60). *Oligoryzomys rupestris* se separou de *O. destructor* + *O. utiaritensis* há 1,66 milhão de anos (1,05–2,42). A separação entre *O. longicaudatus*+*O. andinus*+*O. flavescens* e *O. chacoensis* + *O. stramineus* + *O. nigripes* ocorreu há 2,21 milhões de anos (1,20-2,6). *Oligoryzomys longicaudatus* se separou de *O. andinus* + *O. flavescens* há 1,18 milhão de anos (0,55-1,88), e essas duas últimas espécies separaram-se há 0,74 milhão de anos (0,4-1,15). *Oligoryzomys chacoensis* se separou de *O. stramineus* + *O. nigripes* há 1,7 milhão de anos (0,82-2,53), e essas duas últimas espécies separaram-se há 1,17 milhão de anos (0,52-1,9).

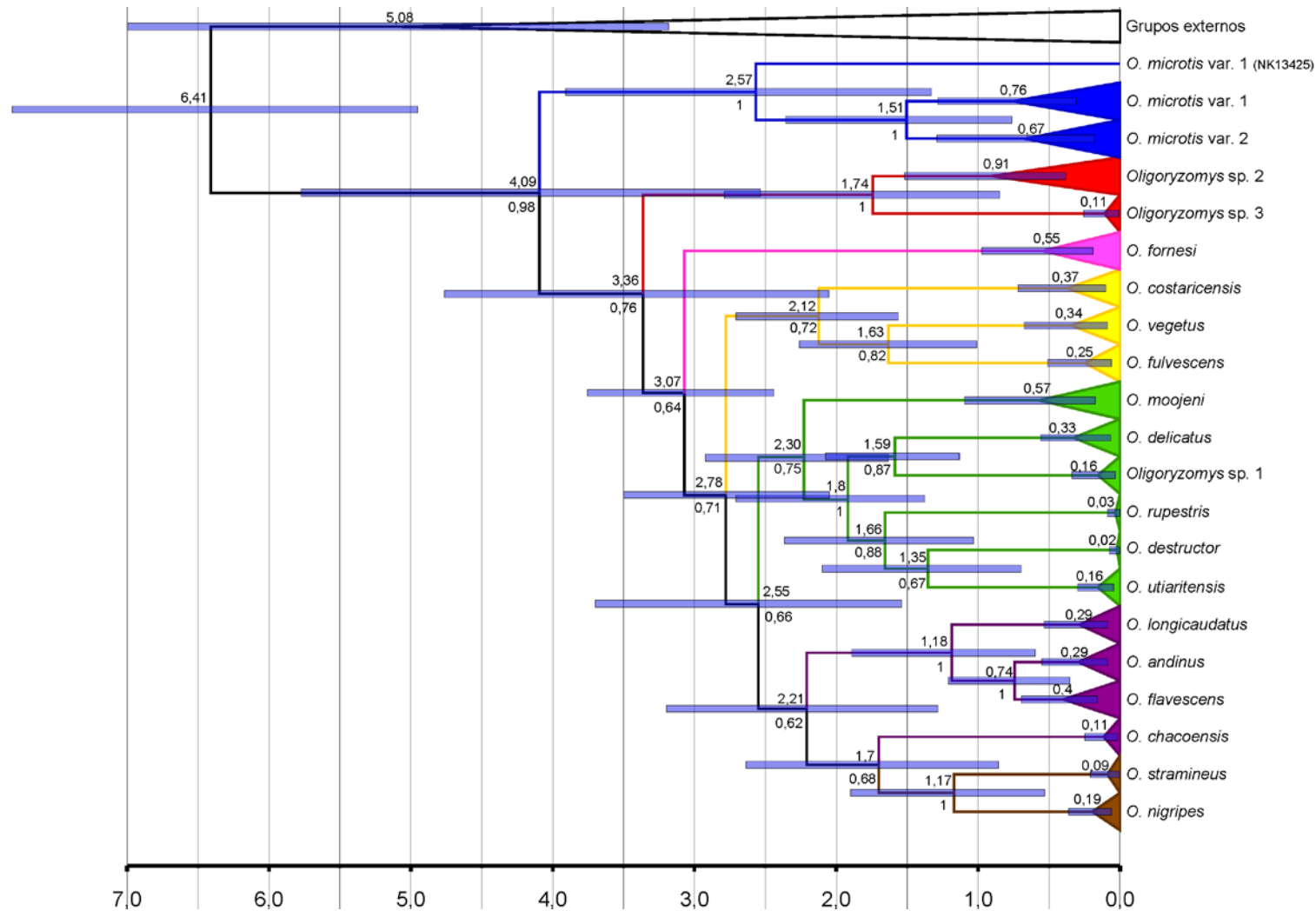


Figura 4-27. Árvore filogenética gerada pelo programa BEAST contendo as espécies de *Oligoryzomys* colapsadas. Os números do eixo de escalas estão em milhões de anos. Os números acima dos nós são os valores médios do tempo até o ancestral comum mais recente (em milhão de anos), e os números abaixo dos nós são os valores de probabilidade posterior do clado. As barras azuis representam o intervalo de 95% da maior densidade posterior. Todos os valores de probabilidade posterior dos ramos intraespecíficos são iguais a 1, e por isso não são mostrados.

4.6 Análises populacionais de *O. nigripes* com *citb*

4.6.1 Análises populacionais clássicas

Foram utilizados 38 espécimes de *O. nigripes* distribuídos em cinco subpopulações (Tabela 3-6) para as análises populacionais com o *citb* realizadas com $s/v = 4$ e $\alpha = 0,28$ (veja item 4.2.1). Além disso, foram permitidos 5% de indefinição em cada sítio, dando um total de 791 posições utilizáveis. A Tabela 4-9 resume os principais dados para as populações e para o total dos indivíduos

Tabela 4-9. Listas das subpopulações analisadas discriminando tamanho amostral (n), número de haplótipos de *citb*, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), índice de neutralidade F_S para cada subpopulação e para o total dos indivíduos. p = significância de F_S . Em cinza estão os valores significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-6.

Subpopulação	n	Haplótipos	Sítios Polimórficos	h	π	F_S (p)
ES	7	7	16	1,0	0,0047	-0,52 (0,04)
PAR	3	3	2	1,0	0,0013	-0,08 (0,08)
RJ	10	10	14	1,0	0,0038	-1,48 (0,02)
RS	8	8	21	1,0	0,0086	-1,85 (0,02)
SC	10	10	22	1,0	0,0091	-1,36 (0,03)
Total	38	38	57	1,0	0,0078	-21,7 (0,00)

Encontramos 38 haplótipos de *citb*, com 57 sítios variáveis. Podemos perceber que as duas subpopulações mais polimórficas (com maior quantidade de sítios variáveis e maior valor de π) foram RS e SC, seguidas por ES e RJ, e a subpopulação PAR com a menor diversidade molecular. Não existe haplótipo compartilhado por mais de um indivíduo. O valor de F_S foi negativo e significativo para todas as subpopulações, menos para a subpopulação do Paraguai.

Ainda considerando as cinco subpopulações, a Tabela 4-10 mostra os valores de F_{ST} par a par. Apenas o valor entre RS e SC não foi significativamente diferente de zero. As diferenciações RJ-ES, PAR-RS e RJ-SC são moderadas, as diferenciações entre ES-SC, RS-RJ e PAR-SC são grandes, e as diferenciações entre ES-PAR, ES-RS e RJ-PAR são extremas.

Tabela 4-10. Cálculo do índice de fixação F_{ST} , para cada par de subpopulações. Os valores em cinza são considerados significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-6.

	ES	RJ	PAR	RS
RJ	0,134			
PAR	0,624	0,315		
RS	0,334	0,193	0,134	
SC	0,214	0,100	0,213	0,048

Nas Figuras 4-28 e 4-29 estão os gráficos da distribuição de diferenças de substituições entre pares de haplótipos, para um modelo de expansão demográfica e espacial, respectivamente. Essa análise foi realizada com todas as populações juntas, pois para cada população o resultado não é significativo (não mostrado), provavelmente devido ao baixo número de indivíduos. Para ambas as análises, a curva observada não foi significativamente diferente do esperado para uma expansão demográfica ($p=0,02$) e uma expansão espacial ($p=0,03$).

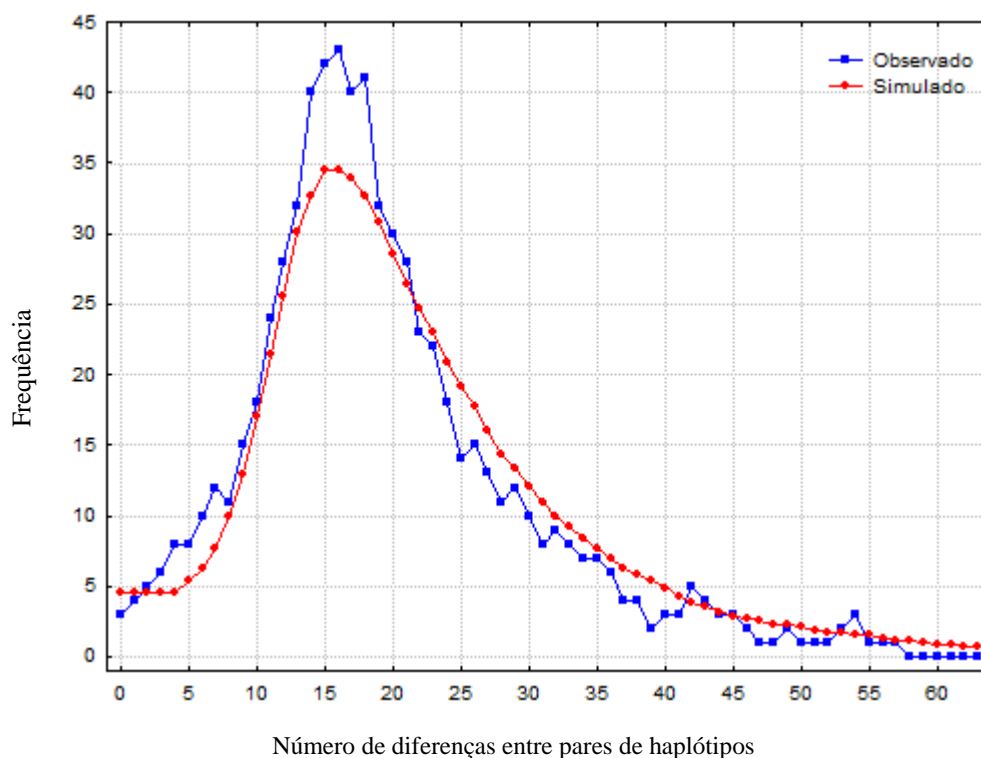


Figura 4-28. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de *citb* (linha azul) e a simulação de uma expansão demográfica (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de *O. nigripes* como uma única população.

Para a AMOVA, foram considerados dois grupos de subpopulações: grupo 1 (ES+RJ) e grupo 2 (PAR+SC+RS). Essa análise mostrou que 79,1% ($p=0$) da variação são diferenças dentro das subpopulações, e 14,1% ($p=0,0004$) da variação representa diferenças entre as subpopulações dentro dos grupos. A Tabela 4-11 sumariza esses dados.

Tabela 4-11. Resumo da Análise Molecular de Variância (AMOVA) com *citb* para os grupos (ES+RJ) e (PAR+SC+RS). gl=graus de liberdade; *p*=significância. Em cinza estão os valores significantes.

Fonte de Variação	gl	Componentes da variância	% da variação	<i>p</i>
Entre grupos	1	$\Phi_{CT} = 0,068$	6,8	0,09
Entre subpopulações dentro dos grupos	3	$\Phi_{SC} = 0,152$	14,1	0,004
Dentro das subpopulações	33	$\Phi_{ST} = 0,209$	79,1	0

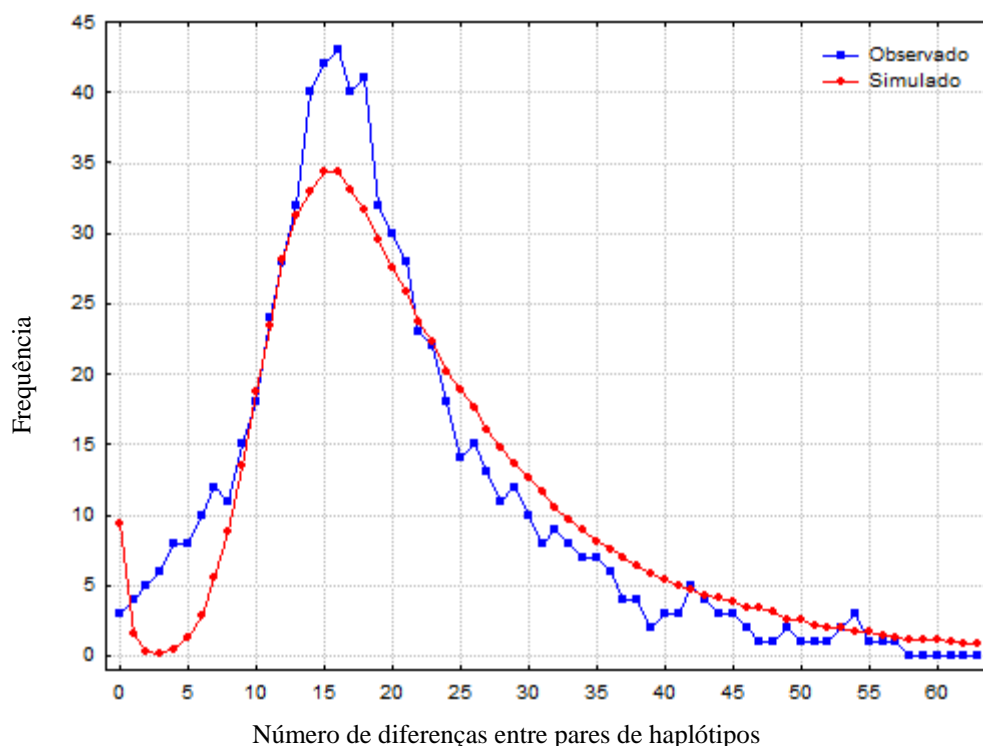


Figura 4-29. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de *citb* (linha azul) e a simulação de uma expansão espacial (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de *O. nigrripes* como uma única população.

4.6.2 Análises populacionais por coalescência

A Figura 4-30 mostra o gráfico dos *traces* da probabilidade posterior dos parâmetros encontrados, indicando a convergência dentro e entre as duas corridas independentes. Todos os parâmetros tiveram ESS > 200.

Na Tabela 4-12 estão indicados os principais parâmetros calculados pelo programa BEAST. Nela, é possível perceber que a taxa de crescimento populacional é maior que zero, e a população atual é maior que a população do ancestral comum mais recente. A taxa do relógio molecular relaxado foi similar ao encontrado em 4.5.

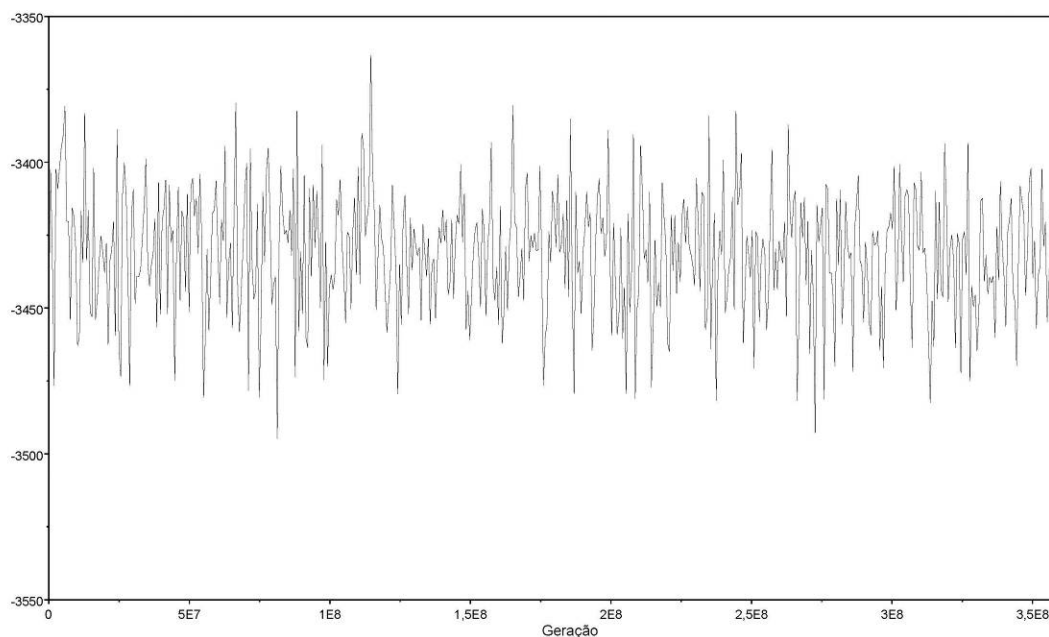


Figura 4-30. Gráfico dos *traces* mostrando o valor da verossimilhança da probabilidade posterior por geração da cadeia de Markov encontrados pelo programa BEAST para *citb*.

Tabela 4-12. Parâmetros encontrados pelo programa BEAST para as subpopulações de *O. nigripes* com *citb*, indicando a média e a estimativa de 95% de densidade posterior máxima e mínima, utilizando *O. stramineus* como grupo de fora.

Parâmetro	média	95% mín.	95% máx.
Taxa do relógio molecular relaxado*	0,0375	0,0374	0,0377
Tamanho da população atual	0,580	0,06	1,52
Taxa de crescimento da população	515,87	136,48	986,82
Tamanho da população ancestral	0,015	0,00001	0,05
tMRCA** - <i>O. nigripes</i>	0,219	0,161	0,462
tMRCA** - <i>O. stramineus</i>	0,089	0,088	0,09
tMRCA** - Subpopulação PAR	0,043	0,006	0,091
tMRCA** - Subpopulação ES	0,141	0,083	0,22
tMRCA** - Subpopulação RJ	0,188	0,111	0,281
tMRCA** - Subpopulação RS	0,204	0,123	0,301
tMRCA** - Subpopulação SC	0,21	0,125	0,326

* substituições por sítio por milhão de anos.

** tempo até o ancestral comum mais recente, em milhões de anos.

A Figura 4-31 mostra a variação do tempo até o ancestral comum mais recente (Tabela 4-12) das subpopulações de *O. nigripes* e de *O. stramineus*. Os valores encontrados para *O. nigripes* e *O. stramineus* são compatíveis com os valores encontrados pela datação molecular de *Oligoryzomys*, no item 4.5. A subpopulação mais recente é PAR, diferenciada há aproximadamente 43 mil anos, seguida pela subpopulação ES, há 141 mil anos.

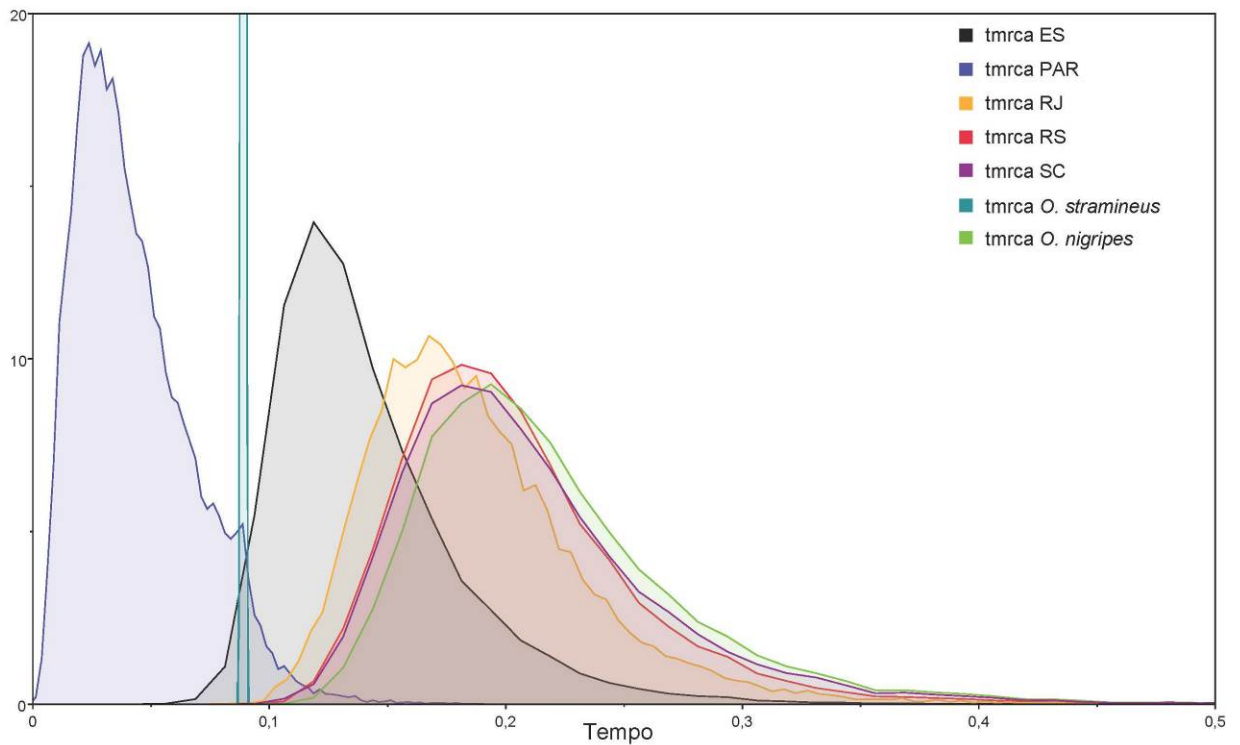


Figura 4-31. Gráfico da densidade posterior mostrando a variação do tempo até o ancestral comum mais recente (tmrca) em milhões de anos, das subpopulações de *O. nigripes* e de *O. stramineus*, a partir de *citb*. Tempo mais recente=0.

A Tabela 4-13 mostra os parâmetros encontrados pelo programa LAMARC. Esses dados também indicam um crescimento populacional ($g > 0$), exceto para a subpopulação do Paraguai. Para o tamanho populacional coalescente (θ), vemos que a subpopulação do Paraguai é a menor (ordem de magnitude -3), as subpopulações de ES e RJ são intermediárias (ordem de magnitude -2), e as subpopulações de SC e RS são as maiores (ordem de magnitude -1). Comparando as taxas de migração (M) entre as subpopulações, é possível perceber que todas as taxas dentro dos grupos ES+RJ e RS+SC+PAR possuem ordem de magnitude ≥ 1 (exceto as taxas do Paraguai para SC e RS) e todas as taxas entre subpopulações desses grupos possuem ordem de magnitude ≤ -3 .

A Figura 4-32 sumariza os dados de fluxo gênico (F_{ST} e M) entre as subpopulações de *O. nigripes* a partir dos dados obtidos com *citb*.

Tabela 4-13. Parâmetros estimados pelo programa LAMARC para *citb*, com o valor da estimativa de máxima verossimilhança (MLE) e os valores de confiança superior e inferior, para as subpopulações de *O. nigripes* definidas na tabela 3-6. Os valores estão em notação científica para facilitar comparações.

Parâmetro	MLE	95% mín.	95% máx.
θ1 – tamanho populacional de ES	1,29E-02	2,96E-03	1,86E-02
θ2 – tamanho populacional de PAR	1,10E-03	2,19E-04	1,52E-03
θ3 – tamanho populacional de RJ	4,30E-02	1,19E-02	6,91E-02
θ4 – tamanho populacional de RS	2,22E-01	6,65E-02	2,98E-01
θ5 – tamanho populacional de SC	1,73E-01	5,19E-02	2,24E-01
g1 – crescimento populacional de ES	9,37E+02	1,49E+02	1,66E+03
g2 – crescimento populacional de PAR	-1,41E+03	-1,26E+03	-1,49E+02
g3 – crescimento populacional de RJ	8,75E+02	5,65E+01	1,95E+03
g4 – crescimento populacional de RS	3,99E+02	4,99E+01	9,15E+02
g5 – crescimento populacional de SC	3,55E+01	-1,50E+01	1,49E+02
M21 – taxa de migração de PAR para ES	4,27E-06	1,06E-06	7,55E-06
M31 – taxa de migração de RJ para ES	7,72E+02	1,92E+02	1,00E+03
M41 – taxa de migração de RS para ES	1,40E-03	2,50E-04	1,91E-03
M51 – taxa de migração de SC para ES	3,70E-06	9,15E-07	6,91E-06
M12 – taxa de migração de ES para PAR	3,68E-06	9,10E-07	7,69E-06
M32 – taxa de migração de RJ para PAR	1,50E-03	2,65E-04	4,95E-03
M42 – taxa de migração de RS para PAR	4,27E+02	1,06E+02	5,55E+02
M52 – taxa de migração de SC para PAR	1,25E+03	2,12E+02	1,62E+03
M13 – taxa de migração de ES para RJ	5,30E+01	1,22E+01	6,99E+01
M23 – taxa de migração de PAR para RJ	1,06E-03	8,64E-04	1,26E-03
M43 – taxa de migração de RS para RJ	1,72E-05	6,20E-06	4,14E-05
M53 – taxa de migração de SC para RJ	2,93E-06	6,22E-07	6,91E-06
M14 – taxa de migração de ES para RS	2,08E-03	5,10E-04	1,60E-03
M24 – taxa de migração de PAR para RS	4,10E-04	1,02E-04	9,22E-04
M34 – taxa de migração de RJ para RS	2,21E-06	5,52E-07	8,96E-06
M54 – taxa de migração de SC para RS	1,36E+02	2,40E+01	1,66E+03
M15 – taxa de migração de ES para SC	8,80E-06	1,10E-06	2,14E-07
M25 – taxa de migração de PAR para SC	7,02E-06	1,66E-06	2,12E-05
M35 – taxa de migração de RJ para SC	9,80E-05	1,45E-05	3,16E-04
M45 – taxa de migração de RS para SC	2,51E+02	6,19E+01	2,16E+03

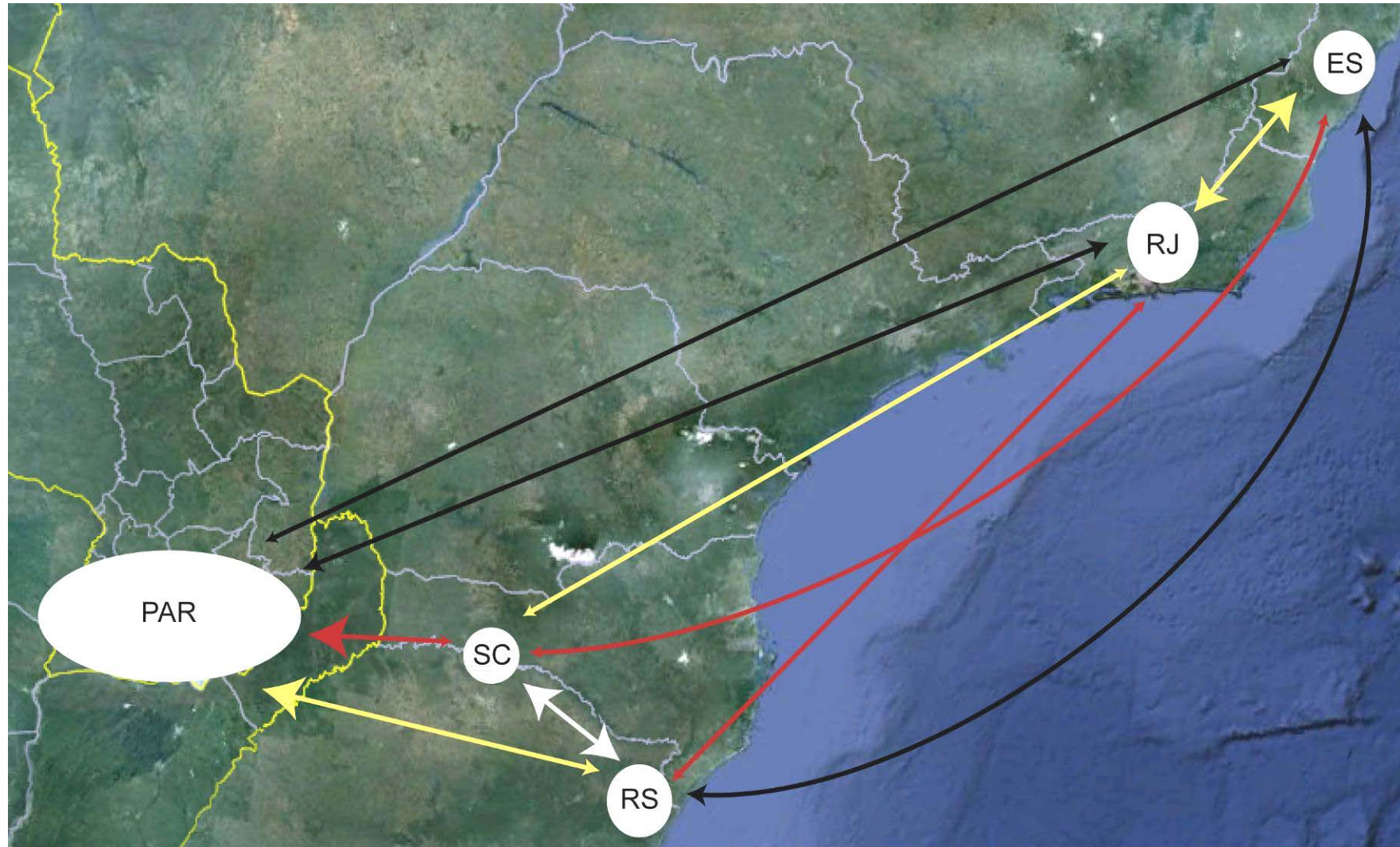


Figura 4-32. Mapa mostrando as subpopulações de *O. nigripes* analisadas com citb: PAR (Paraguai), SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), RJ (Rio de Janeiro) e ES (Espírito Santo). A cor das setas indicam valores de F_{ST} , entre 0 e 0,05 (branca), entre 0,05 e 0,15 (amarelas), entre 0,15 e 0,25 (vermelhas) e acima de 0,25 (pretas). O tamanho da ponta da seta indica os valores de M : setas menores indicam valores menores de M .

4.6.3 Rede de haplótipos

Na análise de MJ foram encontrados 47 haplótipos entre os 66 indivíduos utilizados, com 72 sítios variáveis. A Figura 4-33 mostra a rede de haplótipos de *O. nigripes* com *citb*. Existem cinco vetores médios e 11 haplótipos são compartilhados. O número de haplótipos é menor aqui pois essa análise não considera os sítios indefinidos. A rede exibe um formato de estrela, com um haplótipo central compartilhado por cinco indivíduos (4 de SC e 1 de RS), e os outros haplótipos conectados a ele. Além do haplótipos central, outros dois haplótipos também são compartilhados entre indivíduos de SC e RS. Outro haplótipo é compartilhado entre indivíduos de ES e MG. O haplótipo que mais se diferencia do haplótipo central (11 mutações) é do indivíduo da província de Buenos Aires, Argentina.

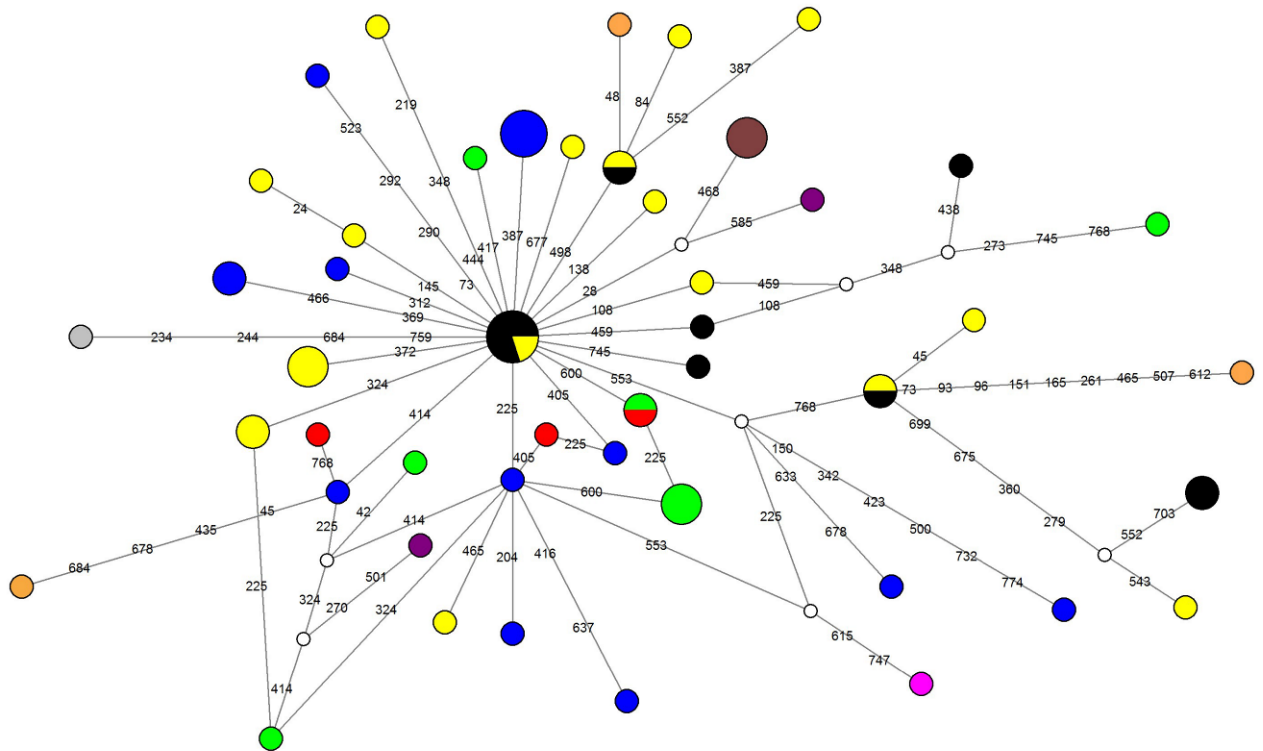


Figura 4-33. Rede de haplótipos *median-joining* de *O. nigripes* a partir de *citb*. Os números indicam as posições das mutações entre cada haplótipos. Os círculos brancos representam os vetores médios. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos compartilhando o haplótipo, verde representa haplótipos do ES, azul do RJ, amarelo do RS, preto de SC, roxo de SP, rosa de GO, vermelho de MG, laranja da Argentina, marrom do Paraguai e cinza do Uruguai.

4.7 Análises populacionais de *O. nigripes* com *coi*

4.7.1 Análises populacionais clássicas

Nas análises populacionais com o *coi* foram utilizados 64 espécimes de *O. nigripes* distribuídos em sete subpopulações (Tabela 3-7). As análises desses dados foram realizadas com $s/v = 5$ e forma da distribuição $\text{gama} = 0,16$ (veja item 4.3.1). Além disso, foram permitidos 5% de indefinições em cada sítio, com um total de 1465 posições usáveis. A Tabela 4-14 resume os principais dados para as populações e para o total dos indivíduos.

Encontramos um total de 58 haplótipos de *coi*, com 118 sítios variáveis, e poucos haplótipos compartilhados por mais de um indivíduo. A partir desses dados podemos perceber que a subpopulação RS possui maior diversidade genética em relação às outras populações (maior valor de π). O valor de F_S foi significativo e negativo apenas para as subpopulações PR, SC e RJ e para o total de indivíduos.

Tabela 4-14. Listas das subpopulações analisadas discriminando o tamanho amostral (n), número de haplótipos de *coi*, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), índice de neutralidade F_S para cada população e para o total dos indivíduos. p = significância de F_S . Em cinza estão os valores significativos. Os códigos das subpopulações de estão na tabela 3-7.

População	n	Haplótipos	Sítios Polimórficos	h	π	F_S (p)
ES	5	4	17	0,99	0,0037	4,01 (0,83)
GO	6	6	26	1,0	0,0083	1,25 (0,09)
PR	9	9	29	1,0	0,0071	-0,017 (0,02)
RJ	18	17	42	0,99	0,0049	-2,36 (0,01)
RS	4	4	32	1,0	0,0116	2,5 (0,13)
SC	13	13	48	1,0	0,0092	-1,04 (0,02)
SP	5	5	15	1,0	0,0055	1,13 (0,1)
Total	60	58	118	0,99	0,0078	-19,4 (0)

A Tabela 4-15 mostra os valores de F_{ST} par a par considerando as sete subpopulações. Os valores entre PR-RS, PR-SC e RS-SC não foram significativamente diferente de zero. As diferenciações ES-RJ são moderadas, as diferenciações entre ES-GO, ES-PR, ES-RS, ES-SC, RJ-PR, RJ-SP, RJ-SC, SP-PR, SP-RS, SP-SC, GO-PR e GO-SP são grandes, e as diferenciações entre ES-SP, RJ-GO, RJ-RS, GO-RS e GO-SC são extremas.

Tabela 4-15. Cálculo do índice de fixação F_{ST} , para cada par de subpopulações. Os valores em cinza são significativos. Os códigos das subpopulações estão na tabela 3-7.

	ES	RJ	GO	PR	SP	RS
RJ	0,106					
GO	0,182	0,255				
PR	0,223	0,194	0,187			
SP	0,261	0,219	0,208	0,019		
RS	0,231	0,282	0,27	-0,07	0,173	
SC	0,222	0,230	0,285	0,01	0,018	-0,056

Nas Figuras 4-34 e 4-35 estão os gráficos da distribuição de diferenças de substituições entre pares de haplótipos, para um modelo de expansão demográfica e espacial, respectivamente. Essas análises foram realizadas com todas as subpopulações juntas, pois para cada população o resultado não é significativo (não mostrado), provavelmente devido ao baixo número de indivíduos. Para ambas as análises, a curva observada não foi significativamente diferente do esperado para uma expansão demográfica ($p=0,04$) e uma expansão espacial ($p=0,03$).

Para a AMOVA consideramos quatro grupos de subpopulações: grupo 1 (GO1), grupo 2 (ES+RJ), grupo 3 (SP+PR) e grupo 4 (RS+SC). Essa análise mostrou que 82,76% ($p=0$) da variação são diferenças dentro das subpopulações, e 13,86% ($p=0,009$) da variação representa diferenças entre os grupos. A tabela 4-16 sumariza esses dados.

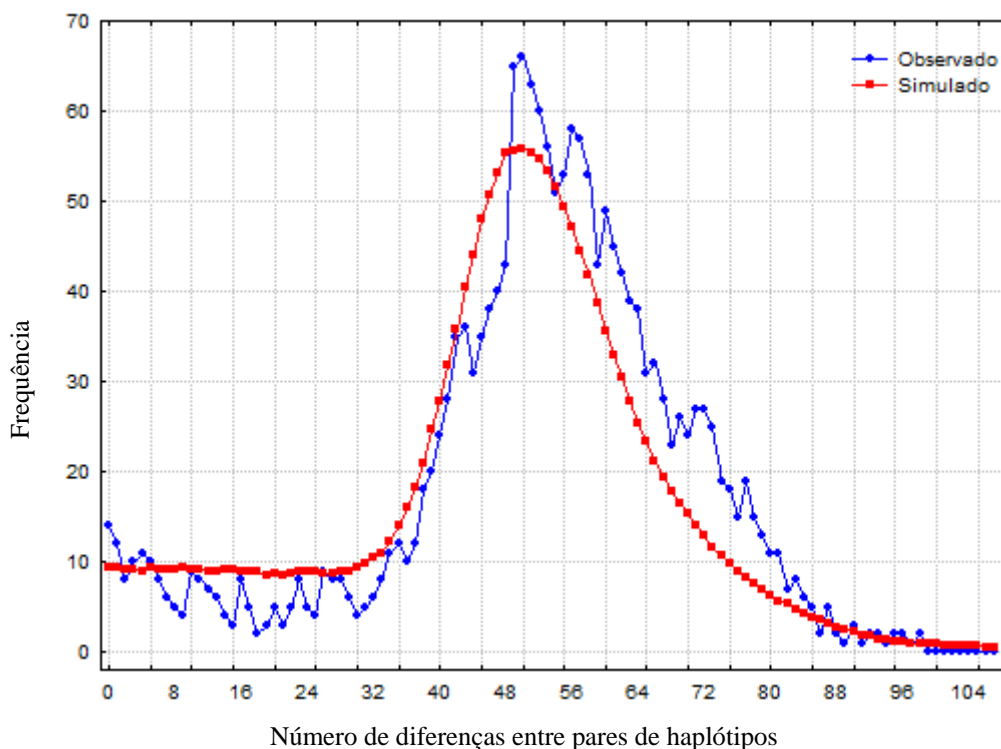


Figura 4-34. Gráfico mostrando a distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de *coi* (linha azul) e a simulação de uma expansão demográfica (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de *O. nigripes* como uma única população.

Tabela 4-16. Resumo da Análise Molecular de Variância (AMOVA) com *coi* para quatro grupos (GO, ES+RJ, SP+PR, RS+SC). gl = graus de liberdade; *p*=significância. Em cinza estão os valores significantes.

Fonte de Variação	gl	Componentes da variância	% da variação	<i>p</i>
Entre grupos	3	$\Phi_{CT} = 0,138$	13,86	0,009
Entre subpopulações dentro dos grupos	3	$\Phi_{SC} = 0,039$	3,38	0,14
Dentro das subpopulações	53	$\Phi_{ST} = 0,172$	82,76	0

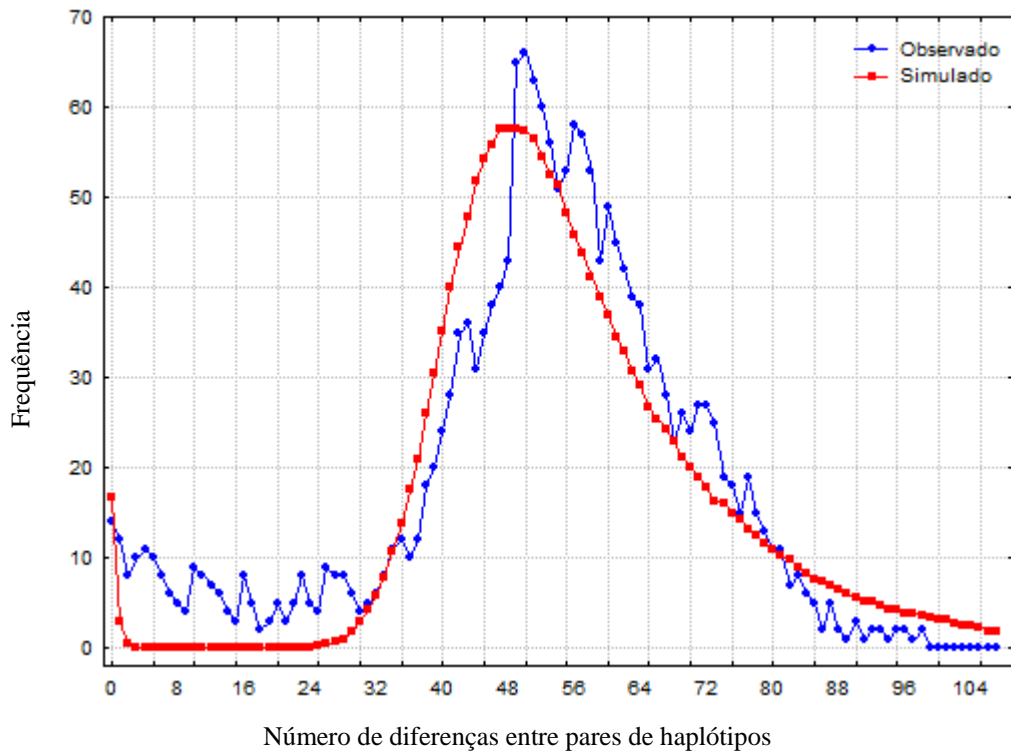


Figura 4-35. Gráfico mostrando distribuição do número observado de diferenças entre pares de haplótipos de *coi* (linha azul) e a simulação de uma expansão espacial (linha vermelha), considerando todos os indivíduos de *O. nigripes* como uma única população.

4.7.2 Análises populacionais por coalescência

A Figura 4-36 mostra o gráfico dos *traces* da probabilidade posterior dos parâmetros encontrados, indicando a convergência dentro e entre as duas corridas independentes. Todos os parâmetros tiveram ESS>200.

Na Tabela 4-17 estão indicados os principais parâmetros calculados pelo programa BEAST. Nela, é possível perceber que a taxa de crescimento populacional é maior que zero, e a população atual é maior que a população do ancestral comum mais recente. A taxa do relógio molecular relaxado foi similar ao encontrado no item 4.5.

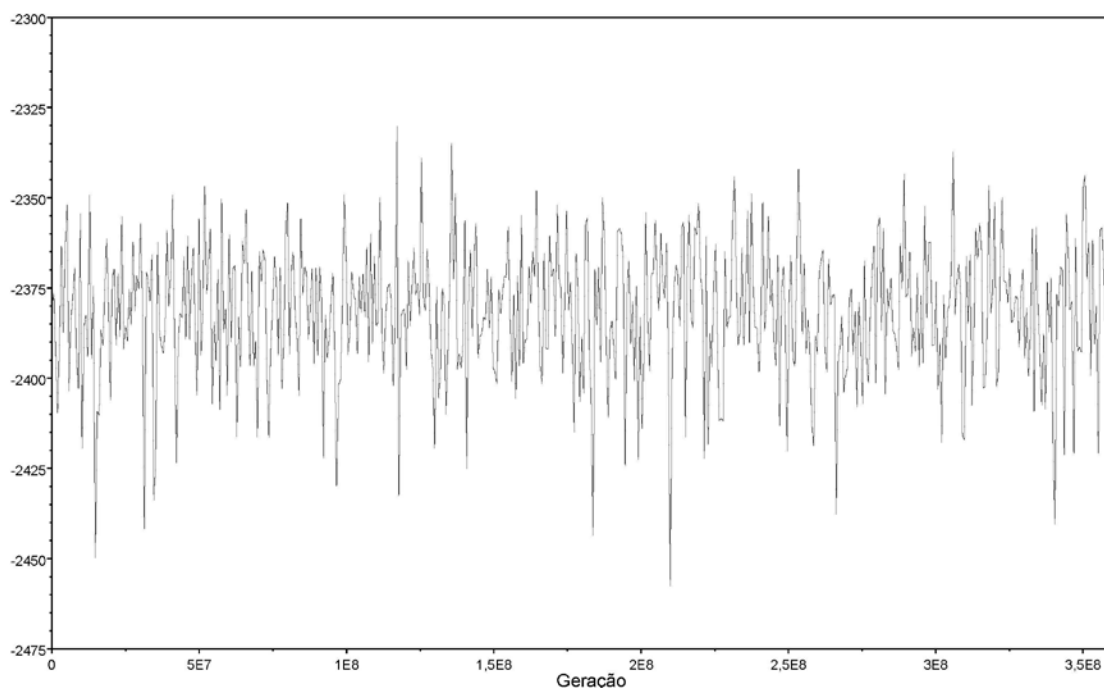


Figura 4-36. Gráfico dos *traces* referente à probabilidade posterior dos parâmetros encontrados pelo programa BEAST para *coi*.

A Figura 4-37 representa o gráfico de densidade posterior do tempo até o ancestral comum mais recente (Tabela 4-17) das subpopulações *O. nigripes* e *O. stramineus*. Os valores encontrados para *O. nigripes* e *O. stramineus* são compatíveis com os valores encontrados em 4.5. A subpopulação mais recente é ES, diferenciando-se há aproximadamente 112 mil anos.

Tabela 4-17. Parâmetros encontrados pelo programa BEAST para as subpopulações de *O. nigripes* com *coi*, indicando a média e a estimativa de 95% de densidade posterior máxima e mínima, utilizando *O. stramineus* como grupo de fora.

Parâmetro	média	95% mín.	95% máx.
Taxa do relógio molecular relaxado*	0,0376	0,0374	0,0378
Tamanho da população atual	0,580	0,06	1,52
Taxa de crescimento da população	515,87	136,48	986,82
Tamanho da população ancestral	0,015	0,00001	0,05
<i>O. nigripes</i> **	0,198	0,128	0,28
<i>O. stramineus</i> **	0,089	0,088	0,09
TMRCA** - Subpopulação ES	0,112	0,074	0,154
TMRCA** - Subpopulação RJ	0,165	0,104	0,236
TMRCA** - Subpopulação GO	0,168	0,103	0,243
TMRCA** - Subpopulação SP	0,178	0,113	0,253
TMRCA** - Subpopulação PR	0,188	0,12	0,271
TMRCA** - Subpopulação RS	0,191	0,122	0,271
TMRCA** - Subpopulação SC	0,193	0,112	0,264

* substituições por sítio por milhão de anos.

** tempo até o ancestral comum mais recente, em milhões de anos.

A Tabela 4-18 mostra os parâmetros encontrados pelo programa LAMARC, indicando um crescimento populacional ($g>0$), exceto para as subpopulações ES e SP. Para o tamanho populacional coalescente (θ), vemos que a subpopulação ES é a menor (ordem de magnitude -4), seguida pela subpopulação GO (ordem de magnitude -3), as subpopulações SP e RJ são intermediárias (ordem de magnitude -2), e as subpopulações SC, RS e PR são as maiores (ordem de magnitude -1). Comparando as taxas de migração (M) entre as subpopulações, é possível perceber que a maior parte das taxas dentro dos grupos ES+RJ+GO+SP e RS+SC+PR possuem ordem de magnitude ≥ 1 e a maior parte das taxas entre subpopulações desses grupos possuem ordem de magnitude ≤ -3 .

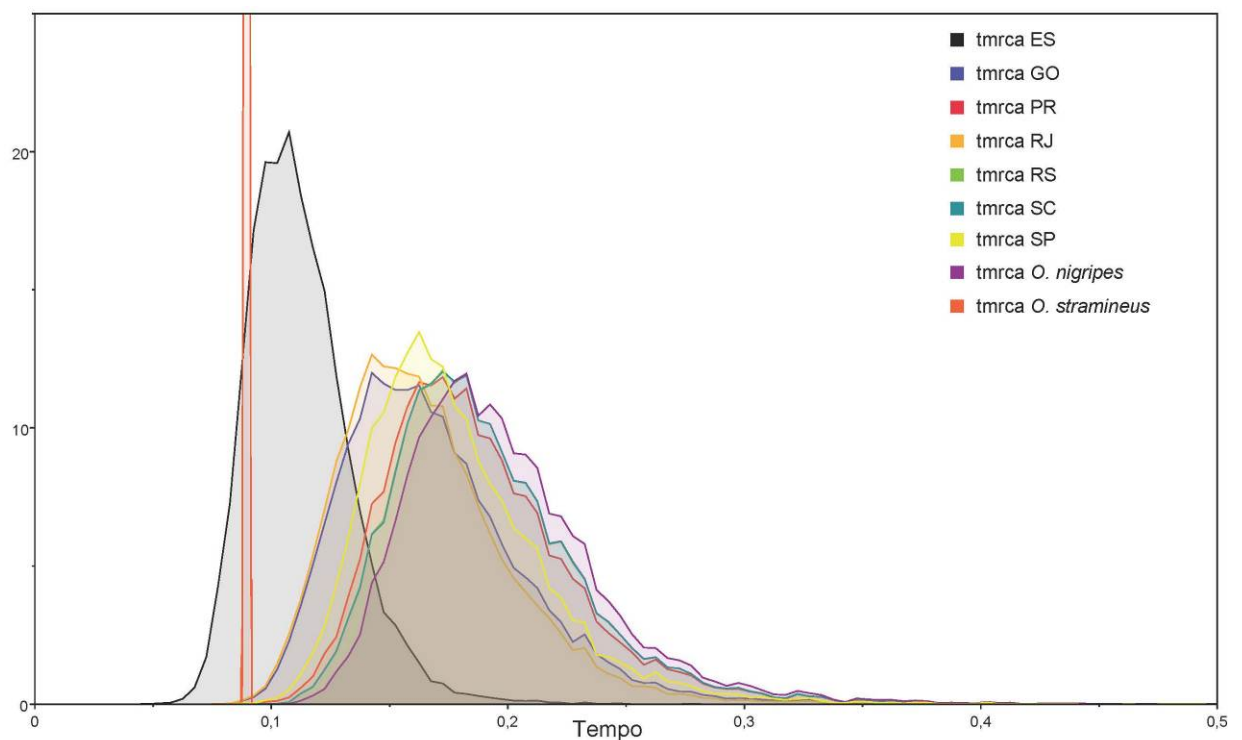


Figura 4-37. Gráfico da densidade posterior do tempo até o ancestral comum mais recente (tmrca), em milhões de anos, de *O. stramineus*, *O. nigripes* e suas subpopulações, a partir de *coi*.

Tabela 4-18. Parâmetros estimados pelo programa LAMARC para *coi*, com o valor da estimativa de máxima verossimilhança (MLE) e os valores de confiança superior e inferior, para as subpopulações de *O. nigripes* definidas na tabela 3-7. Os valores estão em notação científica para facilitar comparações.

Parâmetro	MPE	95% mín.	95% máx.
θ1 – tamanho populacional de ES	3,83E-04	1,15E-04	6,17E-04
θ2 – tamanho populacional de GO	2,49E-03	7,47E-04	9,36E-03
θ3 – tamanho populacional de PR	5,86E-01	1,76E-01	8,92E-01
θ4 – tamanho populacional de RJ	7,19E-02	1,16E-02	9,70E-02
θ5 – tamanho populacional de RS	9,97E-01	2,99E-01	1,35E+00
θ6 – tamanho populacional de SC	1,08E-01	3,23E-02	6,45E-01
θ7 – tamanho populacional de SP	1,31E-02	3,93E-03	8,77E-02
g1 – crescimento populacional de ES	-9,22E+02	-3,47E+03	-1,03E+02

Continuação da Tabela 4-14

Parâmetro	MPE	95% mín.	95% máx.
g2 – crescimento populacional de GO	1,56E+02	6,24E+01	7,66E+02
g3 – crescimento populacional de PR	6,10E+02	6,17E+01	2,68E+03
g4 – crescimento populacional de RJ	4,61E+02	8,49E+01	9,75E+02
g5 – crescimento populacional de RS	8,16E+02	1,46E+02	3,54E+03
g6 – crescimento populacional de SC	4,54E-01	-1,24E+02	2,04E+01
g7 – crescimento populacional de SP	-5,47E+02	-1,03E+03	-2,80E+01
M21 – taxa de migração de GO para ES	1,70E+03	4,25E+02	6,21E+03
M31 – taxa de migração de PR para ES	3,80E-04	8,40E-05	8,84E-04
M41 – taxa de migração de RJ para ES	1,82E+03	4,44E+02	6,27E+03
M51 – taxa de migração de RS para ES	3,14E-03	6,84E-04	7,08E-03
M61 – taxa de migração de SC para ES	7,66E-04	1,81E-04	2,85E-03
M71 – taxa de migração de SP para ES	3,65E+03	8,12E+02	2,64E+04
M12 – taxa de migração de ES para GO	1,10E-03	2,64E-04	6,43E-03
M32 – taxa de migração de PR para GO	3,29E-03	7,22E-04	9,27E-03
M42 – taxa de migração de RJ para GO	1,42E+02	2,44E+01	1,85E+03
M52 – taxa de migração de RS para GO	4,41E-04	1,10E-04	8,62E-04
M62 – taxa de migração de SC para GO	4,61E-03	1,14E-03	9,88E-03
M72 – taxa de migração de SP para GO	2,84E+02	6,10E+01	8,68E+02
M13 – taxa de migração de ES para PR	2,00E-04	4,00E-05	8,60E-04
M23 – taxa de migração de GO para PR	1,38E-04	2,44E-05	7,68E-04
M43 – taxa de migração de RJ para PR	3,62E+01	8,04E+00	9,60E+01
M53 – taxa de migração de RS para PR	5,43E+02	1,25E+02	1,06E+03
M63 – taxa de migração de SC para PR	3,66E+02	8,14E+01	4,64E+03
M73 – taxa de migração de SP para PR	1,77E-04	4,42E-05	8,20E-04
M14 – taxa de migração de ES para RJ	2,17E+02	4,42E+01	2,82E+03
M24 – taxa de migração de GO para RJ	2,89E+02	6,23E+01	8,65E+02
M34 – taxa de migração de PR para RJ	1,22E+02	2,05E+01	1,48E+03
M54 – taxa de migração de RS para RJ	1,28E-04	2,20E-05	8,66E-04
M64 – taxa de migração de SC para RJ	2,19E-04	4,46E-05	7,85E-04
M74 – taxa de migração de SP para RJ	3,38E+02	8,45E+01	8,28E+02
M15 – taxa de migração de ES para RS	3,05E-04	6,62E-05	7,86E-03
M25 – taxa de migração de GO para RS	3,68E-04	8,20E-05	8,68E-04
M35 – taxa de migração de PR para RS	6,25E+01	1,46E+01	3,12E+02
M45 – taxa de migração de RJ para RS	4,58E-04	1,14E-04	2,84E-03
M65 – taxa de migração de SC para RS	1,36E+03	2,28E+02	9,66E+03
M75 – taxa de migração de SP para RS	2,55E-04	6,26E-05	8,21E-04
M16 – taxa de migração de ES para SC	6,97E-05	1,64E-05	2,06E-03
M26 – taxa de migração de GO para SC	1,75E-04	4,26E-05	7,26E-04
M36 – taxa de migração de PR para SC	3,70E+01	8,24E+00	8,81E+01
M46 – taxa de migração de RJ para SC	8,77E-05	1,18E-05	2,14E-04
M56 – taxa de migração de RS para SC	1,74E+02	4,24E+01	8,25E+02
M76 – taxa de migração de SP para SC	2,24E-04	4,60E-05	7,81E-04
M17 – taxa de migração de ES para SP	1,69E+02	4,22E+01	8,18E+02
M27 – taxa de migração de GO para SP	5,91E+02	1,47E+02	6,69E+02
M37 – taxa de migração de PR para SP	2,75E-04	6,86E-05	8,46E-04
M47 – taxa de migração de RJ para SP	7,23E+01	1,81E+01	2,40E+02
M57 – taxa de migração de RS para SP	4,61E-04	1,14E-04	2,88E-03
M67 – taxa de migração de SC para SP	2,28E-04	4,60E-05	9,86E-04

A Figura 4-32 sumariza os dados de fluxo gênico (F_{ST} e M) entre as subpopulações de *O. nigripes* a partir dos dados obtidos com *citb*.

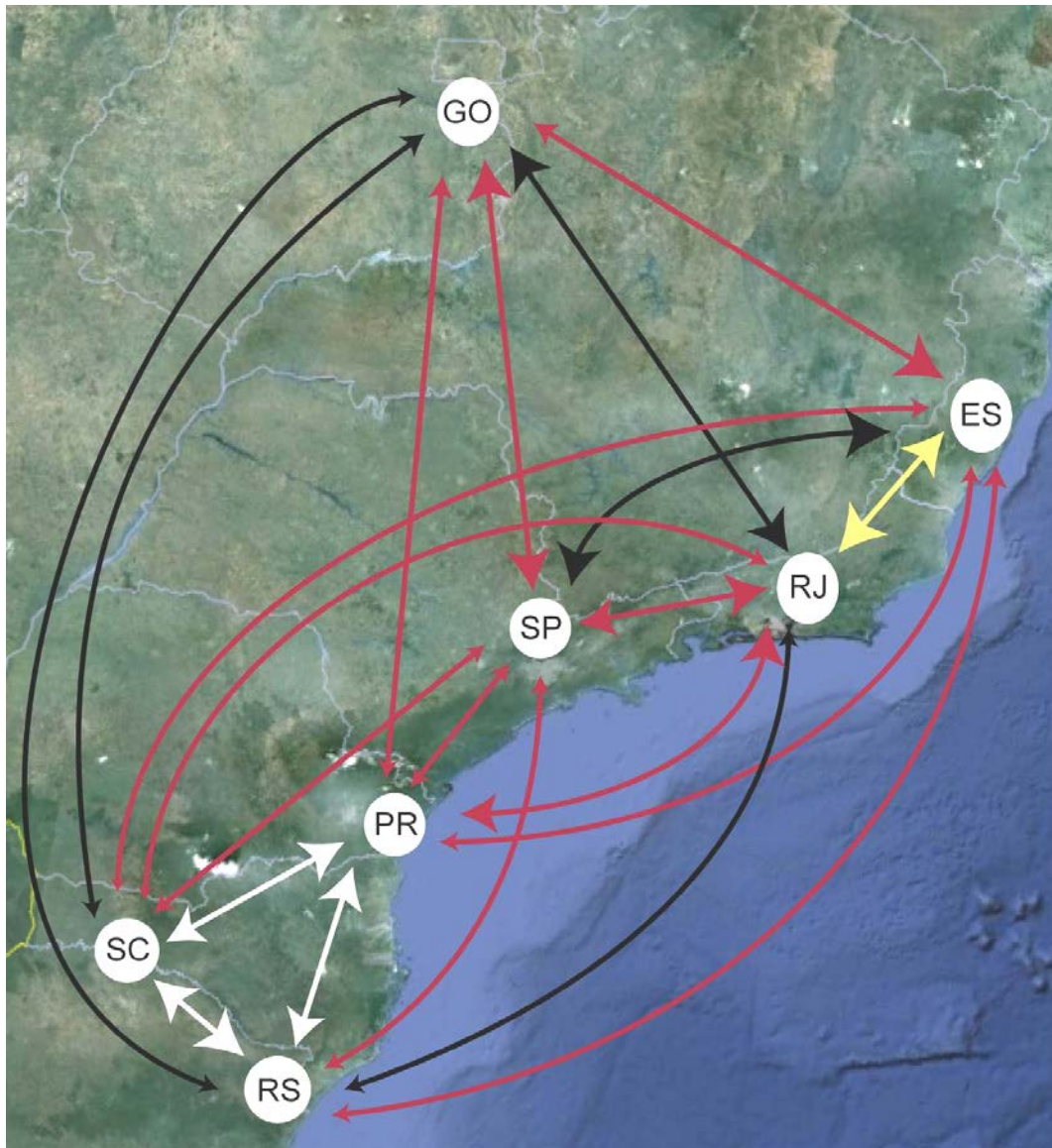


Figura 4-38. Mapa mostrando as subpopulações de *O. nigripes* analisadas com *coi*: SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro), ES (Espírito Santo) e GO (Goiás). A cor das setas indicam valores de F_{ST} , entre 0 e 0,05 (branca), entre 0,05 e 0,15 (amarelas), entre 0,15 e 0,25 (vermelhas) e acima de 0,25 (pretas). O tamanho das pontas das setas referem-se aos valores de M : setas menores indicam valores menores de M .

4.7.3 Rede de haplótipos

Na análise de MJ foram encontrados 46 haplótipos em 63 indivíduos utilizados, com 113 sítios variáveis. O número de haplótipos é menor aqui, pois essa análise não considera os sítios indefinidos. A Figura 4-39 mostra a rede de haplótipos de *O. nigripes* com *coi*. Apesar do aparente formato de estrela, não existe um haplótipos central, e apenas onze haplótipos são compartilhados, sendo que um desses haplótipos é compartilhado por indivíduos de SC e PR, e outro é compartilhado por indivíduos de PR e RS. Além disso, existem 19 vetores médios.

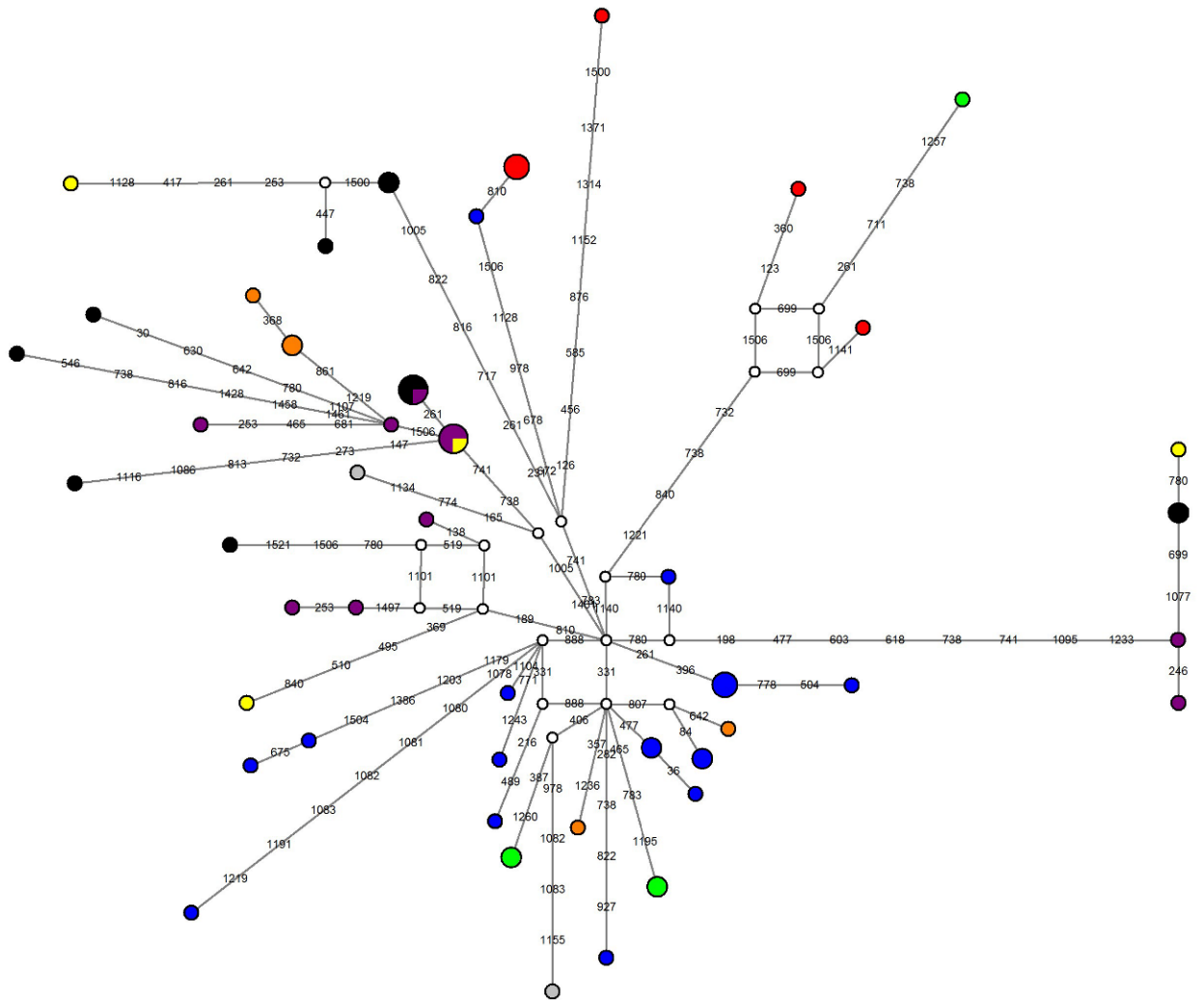


Figura 4-39. Rede de haplótipos *median-joining* de *O. nigripes* com *coi*. Os números indicam as posições das mutações entre cada haplótipos. Os círculos brancos representam os vetores médios. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos, verde representa haplótipos do ES, azul do RJ, amarelo do RS, preto de SC, roxo de PR, vermelho de GO, cinza de MG e laranja de SP.

4.8 Análises morfométricas

4.8.1 Descrição dos dados

O teste t para detectar dimorfismo sexual foi realizado para cada uma das 17 variáveis, separadamente para cada uma das cinco espécies. Não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$), e por isso todas as análises morfométricas foram realizadas com machos e fêmeas juntos. Os valores de t e sua significância, assim como os gráficos de *Box & Whisker*, estão nos Anexos II a VI. Além disso, a distribuição de todas as variáveis se encaixa a uma distribuição normal (não mostrado). A Tabela 4-19 mostra um resumo das estatísticas descritivas, com os valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo para cada uma das variáveis.

Tabela 4-19. Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo para cada uma das 17 variáveis, separados por espécie. As variáveis foram descritas no item 3.5.1.

	<i>O. fornesi</i> (n=12)	<i>O. moojeni</i> (n=21)	<i>O. nigripes</i> (n=46)	<i>O. stramineus</i> (n=13)	<i>O. utiaritensis</i> (n=39)
GSL	22,44±1,07 (20,57-24,14)	23,04±1,17 (21,47-24,83)	24,36±1,23 (21,79-27,26)	26,40±1,12 (24,96-28,50)	24,69±0,68 (23,54-26,18)
CIL	19,83±1,02 (18,39-21,43)	20,53±1,25 (18,79-22,56)	21,67±1,27 (19,31-24,49)	23,76±1,11 (22,23-25,87)	22,16±0,68 (20,86-23,31)
M1M	4,14±0,22 (3,86-4,51)	4,34±0,18 (3,87-4,68)	4,29±0,17 (3,95-4,57)	4,71±0,18 (4,38-5,00)	4,40±0,15 (4,15-4,80)
LD	5,54±0,34 (5,08-6,14)	5,68±0,45 (4,98-6,39)	5,99±0,47 (5,16-6,96)	6,53±0,50 (5,56-7,26)	6,23±0,25 (5,66-6,77)
PB	4,03±0,27 (3,52-4,36)	4,22±0,22 (3,81-4,63)	4,34±0,29 (3,69-4,87)	4,81±0,22 (4,46-5,13)	4,19±0,18 (3,83-4,56)
LIF	3,62±0,37 (3,17-4,41)	3,98±0,33 (3,38-4,55)	4,37±0,36 (3,51-5,19)	4,88±0,29 (4,26-5,25)	4,52±0,20 (4,00-4,97)
BIF	1,42±0,13 (1,24-1,66)	1,54±0,12 (1,32-1,72)	1,65±0,12 (1,33-1,92)	1,67±0,19 (1,35-2,05)	1,67±0,09 (1,46-1,88)
RL	8,28±0,57 (7,21-9,39)	8,84±0,63 (7,86-9,80)	9,28±0,73 (7,58-10,72)	10,52±0,59 (9,64-11,66)	9,48±0,48 (8,37-10,47)
BRO	3,94±0,41 (3,38-4,54)	4,27±0,36 (3,65-4,88)	4,34±0,36 (3,58-5,07)	4,77±0,52 (3,67-5,50)	4,52±0,26 (4,00-5,04)
CH	7,66±0,29 (7,00-8,15)	7,83±0,29 (7,24-8,28)	8,36±0,26 (7,80-8,89)	8,51±0,22 (8,24-8,89)	8,13±0,43 (7,13-8,89)
BB	9,71±0,26 (9,30-10,04)	9,70±0,41 (9,02-10,55)	10,03±0,33 (9,07-10,60)	10,84±0,41 (10,31-11,61)	10,08±0,44 (9,18-10,97)
LM	3,37±0,18 (3,11-3,64)	3,48±0,13 (3,26-3,71)	3,55±0,17 (3,15-3,92)	3,90±0,14 (3,68-4,09)	3,36±0,12 (3,12-3,57)
BM1	1,03±0,09 (0,90-1,20)	1,06±0,04 (1,00-1,17)	1,06±0,06 (0,90-1,22)	1,17±0,05 (1,09-1,25)	1,02±0,05 (0,90-1,13)
LIB	3,58±0,16 (3,41-3,92)	3,69±0,15 (3,44-4,01)	3,57±0,15 (3,22-3,86)	3,81±0,14 (3,62-4,09)	3,61±0,14 (3,31-3,85)
ORL	7,78± (7,13-8,43)	7,95±0,40 (7,39-8,59)	8,20±0,47 (7,24-9,21)	8,94±0,40 (8,30-9,55)	8,53±0,30 (7,67-9,09)
ZB	11,49±0,49 (10,57-12,42)	12,05±0,67 (11-16-13,14)	12,38±0,59 (11,26-13,65)	13,42±0,65 (12,42-14,33)	12,47±0,55 (10,89-13,74)
BZP	2,09±0,17 (1,71-2,38)	2,32±0,19 (1,96-2,65)	2,35±0,23 (1,86-2,73)	2,80±0,16 (2,60-3,09)	2,32±0,14 (1,97-2,59)

4.8.2 ANOVA

O valor de F da ANOVA entre *O. utiaritensis*, *O. nigripes*, *O. fornesi*, *O. stramineus* e *O. moojeni* mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) em todas os 17 caracteres cranianos. A Tabela 4-20 mostra quantas variáveis possuem diferenças significativas pelo teste LSD para cada

par de espécies. *Oligoryzomys utiaritensis* difere de *O. fornesi* por 14 variáveis, de *O. nigripes* por 11 variáveis, de *O. moojeni* por 13 variáveis e de *O. stramineus* por 16 variáveis.

Tabela 4-20. Resultado do teste LSD, mostrando quantas variáveis possuem diferenças significativas (N) entre os pares de espécies da análise morfométricas.

Combinação	N
<i>O. fornesi</i> – <i>O. nigripes</i>	15
<i>O. fornesi</i> – <i>O. moojeni</i>	10
<i>O. fornesi</i> – <i>O. utiaritensis</i>	14
<i>O. fornesi</i> – <i>O. stramineus</i>	17
<i>O. nigripes</i> – <i>O. moojeni</i>	10
<i>O. nigripes</i> – <i>O. utiaritensis</i>	11
<i>O. nigripes</i> – <i>O. stramineus</i>	15
<i>O. moojeni</i> – <i>O. utiaritensis</i>	13
<i>O. moojeni</i> – <i>O. stramineus</i>	17
<i>O. stramineus</i> – <i>O. utiaritensis</i>	16

4.8.3 Análises multivariadas

O componente principal 1 responde por 64,6% da variância total, enquanto que o componente principal 2 responde por 10%. Os outros componentes principais respondem por menos de 5% cada uma. Pelo gráfico dos escores das componentes principais (Figura 4-40), percebemos que *O. stramineus* parece ser distinta das outras espécies. Há também uma separação entre *O. moojeni* e *O. utiaritensis*, e entre *O. utiaritensis* e *O. fornesi*. Porém, a separação entre *O. nigripes* e as demais (exceto *O. stramineus*) não é completa. A separação entre *O. stramineus* e as outras espécies se dá pela CP 1, o que também acontece entre *O. utiaritensis* e *O. fornesi*. Já a separação entre *O. utiaritensis* e *O. moojeni* se dá no plano da CP 2. Pela Figura 4-41, percebemos que a diferenciação de todas as variáveis se dá na maior parte pela componente principal 1. Já na análise discriminante, a separação entre as cinco espécies fica mais clara, como podemos ver na Figura 4-42.

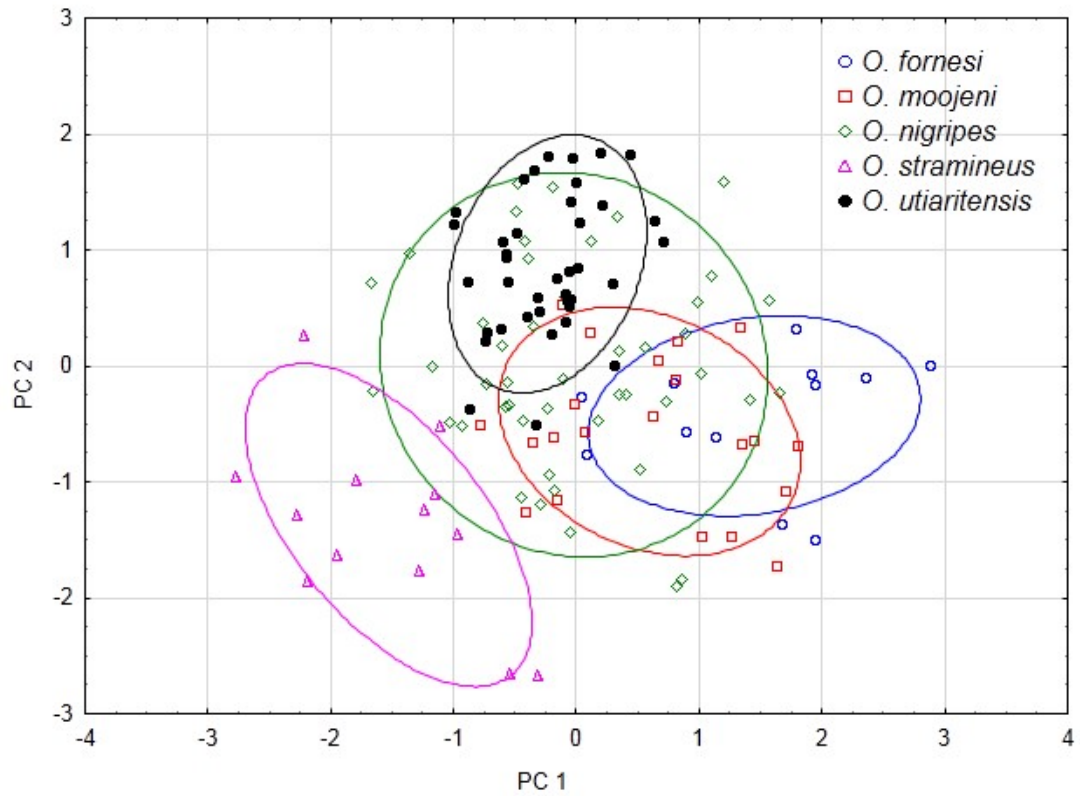


Figura 4-40. Gráfico de dispersão dos escores das componentes principais 1 e 2, considerando espécimes de *O. fornesi*, *O. moojeni*, *O. nigripes*, *O. stramineus* e *O. utiaritensis*, com a elipse de 95% dos dados.

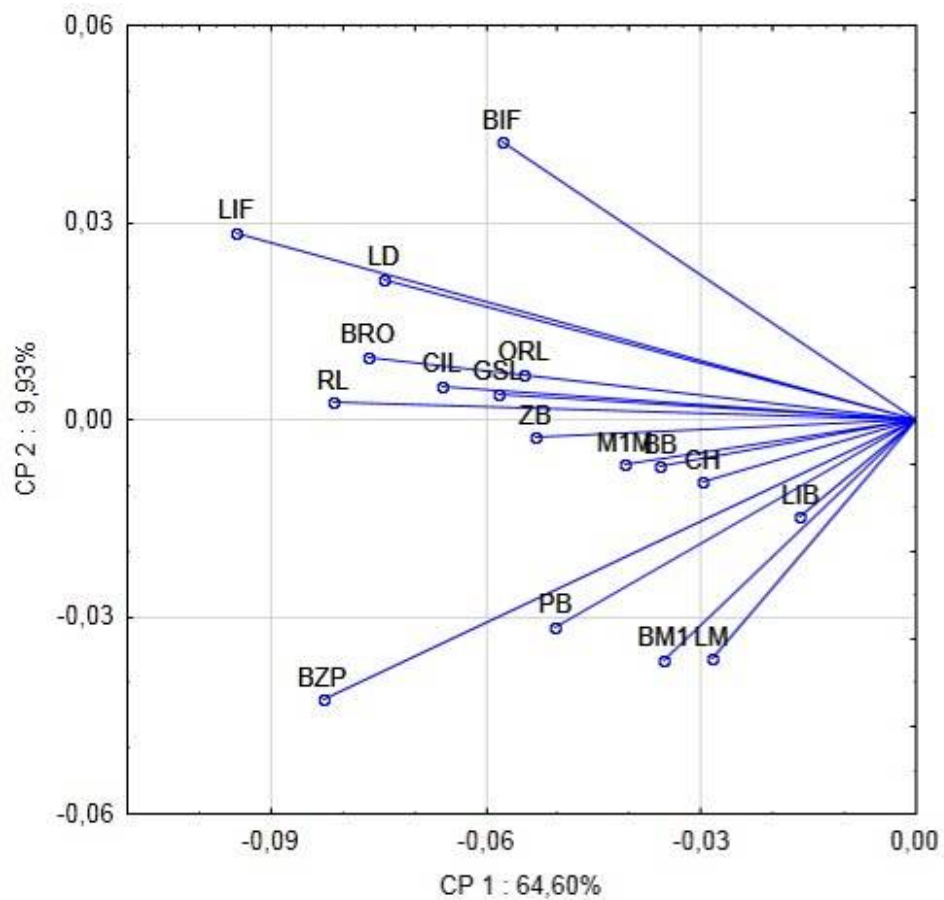


Figura 4-41. Projeções das componentes principais para as 17 variáveis.

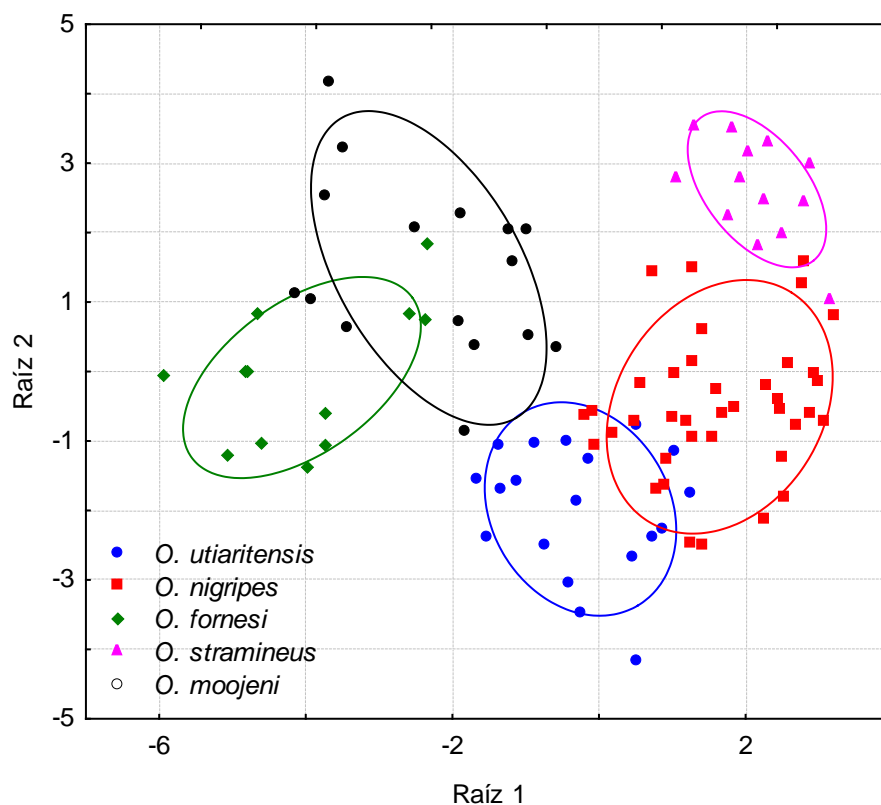


Figura 4-42. Gráfico de dispersão das raízes canônicas 1 e 2, considerando espécimes de *O. fornesi*, *O. moojeni*, *O. nigripes*, *O. stramineus* e *O. utiaritensis*, com a elipse de 95% dos dados.

4.9 Detecção de pseudogenes mitocondriais

4.9.1 Clonagem

Ao amplificar os marcadores mitocondriais (*citb* e *coi*) deparamos com diversos problemas. Diversos indivíduos não puderam ser sequenciados, pois a PCR não funcionou mesmo depois de várias tentativas com mudanças das condições da reação. Além disso, em vários espécimes sequenciados os eletroferogramas apresentaram anomalias que incluem divergências entre as duas fitas (deleções/inserções e substituições) e picos duplos, que em marcadores nucleares podem representar heterozigotos. Diversos espécimes foram descartados após o sequenciamento, pois essas anomalias representavam boa parte da sequência. A Figura 4-43 apresenta alguns exemplos dessas anomalias.

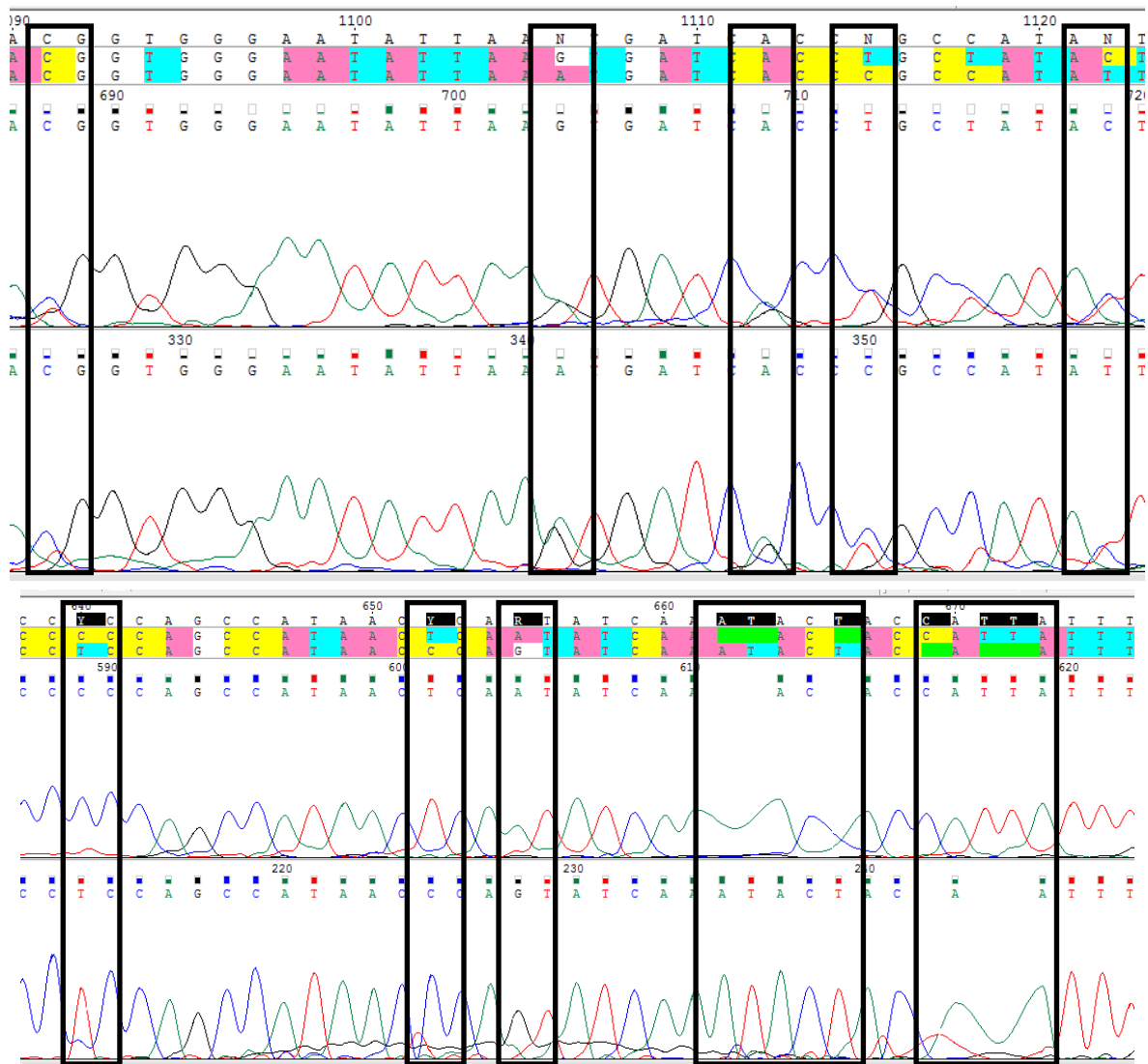


Figura 4-43. Exemplos de eleroferogramas mostrando diversas anomalias, como ruídos, deleções, picos duplos e divergência de bases.

Para detectar se havia mais de uma sequência sendo amplificada, que poderia ser a causa desses problemas, produtos de PCR, tanto de *citb* quanto de *coi*, de alguns espécimes foram submetidos à clonagem. Em todas as análises, as sequências foram comparadas à sequenciada sem a clonagem.

4.9.1.1 *citb*

A Tabela 4-21 sumariza os resultados encontrados para *citb*. Pode-se perceber um grande número de haplótipos, às vezes muito diferentes entre si, o que não é esperado se todos os produtos forem resultado de amplificação de genes mitocondriais. Os indivíduos que apresentaram um maior número de sítios polimórficos pertencem às espécies *O. nigripes*, *O. moojeni* e *O. fornesi*. Diversos haplótipos apresentaram códon de parada prematuro devido à

mudança do quadro de leitura por inserções/deleções ou por mutações pontuais. Apesar das grandes diferenças e um alto grau de polimorfismo, todas as sequências correspondem a *Oligoryzomys*, e o mínimo de identidade encontrada em uma busca no BLAST para as sequências dos clones foi de 88%.

Tabela 4-21. Resultados da clonagem de *citb*, indicando o número de museu ou de campo do espécime (Número), o número de clones sequenciados (n), o número de haplótipos encontrados (h), o número de *gaps* encontrados em todos os haplótipos (*gaps*), o número de sítios polimórficos no ADN (Poln), o número de sítios polimórficos únicos (SNP), o número de sítios polimórficos informativos de parcimônia (Parc), o número de substituições de aminoácidos encontrados em todos os haplótipos (Pola) e o número de haplótipos que não apresentaram um códon de parada prematura (*stop*).

Número	Espécie	n	h	<i>gaps</i>	Poln	SNP	Parc	Pola	<i>stop</i>
SVS04	<i>O. microtis</i>	5	5	0	8	7	1	3	0
CRB733	<i>O. fornesi</i>	5	4	3	112	3	109	13	3
MN46410	<i>O. stramineus</i>	5	5	1	7	5	2	4	4
MN50322	<i>O. rupestris</i>	8	7	1	9	8	1	5	6
MN50326	<i>O. rupestris</i>	8	7	3	11	9	2	5	6
CRB1425	<i>O. nigripes</i>	5	5	1	112	112	0	16	1
LMT302	<i>O. nigripes</i>	13	11	4	120	12	108	83	9
MN50307	<i>O. moojeni</i>	9	8	0	77	10	67	6	7
MN50309	<i>O. moojeni</i>	6	5	1	77	76	1	7	5

A Figura 4-44 mostra a árvore de ML dos clones de *citb* junto com alguns espécimes utilizados nas análises filogenéticas do *citb* (item 4.2.2). A árvore da BA mostrou a mesma topologia, e apenas será mostrada a árvore de ML, com os suportes de aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior. Nove clones saíram mais basais em relação às outras sequências de *Oligoryzomys*, e entre eles, dois são de *O. fornesi* (CRB733) e três de *O. nigripes* (LMT302). Além disso, todos os clones do espécime CRB1425 (também *O. nigripes*) estão nesse grupo, enquanto que a sequência sem clonagem desse espécime agrupou-se com as outras sequências de *O. nigripes*. Esse grupo recebeu um valor de suporte alto.

Todas as sequências de SVS04 foram agrupadas no clado de *O. microtis*, e as outras duas sequências de CRB733 no clado de *O. fornesi*. No grupo *O. moojeni* se agruparam três sequências da amostra MN50307 e cinco sequências da MN50309, e no grupo *O. utiaritensis* se agruparam cinco sequências da amostra MN50307 e uma sequência da MN50309. O espécime MN50307 de *O. moojeni* foi o mesmo que agrupou-se com *O. utiaritensis* na análise filogenética com o *citb* (item 4.2.2).

Todas as 16 sequências de *O. rupestris* foram encontradas no mesmo clado, porém uma sequência da amostra MN50307 de *O. moojeni* encontra-se nesse clado com *O. rupestris*. Todas as cinco sequências de *O. stramineus* também formaram um clado monofilético. Em *O. nigripes* foram encontradas 10 sequências de LMT302, incluindo a sequência obtida sem a clonagem. Apenas a sequência obtida sem clonagem de CRB1425 encontra-se nesse grupo. Esses resultados indicam uma grande diversidade entre as sequências dos clones, e diversos espécimes apareceram fora do clado das outras sequências da mesma espécie. A Figura 4-45 mostra a rede de haplótipos MJ apenas com as sequências dos clones, apresentando o número de mutações entre os haplótipos, além da presença de inserções/deleções e códon de parada prematuros. O número de haplótipos parece menor na rede, pois essa análise não utiliza posições com inserções/deleções.

A Tabela 4-22 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de SVS04 (*O. microtis*). É possível perceber que nenhuma sequência se sobressai em relação às outras, e a distância média foi de 0,4%. Nenhuma das cinco sequências apresentou códon de parada. Foram encontradas apenas transições, sendo 47% de A↔G e 53% de C↔T.

Tabela 4-22. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de SVS04 (*O. microtis*).

	SVS04	c06	c07	c08
c06	0,4%			
c07	0,7%	0,4%		
c08	0,5%	0,1%	0,5%	
c09	0,6%	0,2%	0,4%	0,4%

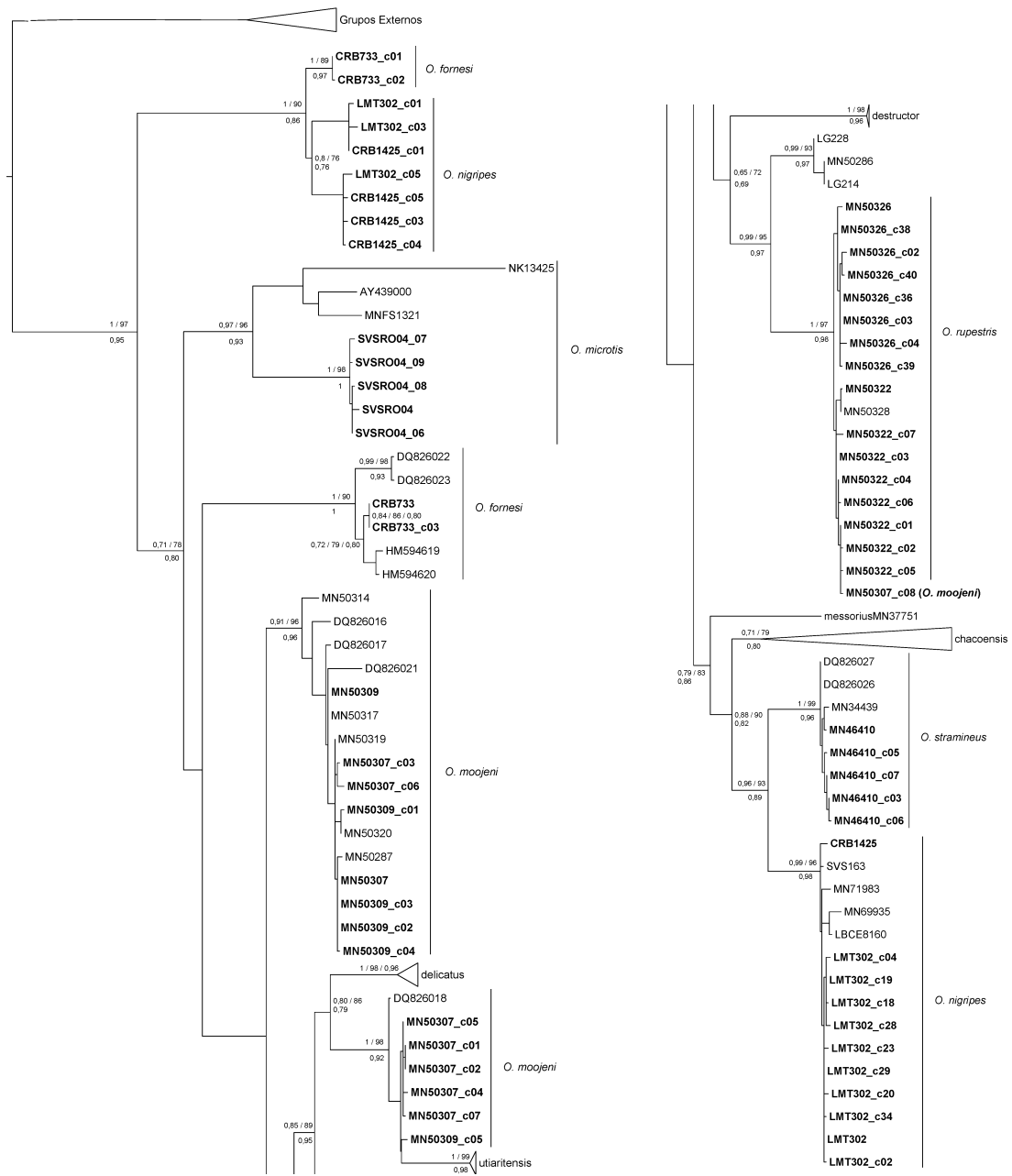


Figura 4-44. Topologia de ML de *Oligoryzomys* para *citb*, incluindo os clones. Os valores de suporte são aLRT, *bootstrap* e probabilidade posterior, nessa ordem. Os nomes em negrito correspondem às sequências dos clones.

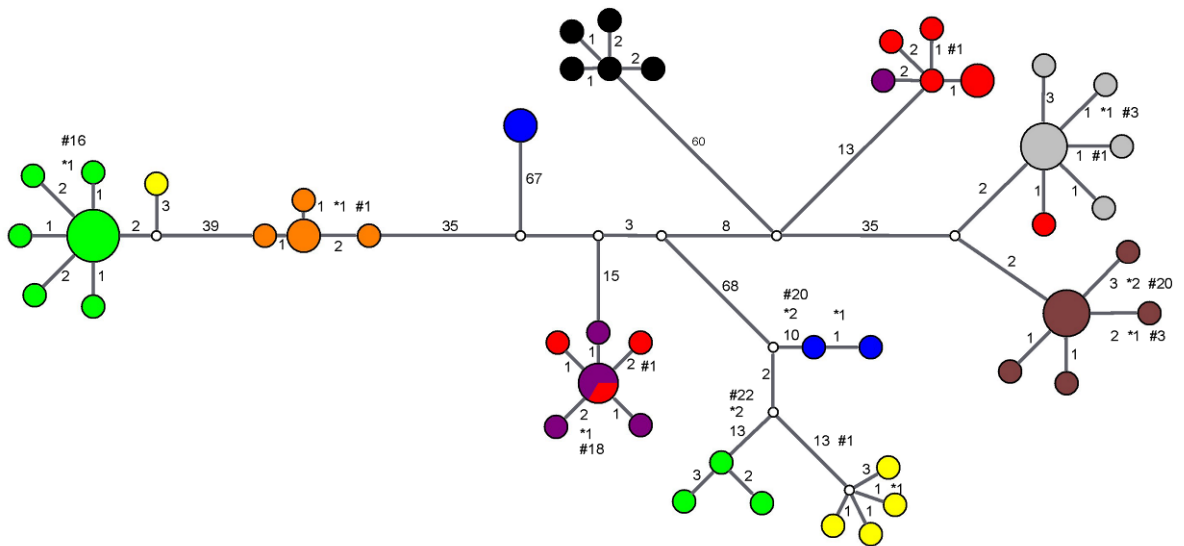


Figura 4-45. Rede de haplótipos MJ dos clones de *citb*. Os números representam mutações, números precedidos de * representam inserções/deleções e números precedidos de # representam códons de parada prematuros. Preto representa SVS04 (*O. microtis*), azul representa CRB733 (*O. fornesi*), laranja representa MN46410 (*O. stramineus*), cinza representa MN50322 (*O. rupestris*), marrom representa MN50326 (*O. rupestris*), amarelo representa CRB1425 (*O. nigripes*), verde representa LMT302 (*O. nigripes*), vermelho representa MN50307 (*O. moojeni*) e roxo representa MN50309 (*O. moojeni*).

A Tabela 4-23 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de CRB733 (*O. fornesi*). É possível perceber que dois grupos de sequências são distantes entre si em aproximadamente 15%, um contendo presumivelmente a sequência codificante, sem códon de parada (a sequência produzida sem o processo de clonagem e c03) e outro contendo sequências com códon de parada e inserções. As sequências do primeiro grupo agruparam-se com outras sequências de *O. fornesi* nas análises filogenéticas (Figura 4-44). As sequências do segundo apresentaram uma inserção de duas (c01) ou três (c02 e c04) adeninas após a 20^a posição. A distância média foi de 9,1%. Foram encontrados todos os seis tipos de substituições, distribuídas em 79,8% de transições (63,7% de C↔T e 16,1% de A↔G) e 20,2% de transversões (7,6% de A↔C; 9,6% de A↔T; 0,9% de C↔G; 2,0% de G↔T)

Tabela 4-23. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de CRB733 (*O. fornesi*).

	CRB733	c01	c02	c03
c01	14,9%			
c02	14,9%	0,1%		
c03	0,0%	14,9%	14,9%	
04	15,0%	0,7%	0,9%	15,0%

A Tabela 4-24 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN46410 (*O. stramineus*). É possível perceber que nenhuma sequência se sobressai em relação às outras. A distância média foi de 0,4%. A sequência c03 apresenta uma inserção de A na posição 803, e, por isso, logo em seguida apresenta um códon de parada. Foram encontrados os dois tipos de transições, sendo 12,5% de A↔G e 75% de C↔T, e um tipo de transversão, G↔T, representando 12,5% das substituições.

Tabela 4-24. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de MN46410 (*O. stramineus*).

	MN46410	c03	c05	c06
c03	0,6%			
c05	0,5%	0,4%		
c06	0,7%	0,1%	0,5%	
c07	0,5%	0,1%	0,2%	0,2%

A Tabela 4-25 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN50322 (*O. rupestris*). É possível perceber que nenhuma sequência se sobressai em relação às outras, e a distância média foi de 0,3%. A sequência c02 apresentou um códon de parada prematuro devido a uma substituição de A por G na posição 469. A sequência c04 apresentou uma inserção de C após a posição 765, e logo depois apresentou três códons de parada prematuros. Dentre as substituições, 60% foram transições (20% de C↔T e 40% de A↔G) e 40% foram transversões (10% A↔C; 20% de A↔T e 10% de G↔T).

Tabela 4-25. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de MN50322 (*O. rupestris*).

	MN50322	c01	c02	c03	c04	c05	c06
c01	0,4%						
c02	0,5%	0,1%					
c03	0,2%	0,1%	0,2%				
c04	0,4%	0,0%	0,1%	0,1%			
c05	0,5%	0,1%	0,2%	0,2%	0,1%		
c06	0,5%	0,1%	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%	
c07	0,6%	0,5%	0,6%	0,4%	0,5%	0,6%	0,6%

A Tabela 4-26 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN50326 (*O. rupestris*). É possível perceber que nenhuma sequência se sobressai em relação às outras, e a

distância média foi de 0,4%. As sequências c02 apresentou uma inserção de duas adeninas após a 20^a posição, e a sequência c36 apresentou a inserção de C após a 71^a posição, fazendo com que aparecessem diversos códons de parada prematuros em ambas as sequências. Dentre as substituições, 75,7% foram transições (59,5% de C↔T e 12% de A↔G) e 24,3% foram transversões (8,1% A↔C e 16,2% de A↔T).

Tabela 4-26. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de MN50326 (*O. rupestris*).

	MN50326	c02	c03	c04	c36	c38	c39
c02	0,7%						
c03	0,4%	0,4%					
c04	0,7%	0,7%	0,4%				
c36	0,4%	0,4%	0,0%	0,4%			
c38	0,2%	0,5%	0,1%	0,5%	0,1%		
c39	0,5%	0,5%	0,1%	0,5%	0,1%	0,2%	
c40	0,6%	0,4%	0,2%	0,6%	0,2%	0,4%	0,4%

A Tabela 4-27 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de CRB1425 (*O. nigripes*). É possível perceber que uma das sequências, aquela produzida sem o processo de clonagem, se diferenciou (em média 15%) das demais. As outras quatro sequências são muito próximas entre si (em média 0,4%). Todas essas quatro sequências apresentam apenas um códon de parada prematuro, devido a uma substituição de um G por um A na posição 226. Além disso, elas não fazem parte do grupo contendo as outras sequências de *O. nigripes* nas análises filogenéticas (Figura 4-44). Foram encontrados todos os seis tipos de substituições, distribuídas em 73,2% de transições (45,4% de C↔T e 27,9% de A↔G) e 26,8% de transversões (9,8% de A↔C; 12,5% de A↔T; 3,6% de C↔G; 0,9% de G↔T).

Tabela 4-27. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de CRB1425 (*O. nigripes*).

	CRB1425	c01	c03	c04
c01	15,2%			
c03	15,1%	0,6%		
c04	14,9%	0,5%	0,4%	
c05	14,9%	0,5%	0,4%	0,3%

A Tabela 4-28 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de LMT302 (*O. nigripes*). É possível distinguir dois grupos, distantes em média 16%: um grupo presumivelmente contendo a sequência codificante, sem nenhum códon de parada prematuro (composto pela sequência produzida sem o processo de clonagem, mais as sequências c04, c16, c18, c20, c23, c28, c29 e c34) e outro grupo contendo sequências com duas inserções, que levaram a formação de códons de parada prematuros (c01, c03 e c05). As sequências do primeiro grupo foram as que se agruparam com as outras sequências de *O. nigripes* nas análises filogenéticas (Figura 4-44). Foram encontrados todos os seis tipos de substituições, distribuídas em 74,4% de transições (44,2% de C↔T e 30,2% de A↔G) e 25,6% de transversões (10,5% de A↔C; 11,4% de A↔T; 1,9% de C↔G; 1,9% de G↔T).

Tabela 4-28. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de CRB1425 (*O. nigripes*).

	LMT302	c01	c02	c03	c04	c05	c18	c19	c20	c23	c28	c29
c01	15,5%											
c02	0,1%	15,7%										
c03	15,7%	0,6%	15,9%									
c04	0,1%	15,7%	0,3%	15,9%								
c05	14,9%	0,5%	15,1%	0,6%	15,1%							
c18	0,1%	15,7%	0,3%	15,9%	0,3%	15,1%						
c19	0,0%	15,5%	0,1%	15,7%	0,1%	14,9%	0,1%					
c20	0,3%	15,9%	0,4%	16,0%	0,4%	15,2%	0,4%	0,3%				
c23	0,1%	15,7%	0,3%	15,9%	0,3%	15,1%	0,3%	0,1%	0,4%			
c28	0,3%	15,7%	0,4%	15,9%	0,4%	15,1%	0,4%	0,3%	0,5%	0,4%		
c29	0,0%	15,5%	0,1%	15,7%	0,1%	14,9%	0,1%	0,0%	0,3%	0,1%	0,3%	
c34	0,1%	15,5%	0,3%	15,7%	0,3%	14,9%	0,3%	0,1%	0,4%	0,3%	0,4%	0,1%

A Tabela 4-29 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN50307 (*O. moojeni*). É possível distinguir dois grupos, distantes em média 9,1%: um grupo contendo a sequência produzida sem o processo de clonagem mais as sequências c03 e c06, e outro grupo contendo as outras sequências. Sequências de ambos os grupos apresentaram códons de parada prematuros: a sequência c06 por causa da substituição de um G por um A na posição 313, e a sequência c04 por causa da substituição de um G por um A na posição 89. Não foram encontradas inserções ou deleções. Nas análises filogenéticas (Figura 4-44), as sequências do primeiro grupo agruparam-se com outras sequências de *O. moojeni*, enquanto que as sequências do segundo grupo agruparam-se com *O. utiaritensis*, exceto c08, que agrupou-se com *O. rupestris*. Foram encontrados cinco tipos de substituições, distribuídas em 81,8% de transições

(43,7% de C↔T e 38,1% de A↔G) e 18,2% de transversões (8,4% de A↔C; 6,3% de A↔T; 3,5% de C↔G).

Tabela 4-29. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de MN50307 (*O. moojeni*).

	MN50307	c01	c02	c03	c04	c05	c06	c07
c01	9,0%							
c02	9,0%	0,0%						
c03	0,2%	9,0%	9,0%					
c04	9,1%	0,4%	0,4%	9,1%				
c05	8,8%	0,1%	0,1%	8,8%	0,2%			
c06	0,4%	9,1%	9,1%	0,4%	9,3%	9,0%		
c07	9,0%	0,2%	0,2%	9,0%	0,4%	0,1%	9,1%	
c08	9,3%	0,5%	0,5%	9,3%	0,6%	0,4%	9,4%	0,5%

A Tabela 4-30 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN50309 (*O. moojeni*). É possível perceber que a sequência c05 se diferenciou (em média 9,8%) das demais. As outras cinco sequências são muito próximas entre si (em média 0,3%). Além disso, esta foi a única sequências que não se agrupou com as outras sequências de *O. moojeni* nas análises filogenéticas (Figura 4-44), e se agrupou com as sequências de *O. utiaritensis*. A sequência c03 apresentou uma deleção de A na 76^a posição, levando a formação de diversos códons de parada prematuros. Foram encontrados cinco tipos de substituições, distribuídas em 81,3% de transições (44,5% de C↔T e 36,8% de A↔G) e 26,8% de transversões (11,6% de A↔C; 3,9% de A↔T; 3,2% de C↔G).

Tabela 4-30. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *citb* de MN50309 (*O. moojeni*).

	MN50309	c01	c02	c03	c04
c01	0,6%				
c02	0,1%	0,5%			
c03	0,1%	0,5%	0,0%		
c04	0,2%	0,6%	0,1%	0,1%	
c05	9,8%	10,0%	9,7%	9,7%	9,8%

4.9.1.2 *coi*

A Tabela 4-31 mostra os resultados das clonagens de *coi*. Para *O. moojeni* e *O. nigripes*, os mesmo espécimes de *citb* também foram usados para *coi*, porém a taxa de polimorfismo encontrado foi menor do que o visto acima. Nas análises filogenéticas dos clones de *coi* nenhuma das sequências se agrupou com sequências de espécies distintas.

Tabela 4-31. Resultados da clonagem de *coi*, indicando o número de museu ou de campo do espécime (Número), o número de clones sequenciados (n), o número de haplótipos encontrados (h), o número de *gaps* encontrados em todos os haplótipos (*gaps*), o número de sítios polimórficos no ADN (Poln), o número de sítios polimórficos únicos (SNP), o número de sítios polimórficos informativos de parcimônia (Parc), o número de substituições de aminoácidos encontrados em todos os haplótipos (Pola) e o número de sequências que não apresentaram um códon de parada prematura (sem *stop*).

Número	Espécie	n	h	<i>gaps</i>	Poln.	SNP	Parc.	Pola.	<i>stop</i>
MN50309	<i>O. moojeni</i>	6	5	4	7	7	0	4	3
CRB1425	<i>O. nigripes</i>	8	5	52	28	27	0	18	2
LBCE12186	<i>O. utiaritensis</i>	4	4	21	14	14	0	9	1

A Tabela 4-32 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de CRB1425 (*O. nigripes*). A distância média foi de 0,4%. Não foi encontrado nenhum agrupamento definido de sequências. As sequências c02, c03, c16, c17, c18 e c19 apresentaram diversos códons de parada prematuros devido a diversas inserções. Foram encontrados todos os seis tipos de substituições, distribuídas em 47,9% de transições (25,8% de C↔T e 22,1% de A↔G) e 52,1% de transversões (25,8% de A↔C; 14,7% de A↔T; 7,4% de C↔G; 4,2% de G↔T).

Tabela 4-32. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *coi* de CRB1425 (*O. nigripes*).

	CRB1425	c02	c03	c15	c16	c17	c18
c02	0,9%						
c03	0,6%	1,4%					
c15	0,2%	1,0%	0,8%				
c16	0,0%	0,9%	0,6%	0,2%			
c17	0,0%	0,9%	0,6%	0,2%	0,0%		
c18	0,1%	1,0%	0,7%	0,3%	0,1%	0,1%	
c19	0,0%	0,9%	0,6%	0,2%	0,0%	0,0%	0,1%

A Tabela 4-33 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de MN50309 (*O. moojeni*). A distância média foi de 0,2%. Não foi encontrado nenhum agrupamento definido de sequências. As sequências c22 e c24 apresentaram diversos códons de parada prematuros devido a diversas inserções. Foram encontradas apenas transições, sendo 57,1% de A↔G e 42,9% de C↔T.

Tabela 4-33. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *coi* de MN50309 (*O. moojeni*).

	MN50309	c20	c21	c22	c23
c20	0,2%				
c21	0,1%	0,3%			
c22	0,0%	0,2%	0,1%		
c23	0,1%	0,3%	0,2%	0,1%	
c24	0,1%	0,3%	0,2%	0,1%	0,1%

A Tabela 4-34 mostra as distâncias genéticas K2P entre os clones de CRB1425 (*O. nigripes*). A distância média foi de 0,5%. Não foi encontrado nenhum agrupamento definido de sequências. Apenas a sequência produzida sem o processo de clonagem não apresentou códon de parada prematura, as outras três sequências apresentaram diversos devido a diversas inserções. Foram encontrados cinco tipos de substituições, distribuídas em 42,8% de transições (21,4% de C↔T e 21,4% de A↔G) e 57,2% de transversões (14,3% de A↔C; 28,6% de A↔T; 14,3% de C↔G).

Tabela 4-34. Distâncias genéticas K2P entre os clones de *coi* da a mostra LBCE12186 (*O. utiaritensis*).

	LBCE12186	c03	c04
c03	0,7%		
c04	0,6%	0,2%	
c05	0,8%	0,4%	0,3%

4.9.2 FISH para detecção de cópias nucleares de *citb*

Com os resultados acima se torna essencial determinar se os haplótipos diferentes correspondem a inserções nucleares ou heteroplasmia. Os resultados de FISH para dois espécimes de *O. nigripes* indicam que há inserções de *citb* em ADN nuclear, como visto nas Figuras 4-46 e 4-47, com pelo menos uma marcação em cada um dos núcleos/metáfases analisados. Em alguns casos mais de uma marcação foi encontrada, como nas figuras 4-44a, 4-44d, 4-45a, 4-45b e 4-45d. A indicação de quantas marcações por núcleo não foi possível devido à qualidade dos cromossomos analisados. Núcleos e cromossomos não espalhados claramente podem esconder sequências que seriam hibridizadas pela sonda. Porém, os resultados mostrados aqui indicam que existem inserções nucleares de *citb*, corroborando os resultados mostrados em 4.9.1.

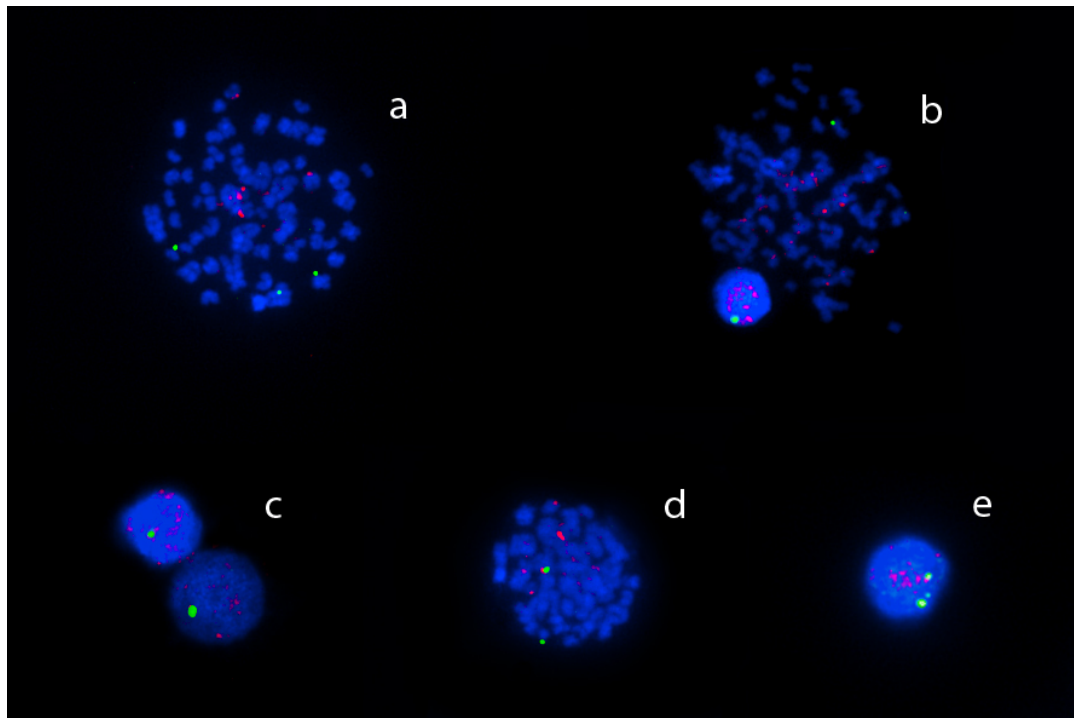


Figura 4-46. FISH do indivíduo LBCE13642 mostrando marcação em núcleos (b, c, e) e diretamente nos cromossomos (a, b, d). Em verde a marcação por fluoresceína, representando *citb*. Em vermelho a marcação por rodamina, representando ADNr.

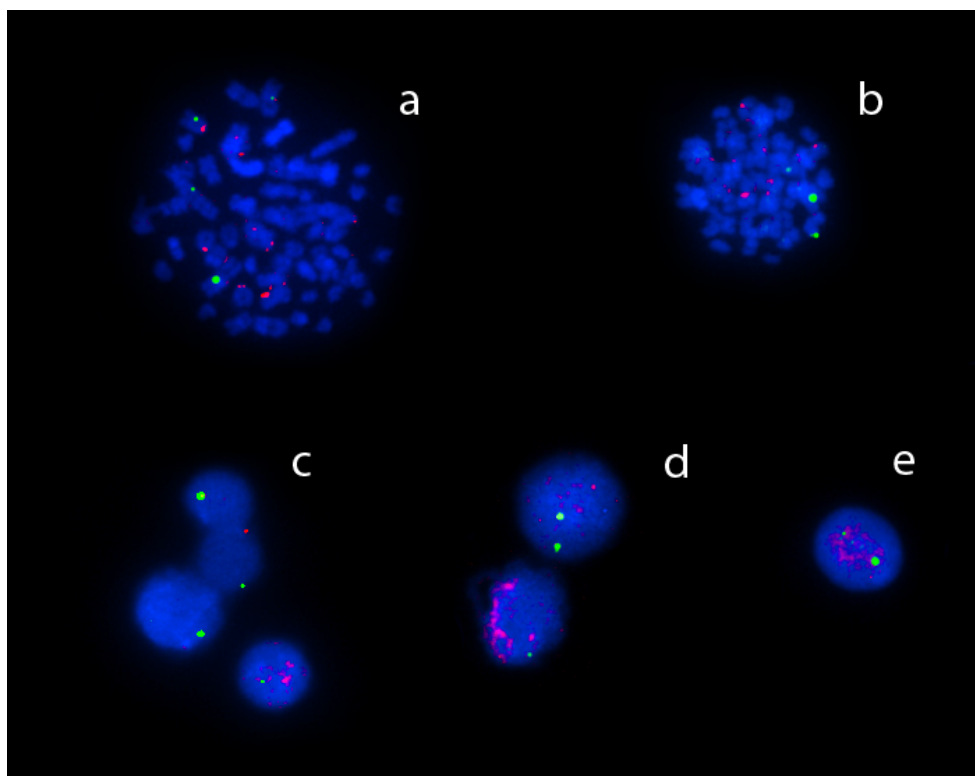


Figura 4-47. FISH da amostra LBCE14231 mostrando marcação em núcleos (c, d, e) e diretamente nos cromossomos (a, b). Em verde a marcação por fluoresceína, representando *citb*, e em vermelho a marcação por rodamina, representando ADNr.

Capítulo 5

Discussão

5 - Discussão

5.1 Características das sequências e diversidade molecular

As sequências de *citb* analisadas aqui possuem características similares a de outros estudos com marcadores mitocondriais, como uma menor proporção de guanina em relação às outras bases, uma maior proporção de transições do que transversões, e uma grande heterogeneidade de taxas de mutação (Bradley e Baker, 2001; Bradley *et al.*, 2007; Irwin *et al.*, 1991; Myers *et al.*, 1995; Smith e Patton, 1991; Tobe *et al.*, 2010). Essa última característica é devido ao fato de *citb* ser uma sequência codificante: a maioria das substituições na terceira posição do códon é sinônima, enquanto que existem poucas substituições sinônimas na primeira posição e nenhuma na segunda posição. Os dados mostrados aqui confirmam essa tendência, e indicam que esse gene sofre seleção purificadora, o que já é esperado de uma proteína envolvida na produção de energia. O outro marcador mitocondrial (*coi*), também apresenta as mesmas características, o que já era esperado e já foi mostrado em outros estudos (Tobe *et al.*, 2010). Com *beta-fibint7* foi possível perceber uma maior proporção de A/T do que C/G, como encontrado em outros estudos (Carroll e Bradley, 2005; Palma *et al.*, 2010b; Prychitko e Moore, 2000; Wickliffe *et al.*, 2003). Porém, diferente desses estudos, aqui encontramos uma taxa de transição alta, comparável aos marcadores mitocondriais. Além disso, encontramos indícios de heterogeneidade das taxas de mutação, o que não foi descrito nos outros estudos analisados. O uso desse marcador é recente, e existem poucos estudos para realizar comparações.

Alguns estudos mostram que a distância genética K2P para *citb* dentro de populações coespecíficas em espécies de Oryzomyini é menor que 3%, e entre as espécies de *Oligoryzomys* é de 4-17%, com média de 11% (Myers *et al.*, 1995; Smith e Patton, 1993). Aqui, encontramos valores equivalentes, com algumas exceções que serão discutidas nos tópicos a seguir. É possível perceber que as distâncias de *coi* são maiores, chegando a 27,2% de divergência entre *O. fornesi* e *O. utiaritensis*, e que as distâncias de *beta-fibint7* são menores, com o máximo de 5,3% entre *O. flavescens* e *O. stramineus*. Apesar de pequenas variações nas distâncias estimadas pelos três marcadores, todos parecem eficientes para avaliar a diversidade genética das espécies de *Oligoryzomys* estudadas.

5.2 Sistemática e filogenia de *Oligoryzomys*

O presente trabalho não tem a intenção de fazer uma revisão do gênero, e a maioria das decisões de atribuição de nomes específicos foi conservadora. Porém, percebemos diversas incertezas e incongruências com a identificação de estudos recentes discutidas abaixo. Nossos resultados apontam para uma necessidade de revisão extensa de diversos grupos, com uma maior abrangência geográfica das amostras, inclusão de topotipos, e estudos cariológicos e morfológicos desses espécimes. Além disso, percebeu-se também a necessidade de analisar *loci* adicionais para uma compreensão de alguns pontos específicos da filogenia molecular de *Oligoryzomys*.

A reconstrução filogenética encontrada nesse trabalho foi em grande parte coincidente com estudos recentes de *Oligoryzomys* (Francés e D'Elía, 2006; González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2010b; Richter *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2009). A maioria destes trabalhos utiliza o gene mitocondrial *citb*. Aqui, além deste marcador, foram utilizados pela primeira vez no gênero *Oligoryzomys* dois outros marcadores: *coi* e *beta-fibint7*. Esses marcadores forneceram corroboração independente de alguns clados encontrados com *citb*, apesar da abrangência amostral restrita, já que todas as sequências desses marcadores foram produzidas nesse trabalho e não há outras disponíveis nos bancos de dados públicos. Em todas as análises, as topologias por ML e BA foram similares, com algumas diferenças de resolução de grupos interespecíficos por falta de suporte em uma ou outra análise. Dessa forma, as discussões serão baseadas apenas em agrupamentos com suporte alto em pelo menos duas análises. Um dado interessante é que a topologia encontrada pela análise no programa BEAST, para datação molecular, apresentou algumas diferenças em relação às outras análises. Essas diferenças serão discutidas a seguir.

O *beta-fibint7* foi um bom marcador molecular adicional que pode ajudar a elucidar alguns problemas na filogenia de *Oligoryzomys*, apesar da diversidade menor em relação aos marcadores mitocondriais. Alguns estudos com *beta-fibint7* em sigmodontíneos mostraram que esse marcador possui sinal filogenético para resolução de divergências em nível específico e genérico (Matocq *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2010a; Wickliffe *et al.*, 2003). Além disso, com a crescente necessidade de novos marcadores moleculares, um marcador nuclear, aparentemente neutro, é essencial.

Infelizmente não existem sequências disponíveis das espécies *O. victus*, *O. arenalis*, *O. brendae* e *O. griseolus*, e não existe nenhum trabalho analisando essas espécies em detalhes. Um estudo completo de *Oligoryzomys* deve incluir também essas espécies.

Todas as análises mostraram o gênero *Oligoryzomys* monofilético, em concordância com todos os trabalhos consultados sobre filogenia desse grupo. A seguir, a posição filogenética de cada espécie analisada será discutida, baseado nos resultados encontrados aqui e na literatura.

5.2.1 *Oligoryzomys microtis*

A posição de *O. microtis* como primeira espécie a diferenciar-se em *Oligoryzomys*, tanto nas análises ML quanto BA com *citb* foi coincidente com os estudos anteriores realizados com esse marcador (González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2010b; Richter *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2009) e por D-Loop (González-Ittig *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2007). Essa posição filogenética de *O. microtis* também é corroborada pela hipótese biogeográfica aqui postulada (ver item 5.5). Entretanto, as análises com *coi* e *beta-fibint7* (tanto com ML quanto com BA) agruparam *O. microtis* com *O. fornesi*.

A análise com o *citb* mostrou estruturação genética em *O. microtis*, sugerindo a presença de três linhagens. A linhagem 1 é formada pelo espécime NK13425 do extremo noroeste da Amazônia Boliviana (Rurrenabaque, às margens do rio Beni, que desemboca no rio Mamoré), aproximadamente 220 m de altitude. Essa região é próxima (cerca de 100 km) do início dos Andes Bolivianos, onde nasce o rio Beni. A linhagem 2 é formada por espécime RGR280 (identificado como *Oligoryzomys* sp. no GenBank) de área de transição Cerrado-Amazônia Brasileira (Pium, Tocantins), e os espécimes SVS 03 e SVS 04 de áreas amazônicas (Alto Paraíso, em Rondônia), distante aproximadamente 1.550 km. A linhagem 3 é formada pelo espécimes BYU19014 da Amazônia boliviana (Mineros, departamento de Santa Cruz), os espécimes MVZ190401, MVZ193858 e MNFS1321 da Amazônia brasileira (rio Juruá no Amazonas e Acre) e o espécime TTU76249 da Amazônia peruana (ao longo do rio Solimões, Loreto). Apenas amostras da linhagem 2 foram analisadas com o *beta-fibint7*, tendo sido constatada estruturação genética entre espécimes do Tocantins e de Rondônia.

Espécimes da linhagem 1 de *O. microtis* ainda não foram caracterizados cariotipicamente. Os espécimes da linhagem 2 (SVS 03 e SVS 04) são caracterizados por $2n=64$ e $NFa=64$. Este cariótipo, com um pequeno par de cromossomos de dois braços, difere do atribuído a *O. microtis* ($2n=64$ e $NFa=66$), que apresenta dois pares de cromossomos de dois braços, sendo um deles o maior do complemento autossômico (Gardner e Patton, 1976). Esse dado corrobora a hipótese de que *O. microtis* seria um complexo de espécies. Indivíduos incluídos nas análises com *beta-fibint7* e *coi* incluíam apenas espécimes com $2n=64$ e $NFa=64$ (CRB 1448, 1449, 1450, 1451, 1452; SVS 03 e 04), o que pode explicar *O. microtis* a diferente posição filogenética em relação

as outras espécies de *Oligoryzomys*. Uma análise incluindo indivíduos das linhagens 1 e 3 pode esclarecer essa relação.

O cariótipo de topotipos de *O. microtis* (Bonvicino e Weksler, comunicação pessoal) é $2n=64$ e $NFa=66$, igual ao cariótipo de espécimes coletados na Amazônia Brasileira (Aniskin e Volobouev, 1999; Gardner e Patton, 1976; Patton *et al.*, 1996; Patton *et al.*, 2000), incluindo espécimes (MVZ190401, MVZ193858, MNFS1321) aqui analisados como sendo da linhagem 3 de *O. microtis*, o que indica que a linhagem 3 seja *O. microtis sensu stricto*.

As distâncias genéticas encontradas para *citb* também corroboram a presença de múltiplas linhagens evolutivas dentro de *O. microtis*. A distância média dentro de *O. microtis* é de 6,9%, o que cai na faixa de distâncias entre espécies diferentes de *Oligoryzomys*. As distâncias par a par entre as oito amostras de *O. microtis* utilizadas, chegam a 9,4% (entre SVS03 e NK13425), maiores que diversas comparações entre espécies bem estabelecidas.

A localidade tipo de *O. microtis* (Allen, 1916) foi descrita como “baixo Solimões”, e restrita posteriormente à região de Manacapará, localizada na margem norte do rio Solimões e 70 km a oeste de Manaus (Voss *et al.*, 2001). O habitat primário dessa espécie são as “praias de grama” – regiões efêmeras, arenosas, cobertas por grama, que precedem a mata ciliar dos rios – da região Amazônica, e é encontrado na maioria das vezes nas épocas de seca e nas regiões baixas (Patton *et al.*, 2000), embora alguns espécimes tenham sido encontrados em terra firme. Nesse último trabalho, os autores sugerem que a grande distribuição geográfica de *O. microtis* pode ser consequência do fato de que nas épocas de cheias, formam-se “ilhas de gramas”, que são levadas pelos rios, onde indivíduos dessa espécie podem ser carreados. Nesse estudo ao longo do rio Juruá, não foi encontrado evidências de diferenciação morfométrica ao longo de uma extensão de 238 km (Patton *et al.*, 2000), e uma diferenciação genética muito baixa apenas entre as localidades mais distantes, mas nenhuma entre as margens do rio (Patton *et al.*, 1996). Apesar da extensa distribuição geográfica entre os espécimes da linhagem 3 de *O. microtis*, não existe estruturação geográfica nessa população, possivelmente devido aos habitats ribeirinhos efêmeros e extremamente dinâmicos ao longo da bacia do rio Solimões-Amazonas, favorecendo o fluxo gênico. Um fato importante de notar é que a maioria dos estudos com *O. microtis* são restritos a localidades ao longo e ao sul do rio Solimões (exceto a localidade tipo), e nunca a leste do rio Negro. A única exceção seria três espécimes coletados em Paracou, na Guiana Francesa (Voss *et al.*, 2001). Esse último trabalho fez comparações morfométricas simples (média e desvio padrão), e não conseguiu distinguir esses espécimes da série tipo de *O. fulvescens* e *O. microtis*. Baseado no presente trabalho é provável esses espécimes de Paracou não sejam *O. microtis* nem *O. fulvescens* (itens 5.2.4, 5.2.5 e 5.2.6).

5.2.2 *Oligoryzomys fornesi*

As topologias de ML e BA com *citb* mostraram *Oligoryzomys fornesi* como a segunda espécie a diferenciar-se dentro de *Oligoryzomys*, porém com suporte moderado. Nas análises com *coi* e *beta-fibint7* *O. fornesi* formou um grupo com *O. microtis*. Nas análises com *citb* para datação molecular *O. fornesi* agrupou-se com *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens* (pp=0,72), e esse grupo foi o terceiro mais basal de *Oligoryzomys*. A posição como segunda espécie a diferenciar-se em *Oligoryzomys*, aqui identificada com *citb*, corrobora alguns estudos anteriores com este marcador (Miranda *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2009), enquanto em outros estudos, também com este marcador, *O. fornesi* se agrupou com *O. andinus* (Palma *et al.*, 2010b), ou com *O. flavescens* (González-Ittig *et al.*, 2010). Embora considerado sinônimo de *O. microtis* no passado (Carleton e Musser, 1989), nenhum trabalho encontrou *O. fornesi* agrupado com *O. microtis*, como nas análises com *coi* e *beta-fibint7*. Após considerar todos esses dados, nesse trabalho consideraremos a posição filogenética de *O. fornesi* incerta, porém como uma das mais basais do gênero.

As análises indicam estruturação geográfica entre os espécimes de *O. fornesi* do Cerrado e de áreas de transição Cerrado-Amazônia. Nas análises com *citb* ocorreu a subdivisão em dois grupos, com as distâncias genéticas entre espécimes do grupo Cerrado (Goiás) e do grupo transição Cerrado-Amazônia (Pará e Tocantins) variando de 2,1 a 2,5%, enquanto dentro dos grupos as distâncias não ultrapassam 1,2%. Porém, a distância genética média entre esses grupos é pequena, 1,9%, bem menor do que a distância média encontrada entre as linhagens evolutivas de *O. microtis* (6,9%), mostrando apenas uma estruturação geográfica. As análises com *coi* também mostraram estruturação geográfica envolvendo espécimes não amostrados com o *citb*, com espécimes do Pantanal e áreas de Cerrado próxima (Mato Grosso do Sul) agrupados parte a de espécimes do Cerrado (Goiás e Mato Grosso).

A localidade tipo de *O. fornesi* é na municipalidade de Laguna Naineck, província de Formosa, no Chaco Argentino (Massoia, 1973). Esta espécie habita regiões de vegetação aberta, restritas ao “diagonal de áreas secas” da América do Sul, da Caatinga e Cerrados brasileiros até o Chaco, na Argentina e Paraguai (Weksler e Bonvicino, 2005).

O histórico taxonômico de *O. fornesi* é complexo, sendo considerado por muito tempo sinônimo de *O. microtis* (Carleton e Musser, 1989). Porém, análises morfológicas e geográficas, além da filogenia molecular, claramente distinguiram essas duas espécies (Bonvicino e Weksler, 1998; Myers *et al.*, 1995). Outro fator de confusão é o cariótipo de *O. fornesi* é $2n=62$ e $NFa=64$ (Bonvicino e Weksler, 1998), erroneamente associado por alguns ao nome *O. eliurus*, um sinônimo júnior de *O. nigripes* (Andrades-Miranda *et al.*, 2001). Em um estudo recente, quatro

espécimes (OI14, OL40, GD010 e GD259) foram identificados como *O. fornesi* (González-Ittig *et al.*, 2010), mas se agruparam com *O. flavescens* em um clado com alto suporte. Porém, não há detalhamento da identificação desses espécimes, e não estão disponíveis informações morfológicas nem cariológicas. No presente trabalho, tais espécimes também formaram um grupo dentro de *O. flavescens*, e serão tratados aqui como uma das variações existentes dentro desse táxon (ver item 5.2.9). Este quadro mostra a necessidade de mais estudos com estas espécies, envolvendo topotipos, para esclarecer este problema taxonômico.

5.2.3 *Oligoryzomys destructor*, *Oligoryzomys sp. 2* e *Oligoryzomys sp. 3*

O posicionamento de *O. destructor* no mesmo grupo de *O. moojeni* e *O. delicatus* nas análises com *citb*, foi visto em outros dois trabalhos (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009). Todos os espécimes considerados aqui como *O. destructor* (TEL 1479, 1481, 1482 e 1526) são de Tandayapa, do lado leste dos Andes equatorianos, a aproximadamente 2000 m de altura. A localidade tipo de *O. destructor* é no departamento de Huánuco, no Peru, ao longo do rio Chinchao (Hershkovitz, 1940; Tschudi e Cabanis, 1844). Em ambos os lugares, a paisagem predominante é denominada Yungas, uma faixa de floresta tropical ao longo da face leste dos Andes, indo do Equador até a Argentina (González-Ittig *et al.*, 2010).

Três espécimes designados como *O. destructor* no GenBank, tiveram outra posição nas análises filogenéticas, sendo esse o motivo das diferenças das nossas análises filogenéticas com outros estudos (González-Ittig *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2010b; Rivera *et al.*, 2007). Um desses três espécimes (NK22846) agrupou com um espécime identificado como *O. flavescens* (NK21532), e foram aqui designados como *Oligoryzomys sp. 2*; a grande distância genética entre eles (9,1%) sugere que este grupo possa conter mais de uma linhagem evolutiva. A distância entre os pontos de coleta desses espécimes é de aproximadamente 190 km, e ambos estavam localizados em regiões de Yungas na Bolívia, entre 2000 e 3000 m de altura.

Os outros dois espécimes (PIDBA968 e Jy1245, de Yungas na Argentina, identificados como *O. destructor* no GenBank) agruparam com MIC 210, 211 e 203 (identificados como *Oligoryzomys sp.* no GenBank e coletados província de Catamarca, Argentina), formando um grupo aqui denominado *Oligoryzomys sp. 3*. Os espécimes MIC 210, 211 e 203 já foram associados ao táxon *O. brendae* Massoia, 1998 (Palma *et al.*, 2010b), porém poucas informações sobre esse táxon estão disponíveis. A pequena distância genética dentro desse grupo (no máximo 1,5%) também indica uma unidade taxonômica única. Claramente, esses espécimes pertencem a uma linhagem evolutiva de *Oligoryzomys* distinta das demais.

O cariótipo atribuído a *O. destructor* ($2n=60$ e $NFa=76$; Gardner e Patton, 1976) é de animais proveniente da Argentina, da mesma localidade dos espécimes PIDBA968 e Jy1245 (Capllonch *et al.*, 1997), aqui designados *Oligoryzomys* sp. 3. O cariótipo de topotipos do Peru é desconhecido. As Informações cariológicas de espécimes do Equador (TEL 1479, 1481, 1482 e 1526), aqui designados de *O. destructor*, baseado na proximidade com a localidade tipo, não estão disponíveis. Espécimes já denominados *O. destructor* representam pelo menos três linhagens distintas, e filogeneticamente distantes. Um estudo completo sobre essa espécie, com pontos de coleta se estendendo por toda a paisagem de Yungas Andeanas, precisa ser realizado para elucidar essas questões.

5.2.4 *Oligoryzomys costaricensis, fulvescens e vegetus*

Existem diversos nomes específicos associados a membros do gênero *Oligoryzomys* na América Central. Porém, até recentemente apenas *O. fulvescens* era reconhecida, desde as Florestas Tropicais da América Central e México, até o norte da América do Sul (Carleton e Musser, 1995; Musser e Carleton, 2005; Voss *et al.*, 2001). Pelo menos 11 nomes específicos foram considerados sinônimos de *O. fulvescens* (Musser e Carleton, 2005). Atualmente *O. costaricensis* (Hanson *et al.*, 2011), *O. vegetus* (Carleton e Musser, 1995; Musser e Carleton, 2005), *O. delicatus* (Hanson *et al.*, 2011) e *O. messorius* (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2009), antes sinônimos de *O. fulvescens*, também são considerados espécies.

Estudos recentes indicam que existem pelo menos três linhagens evolutivas distintas nas regiões de Floresta Amazônica do extremo norte da América do Sul (ao norte do Solimões-Amazonas), e que a distribuição de *O. fulvescens* se limitaria do norte do México até o Panamá. Essas três linhagens representariam *O. delicatus* (Hanson *et al.*, 2011), *O. messorius* (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2009), ambas consideradas sinônimos de *O. fulvescens* (Musser e Carleton, 2005), e uma linhagem sem nome específico associado (*Oligoryzomys* sp.; Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2009). Essas três linhagens serão discutidas no próximo subitem.

Estudos moleculares mostram *O. vegetus*, *O. fulvescens*, e *O. costaricensis* como linhagens independentes (Hanson *et al.*, 2011). *Oligoryzomys vegetus* habita as florestas altas do Panamá e Costa Rica, com poucos pontos de simpatia com *O. fulvescens*, que se limita às regiões baixas (Carleton e Musser, 1995; McCain, 2004). Nenhum cariótipo foi ainda associado a *O. vegetus*. Diferenças entre *O. costaricensis* e *O. fulvescens* já haviam sido sugeridas antes, baseadas em dados morfométricos e cariológicos (Carleton e Musser, 1995). Existem dois cariótipos descritos para *Oligoryzomys* na América Central e México: $2n=54$ e $NFa=68$ (Gardner

e Patton, 1976) e $2n=60$ e $NFa=74$ (Haiduk *et al.*, 1979). Este último foi descrito a partir de espécimes do México, e parece corresponder a *O. fulvescens sensu stricto* (Rogers *et al.*, 2009). Já $2n=54$ e $NFa=68$ é proveniente de espécimes da Costa Rica, e poderia corresponder a *O. vegetus* ou *O. costaricensis*, sem uma definição até o momento (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009).

A topologia desse grupo, com uma associação maior entre *O. vegetus* e *O. fulvescens* em relação a *O. costaricensis*, também foi encontrada em estudos anteriores (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009). Aqui, encontramos essas três espécies compondo o quarto grupo de diferenciação dentro de *Oligoryzomys*, depois de *O. microtis*, *O. fornesi* e *Oligoryzomys* sp. 2 e *Oligoryzomys* sp. 3. Porém, a posição filogenética desse grupo em relação às outras espécies de *Oligoryzomys* é variada, e topologias distintas foram encontradas nos trabalhos citados aqui.

O fato da maior parte das sequências associadas a esse grupo estar identificadas como *O. fulvescens* no GenBank reflete essa confusa história taxonômica. Baseado em Hanson *et al.* (2011) e Rogers *et al.* (2009) os dois espécimes do Panamá foram considerados como *O. costaricensis*, os seis espécimes da Costa Rica como *O. vegetus*, e 16 espécimes do México e um de Honduras como *O. fulvescens sensu stricto*. Vale ressaltar que todos os espécimes do México são de regiões de Floresta Tropical na parte oriental (da face oeste da Serra Madre Oriental). Diversos estudos apontam para a presença de *O. fulvescens* ao longo de toda a América Central, inclusive em simpatia com *O. costaricensis* e *O. vegetus* (Carleton e Musser, 1995; Musser e Carleton, 2005; Voss *et al.*, 2001). Podemos perceber claramente que a diversidade de *Oligoryzomys* nessa região é subestimada.

A localidade tipo de *O. fulvescens* encontra-se na cidade de Orizaba, estado de Veracruz, no México (Musser e Carleton, 2005). Pelo menos um dos espécimes analisados foi coletado próximo a essa localidade, distando aproximadamente 60 km. A localidade tipo de *O. vegetus* é na região do vulcão de Chiriqui, na província de mesmo nome, no Panamá (Musser e Carleton, 2005), porém todos os representantes de *O. vegetus* desse estudo foram coletados na Costa Rica. A localidade tipo de *O. costaricensis* é na cidade de El General, província de Puntarenas, Costa Rica (Goodwin, 1953), porém, os dois representantes dessa espécie utilizados aqui foram coletados no Panamá. As análises aqui mostradas corroboram a hipótese do status de espécie dessas três linhagens de *Oligoryzomys* na América Central e México.

5.2.5 *Oligoryzomys delicatus*

A identificação de *O. delicatus* seguiu estudos anteriores (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009), apesar do status específico de *O. delicatus* ser questionado por alguns autores (*e.g.*,

Musser e Carleton 2005). Consideramos a distribuição a distribuição geográfica de *O. delicatus* como sendo as regiões de Floresta Amazônica do Equador, Venezuela, Guianas e extremo norte do Brasil (Hanson *et al.*, 2011). O cariótipo de *O. delicatus* não é conhecido, mas espécimes identificados como *O. longicaudatus* variante 3 na Venezuela com cariótipo $2n=62$ e $NFa=74,76$ (Gardner e Patton, 1976) poderiam ser *O. delicatus*.

Estudos prévios mostram *O. delicatus* agrupado com *O. moojeni* e *Oligoryzomys* sp. 1 (Miranda *et al.*, 2009) e agrupamentos dessas três espécies com *O. destructor* (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009). Apesar de *O. delicatus* não ser incluída na maioria das análises filogenéticas de *Oligoryzomys*, as análises realizadas aqui corroboram a hipótese de *O. delicatus* ser uma linhagem diferente e distinta em relação a *O. fulvescens*.

Os espécimes aqui analisados abrangem uma distribuição ao longo de aproximadamente 1700 km, do litoral norte da Venezuela (próximo à localidade tipo, que é localizada em Caparo, na ilha de Trinidad; Goodwin, 1953), até o Suriname. Aparentemente, todos os espécimes coletados são de regiões de Floresta Amazônica. Porém, apenas as informações de localidade de dois espécimes estão detalhadas, ambas na Venezuela. Existem espécimes não identificados no nível de espécie dentro da região que corresponderia à distribuição geográfica de *O. delicatus*, como é o caso dos três espécimes de *Oligoryzomys* de Paracou (Guiana Francesa) que apesar de comparados com a série tipo de *O. microtis* e *O. fulvescens* não puderam ser identificados a nível de espécie (Voss *et al.*, 2001). Porém, como veremos no item a seguir, existem outras linhagens evolutivas de *Oligoryzomys* ao norte da América do Sul, e sem dados adicionais, não é possível definir um nome específico para essas amostras.

5.2.6 *Oligoryzomys* sp. 1 e *Oligoryzomys messorius*

Pelo menos mais duas linhagens evolutivas de *Oligoryzomys* ocorrem no extremo norte da Floresta Amazônica. Em um estudo cariológico de *Oligoryzomys* no Brasil (Andrades-Miranda *et al.*, 2001), três espécimes do município de Surumú, Roraima (um deles com sequência no GenBank, MN37751) foram identificados como *O. messorius*, espécie considerada sinônimo júnior de *O. fulvescens* (Musser e Carleton, 2005). A atribuição desse nome específico foi baseada na proximidade da localidade tipo desta espécie (Montanhas Kanuku, Guiana, a aproximadamente 150 km da localidade de coleta) e por apresentar cariótipo distinto ($2n=56$ e $NFa=58$) do cariótipo de *O. fulvescens* (Andrades-Miranda *et al.*, 2001), e essa identificação é aqui seguida. A posição filogenética de *O. messorius* é incerta, sua associação com o grupo contendo *O. destructor*, *O. delicatus*, *O. moojeni* e *Oligoryzomys* sp. 1 foi encontrada em outros

trabalhos (González-Ittig *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2009), porém, como acontece aqui, sem suporte.

A outra linhagem inclui dois espécimes identificados como *Oligoryzomys* sp. 1. Um destes espécimes (MN37756, de Tartarugalzinho, Amapá) possui $2n=66$ e $NFa=74$, e foi identificado como *O. microtis* em estudos anteriores (Andrades-Miranda *et al.*, 2001). Posteriormente este espécime foi identificado apenas como *Oligoryzomys* sp. (Miranda *et al.*, 2009). Aqui um espécime (TK17858, identificado como *O. fulvescens* no GenBank) coletado em Nickerie, Suriname, agrupou-se com MN37756 formando o grupo designado *Oligoryzomys* sp.1. A associação de *Oligoryzomys* sp. 1 como grupo irmão de *O. delicatus* também foi encontrada em outro estudo (Hanson *et al.*, 2011), onde os espécimes aqui identificados como *Oligoryzomys* sp.1, foram denominados *O. messorius*.

Apesar de estar claro que *Oligoryzomys* sp.1 é linhagem do norte da América do Sul, distinta de *O. delicatus* e *O. messorius*, nenhum nome pode ser atribuído a ela.

5.2.7 *Oligoryzomys chacoensis*

Oligoryzomys chacoensis habita regiões de Cerrado e Pantanal no Brasil (sudoeste de Mato Grosso e oeste de Mato Grosso do Sul), e da planície do Chaco no leste da Bolívia (departamentos de Beni, Santa Cruz e Tarija), norte da Argentina (províncias de Jujuy, Formosa, Chaco, Salta e Tucumán) e Paraguai (Myers e Carleton, 1981; Weksler e Bonvicino, 2005). O holótipo dessa espécie foi coletado a 419 km da cidade de Villa Hayes, próximo a Rodovia Transchaco, no departamento de Boquerón, no Paraguai (Myers e Carleton, 1981), e o único cariótipo associado a essa espécie é $2n=58$ e $NFa=74$ (Myers e Carleton, 1981; Weksler e Bonvicino, 2005).

Tanto na ML quanto na BA, *O. chacoensis* agrupou-se com o supergrupo formado por *O. longicaudatus*, *O. andinus*, *O. flavescens*, *O. stramineus* e *O. nigripes*. Porém, não foi possível identificar a que grupo está mais ligado, se com (*O. longicaudatus* + *O. andinus* + *O. flavescens*) ou com (*O. stramineus* + *O. nigripes*). Na análise de datação molecular com o *cttb*, *O. chacoensis* ficou mais próximo de *O. nigripes* e *O. stramineus*. Além disso, as distâncias genéticas entre *O. chacoensis* e (*O. nigripes* + *O. stramineus*) é menor (7,7 e 8,8%) do que entre *O. chacoensis* e (*O. longicaudatus* + *O. andinus* + *O. flavescens* + *Oligoryzomys* sp. 4), que varia entre 9,0 a 9,8%.

Um espécime de *O. chacoensis* (NK72388) se localiza em um ramo desproporcionalmente longo em relação ao outro ramo contendo quatro espécimes, e a distância genética entre os ramos variou de 7,8 a 8,5%, sugerindo duas linhagens evolutivas. A localidade

de coleta de NK72388 (Toledo, Paraguai) é próxima à localidade tipo de *O. chacoensis* (Musser e Carleton, 2005). Espécimes do outro ramo são de três localidades na Argentina com distância variando de 148 km (entre Orán e Sal Salvador) a 490 km (entre San Salvador e Las Lomitas). A distância de Toledo a localidade mais distante na Argentina (San Salvador) é cerca de 530 km, sugerindo que essa diferença entre os dois ramos não é consequência da distância geográfica.

Em estudos anteriores com *citb* um dos espécimes de *O. chacoensis* aqui analisados (TK62932) foi encontrado mais próximo de *O. nigripes* e *O. stramineus*, e outro espécime (NK72388) foi agrupado com *O. longicaudatus*, *O. andinus* e *O. flavescens* (Hanson *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009), associação similar à encontrada na análise de datação molecular. Outro estudo, também com *citb*, encontrou a mesma indefinição de posicionamento descrita acima para as análises de ML e BA (González-Ittig *et al.*, 2010). Análises com D-Loop encontrou *O. chacoensis* como em dos grupos mais basais em relação as outras espécies analisadas (*O. nigripes*, *O. destructor*, *O. longicaudatus* e *O. flavescens*; Rivera *et al.*, 2007). Podemos concluir que a posição e unidade filogenética de *O. chacoensis* precisa de uma reavaliação, aumentando o número de espécimes sequenciados, de marcadores genéticos, e a abrangência geográfica.

5.2.8 *Oligoryzomys longicaudatus*

Oligoryzomys longicaudatus está presente em ambos os lados da Cordilheira dos Andes, na Argentina e Chile, do limite sul do Deserto do Atacama até a latitude 51 °S, havendo ainda registros de populações isoladas em terras baixas das províncias de Buenos Aires e Rio Negro, na Argentina (Musser e Carleton, 2005; Palma *et al.*, 2005). Antes dividida em pelo menos quatro subespécies, agora consideradas coespecíficas baseadas em estudos genéticos, citológicos e morfológicos. Uma única subespécie (hoje aceita como *O. magellanicus*, não incluída nesse trabalho) habitando o extremo sul da América do Sul (Palma *et al.*, 2005).

Na filogenia molecular com *citb* *O. longicaudatus* faz parte do grupo contendo *O. andinus*, *O. flavescens* e *Oligoryzomys* sp. 4. Essa topologia é semelhante à encontrada na maioria dos trabalhos filogenéticos (González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2009), porém existem divergências sobre o posicionamento de *O. andinus* e *O. flavescens*, que serão discutidos no item seguinte.

5.2.9 *Oligoryzomys flavescens*, *O. andinus*, e *Oligoryzomys* sp. 4

Oligoryzomys flavescens é amplamente distribuído, habitando regiões de Mata Atlântica do Sudeste e Sul do Brasil, matas de galeria do Cerrado no Brasil central, leste do Paraguai e norte da Argentina, pampas do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, e regiões da planície do Chaco no Paraguai e Argentina (Carleton e Musser, 1989; Musser e Carleton, 2005; Weksler e Bonvicino, 2005). Sua localidade tipo encontra-se no município de Maldonado, no litoral do Uruguai (Musser e Carleton, 2005). Possui variação no complemento cromossômico ($2n=64-68$ e $NFa=66-70$) devido à presença de cromossomos supernumerários (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Espinosa e Reig, 1991; Sbalqueiro *et al.*, 1991).

Oligoryzomys andinus habita os Andes do Peru e Bolívia com registros de coleta ao longo de toda região andina do Peru e parte do altiplano da Bolívia, entre 1700 e 4000 m (Carleton e Musser, 1989; Musser e Carleton, 2005). A localidade tipo é no departamento de La Libertad, Peru, numa região semiárida da costa oeste dos Andes, a 1830 m de altura (Musser e Carleton, 2005). Seu cariótipo é $2n=60$ e $NFa=70$ (Gardner e Patton, 1976).

A identificação que consta no GenBank para alguns espécimes é incompatível com seu posicionamento filogenético nas análises filogenéticas com *citb*. Como já discutido (item 5.2.2), quatro espécimes identificados como *O. fornesi* agrupam-se com *O. flavescens*; e três espécimes identificados como *O. flavescens* agruparam-se com *O. andinus* em todas as análises. Os dados mostrados aqui e em alguns outros trabalhos (González-Ittig *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2010b; Rivera *et al.*, 2007) indicam que a diversidade dentro de *O. flavescens* é subestimada, e esse táxon pode representar pelo menos quatro linhagens evolutivas, recuperadas aqui com alto valor de suporte. A separação das quatro linhagens pode refletir sua ampla distribuição geográfica: a primeira linhagem contém nove espécimes dos Pampas gaúchos, a segunda contém sete espécimes dos Pampas da Argentina e Uruguai, a terceira linhagem contém dois espécimes da Mata Atlântica de São Paulo, e a quarta linhagem corresponde aos quatro espécimes identificados como *O. fornesi*, do norte da Argentina e leste do Paraguai. As distâncias genéticas também evidenciam a presença de linhagens distintas com altos valores entre os clados (2,8 a 6,0%), enquanto que entre os espécimes do mesmo clado estes valores são bem menores (não ultrapassam 1,5%). Existem dois trabalhos mostrando a diversidade genética de *O. flavescens* através de isoenzimas (Chiappero *et al.*, 1997; Perini *et al.*, 2004), porém esses estudos estão restritos a poucas localidades próximas entre si, o que representaria às supostas linhagens um e dois mostradas aqui. Além disso, a associação de *O. flavescens* a duas espécies de hantavírus (Delfraro *et al.*, 2003), em localidades diferentes na Argentina e Uruguai, também sugere que *O. flavescens* possa ser um complexo de espécies.

Os locais de coleta de *O. andinus* são extremamente espaçados, chegando até 1.800 km, e incluem ambientes de pampas da Argentina até os Andes bolivianos, o ponto mais distante. Esse táxon aparece como grupo irmão de *O. flavescens* (dividido em 4 subgrupos) na ML, mas na BA *O. andinus* e os quatro grupos de *O. flavescens* não possuem definição. A diversidade genética entre os espécimes de *O. andinus* também é grande, e a distância genética entre os espécimes da Bolívia e da Argentina chegam a 5,8%, o que sugere fortemente a presença de mais de uma linhagem evolutiva. Pelas análises filogenéticas, algumas sequências identificadas como *O. flavescens* no GenBank formariam um grupo com as sequências identificadas como *O. andinus* no GenBank, apesar da distância genética de ca. de 5%, o que seria consequência das diferentes paisagens geográficas de onde essas amostras são provenientes.

Parece haver ainda outra entidade taxonômica relacionada a *O. andinus* e *O. flavescens*, representada aqui por apenas um espécime (MUSA2625) e identificada como *Oligoryzomys* sp. 4. A presença dessa espécie não descrita já foi detectada (Carleton e Musser, 1989), e corresponde a espécimes de *Oligoryzomys* coletados nas regiões de puna dos Andes no Peru e Bolívia, em altitudes que variam de 2150 a 3650 m, diferentes morfologicamente de *O. andinus* (Carleton e Musser, 1989). Em todas as análises mostradas aqui, esse espécime aparece como mais basal em relação a *O. andinus* e *O. flavescens*.

Nesse trabalho, fica claro o relacionamento estreito entre *O. longicaudatus*, *O. flavescens* e *O. andinus*. As distâncias genéticas entre essas espécies são as menores distâncias interespecíficas dentro de *Oligoryzomys*, variando de 2,3% entre *Oligoryzomys* sp. 4 e *O. flavescens* a 3,7% entre *O. andinus* e *O. longicaudatus*. Como em vários outros grupos dentro de *Oligoryzomys*, essas espécies precisam de um estudo mais completo.

5.2.10 *Oligoryzomys nigripes* e *stramineus*

Oligoryzomys nigripes aparenta ser a espécie com maior distribuição geográfica do gênero, e também a mais generalista em relação ao uso dos ambientes. No Brasil, habita principalmente a Mata Atlântica (de Pernambuco ao Rio Grande do Sul), mas também ocorre no Cerrado (Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo), e pampas (Rio Grande do Sul). Fora do Brasil ocorre no Paraguai (a leste do rio Paraguai), Argentina (nas províncias de Buenos Aires, Misiones e Chaco) e no Uruguai (Musser e Carleton, 2005; Weksler e Bonvicino, 2005). Como não foi designado um espécime tipo na descrição original, um neótipo foi posteriormente designado, restringindo-se a localidade tipo para o Parque Nacional de Ybycuí, departamento de Paraguarí, Paraguai (Myers e Carleton, 1981). O cariótipo de *O. nigripes* é $2n=62$ e $NFa=78-82$, variações no número fundamental são devido a inversões pericêntricas, que não afetam a

fertilidade desses indivíduos (Bonvicino *et al.*, 2001; Bonvicino e Weksler, 1998; Myers e Carleton, 1981; Weksler e Bonvicino, 2005).

A história taxonômica de *O. nigripes* é polêmica, devido a informações desencontradas na literatura sobre seus sinônimos juniores. As evidências filogenéticas, cariológicas e morfológicas mostram que *O. delticola* e *O. eliurus* são coespecíficos com *O. nigripes* (González-Ittig *et al.*, 2010; Massoia, 1973; Myers e Carleton, 1981; Paresque *et al.*, 2007; Weksler e Bonvicino, 2005), apesar da discordância de outros estudos (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Carleton e Musser, 1989; Palma *et al.*, 2010b). Nesse trabalho, a discussão a respeito da sinonímia de *O. eliurus* é importante já que *O. utiaritensis* é considerado seu sinônimo junior (Musser e Carleton, 2005).

A localidade tipo de *O. eliurus* é no município de Itararé, sudoeste de São Paulo (Musser e Carleton, 2005). Inúmeros trabalhos com espécimes coletados nessa região e regiões adjacentes no Paraná descreveram apenas dois cariótipos: $2n=62$ e $NFa=80-82$ em animais maiores com ventre esbranquiçado, identificados como *O. nigripes*; e $2n=64-66$ e $NFa=66-68$ em animais menores, com ventre amarelado, identificados como *O. flavescens* (Almeida e Yonenaga-Yassuda, 1991; Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Bonvicino *et al.*, 2001; Bonvicino e Weksler, 1998; Paresque *et al.*, 2007; Sbalqueiro *et al.*, 1991; Weksler e Bonvicino, 2005; Yonenaga *et al.*, 1976). Os indivíduos apresentando o primeiro cariótipo compartilham o mesmo fenótipo com o holótipo de *O. eliurus* e com o neótipo de *O. nigripes*. O cariótipo $2n=62$ e $NFa=64$ de espécimes de regiões de Goiás, identificados como *O. eliurus* (Andrades-Miranda *et al.*, 2001), são na verdade a *O. fornesi*, como comprovam seus caracteres morfológicos, tamanho pequeno e ventre amarelado, como *O. flavescens* (Bonvicino e Weksler, 1998). Com esses argumentos, nesse trabalho *O. eliurus* é considerado sinônimo júnior de *O. nigripes*.

Em todas as análises filogenéticas *O. nigripes* forma um grupo coeso e com alto suporte com *O. stramineus*, com a distância genética baixa em todos os marcadores moleculares. Essa associação corrobora análises anteriores (González-Ittig *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2009). Além disso, apesar da ampla distribuição geográfica das amostras de *O. nigripes* utilizadas, essa espécie mostrou-se bem coesa, sem estruturação, em todas as análises. A diversidade intraespecífica de *O. nigripes* será discutida no item 5.4.

Oligoryzomys stramineus é uma espécie distribuída no centro e nordeste do Brasil, em regiões de Caatinga e Cerrado de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba e Pernambuco (Bonvicino e Weksler, 1998; Musser e Carleton, 2005; Weksler e Bonvicino, 2005). O cariótipo de *O. stramineus* é $2n=52$ e $NFa=68-70$, apresentando diferenças no número fundamental devido a inversões de um pequeno par acrocêntrico (Bonvicino e Weksler, 1998; Weksler e Bonvicino, 2005)

5.2.11 *Oligoryzomys rupestris*

Oligoryzomys rupestris é uma espécie que habita a região central do Brasil, em regiões elevadas (em torno de 1.000 m) específicas do Cerrado, denominadas campos rupestres (Weksler e Bonvicino, 2005). Seu cariótipo é $2n=44$ e $NFa=52$, o menor número diploide já encontrado no gênero (Weksler e Bonvicino, 2005).

Aqui foram apresentadas as primeiras análises filogenéticas que incluíram essa espécie. Nas análises com *coi* e *beta-fibint7*, *O. rupestris* foi encontrado em um grupo com *O. moojeni* e *O. utiaritensis*. Nas análises com *citb* também foram encontradas nesse grupo, juntamente com *O. destructor*, *O. delicatus* e *Oligoryzomys* sp. 1.

A distância genética de *citb* entre espécimes de clados diferentes chega a 6,1%. Porém, essa divisão não reflete uma divisão geográfica, já que o espécime MN50286, da mesma localidade que MN50326, MN50322 e MN50328 (Alto Paraíso de Goiás, GO), se agrupa com os espécimes LG214 e LG228 (Itaête, BA), e as duas localidades estão distantes pelo menos 700 km. Embora essas localidades façam parte de paisagens morfoclimáticas diferentes (Cerrado e Caatinga, respectivamente), os habitats de coleta são semelhantes, os campos rupestres citados anteriormente. Na filogenia com o *beta-fibint7*, foram incluídos três espécimes de *O. rupestris* (MN50326, MN50286 e MN50322), e os três possuem o mesmo haplótipo. Isso sugere que algum outro fenômeno recente está causando essa estruturação vista em *citb*, sendo necessários outros dados para elucidar esse problema.

5.2.12 *Oligoryzomys moojeni*

Oligoryzomys moojeni é uma espécie do Cerrado brasileiro de Goiás e Tocantins (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003; Weksler e Bonvicino, 2005). Seu cariótipo, $2n=70$ e $NFa=74$, apresenta um dos maiores números de cromossomos do gênero (Andrades-Miranda *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003; Weksler e Bonvicino, 2005).

Nas análises filogéticas com *coi*, *beta-fibint7* e *citb*, *O. moojeni* se agrupa com *O. rupestris* e *O. utiaritensis*. Nas análises com *citb*, *O. moojeni*+*O. rupestris* agrupam-se com *O. utiaritensis*. *O. moojeni* foi visto em outros trabalhos em um grupo contendo também *Oligoryzomys* sp. 1 e *O. delicatus* (González-Ittig *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2009), enquanto um trabalho recente encontrou *O. moojeni* como segunda espécie a diferenciar-se dentro de *Oligoryzomys*, após *O. microtis* (Hanson *et al.*, 2011). Na análise de datação molecular por *citb*, *O. moojeni* foi o quarto grupo mais basal de *Oligoryzomys*, e não se agrupou com *O. utiaritensis*

, *O. rupestris*, *Oligoryzomys* sp. 1 ou *O. delicatus*. Assim como ocorreu com *O. fornesi*, a exata posição filogenética de *O. moojeni* permanece incerta.

As análises com *citb* não mostraram *O. moojeni* monofilético: dois espécimes de *O. moojeni* agruparam-se com *O. utiaritensis*. Esses dois espécimes foram sequenciados independentemente, um deles sequenciado no presente trabalho, e o outro sequenciado por outro grupo de pesquisa (Miranda *et al.*, 2009). Esse agrupamento com *O. utiaritensis* não ocorreu nas análises com *coi* e *beta-fibint7*, que incluíram um dos espécimes (MN50307) parafiléticos nas análises com *citb*. Todas as incongruências filogenéticas que englobam *O. moojeni* serão discutidas abaixo.

5.3 Status taxonômico de *Oligoryzomys utiaritensis*

Os resultados indicam que espécimes de *Oligoryzomys* coletados em Campo Novo do Parecis (MT), Sapezal (MT) e Castelo dos Sonhos (PA) pertencem a uma espécie distinta das outras atualmente reconhecidas no gênero. Esses espécimes formam um grupo monofilético nas análises filogenéticas com os três marcadores moleculares utilizados. Além disso, seu cariótipo ($2n=72$ e $NF=76$, Bonvicino, com. pessoal) é diferente de todos os outros cariótipos descritos para *Oligoryzomys*. Morfometricamente, esses espécimes também são diferentes de outras espécies de *Oligoryzomys*.

Todos esses espécimes compartilham algumas características morfológicas com o holótipo de *O. utiaritensis* (Weksler, com. pessoal): pelagem ventral esbranquiçada, com as pontas dos pelos brancas e base cinza; limite entre a coloração ventral e lateral bem definido; cauda unicolor; forâmen incisivo nunca ultrapassando os alvéolos do primeiro molar. Embora essas características possam aparecer em outras espécies de *Oligoryzomys*, essa combinação é única entre espécimes dessa região. A comparação com a descrição de *O. mattogrossae*, outra espécie descrita a partir da mesma localidade tipo, mostrou que essas entidades taxonômicas são distintas (Weksler, com. pessoal). *Oligoryzomys mattogrossae* hoje é considerada sinônimo júnior de *O. microtis* (Musser e Carleton, 2005). Porém, como discutido acima, o status taxonômico de *O. microtis* necessita de uma grande revisão, e, assim como aconteceu com *O. utiaritensis*, *O. mattogrossae* pode ser uma espécie válida.

Oligoryzomys utiaritensis foi descrita a partir de espécimes coletados pela Expedição Científica Rondon-Roosevelt em Utiariti, nas margens do Rio Papagaio, hoje município de Sapezal, Mato Grosso (Allen, 1916). Posteriormente, *O. utiaritensis* foi considerado sinônimo júnior de *O. eliurus* (Carleton e Musser, 1989; Carleton e Musser, 1995). Como discutido acima, *O. eliurus* é aqui considerado sinônimo júnior de *O. nigripes*. Dessa forma, discutiremos aqui se

O. utiaritensis pode ser considerado sinônimo de *O. nigripes* ou uma espécie válida. Dados cariológicos e morfométricos mostram claramente que *O. nigripes* e *O. utiaritensis* são espécies distintas. As análises filogenéticas também mostram que essas espécies foram clados diferentes, inclusive em grupos distintos, e a distância genética entre elas é de 13,4% para *citb*, 18,5% para *coi* e 1,8% para *beta-fibint7*.

Oligoryzomys moojeni é, aparentemente, a espécie mais próxima de *O. utiaritensis*. A distância genética entre elas é de 7,1% para *citb*, 6,8% para *coi* e 1,4% para *beta-fibint7*, uma das menores em *Oligoryzomys*. Os dados cariológicos mostram que essas espécies são relacionadas intimamente, diferindo apenas por uma provável fusão/fissão em *tandem* entre dois cromossomos. Esse fenômeno acontece em diversos grupos de mamíferos (Robinson e Elder, 1993), e a disjunção anormal em possíveis heterozigotos resulta em rápida fixação da fusão/fissão (Elder e Hsu, 1988). Esse cenário sugere que fusões/fissões em *tandem* são mecanismos de isolamento pós-zigóticos muito eficientes, prevenindo a presença de híbridos férteis.

Uma discussão mais detalhada sobre o status taxnômico de *O. utiaritensis*, incluindo dados morfológicos e cariológicos, além de uma re-descrição da espécie, foi publicada recentemente como fruto do trabalho desta tese, e está disponível no Anexo VII.

5.4 Diversidade genética de *Oligoryzomys nigripes*

O padrão de diversidade molecular encontrado neste trabalho, com *citb* e *coi*, indica que *O. nigripes* possui uma grande diversidade genética, e uma expansão demográfica e geográfica recente ocorreu a partir de uma subpopulação provavelmente localizada no Sul do Brasil no passado, resultando na ampla distribuição geográfica atual.

As distribuições do número observado de diferenças entre pares de haplótipos foram unimodais, e a comparação com simulações sugerem uma expansão demográfica e geográfica. Os valores de F_s significativos e negativos (Fu, 1997) também corroboram essa hipótese. Outro fator que sugere uma expansão geográfica é a comparação da diversidade genética (através de π) ao longo da distribuição geográfica (Excoffier *et al.*, 2008). Com *citb* encontramos uma diversidade genética maior nas subpopulações do sul do Brasil (RS e SC), diminuindo nas subpopulações do sudeste (ES e RJ), e uma diversidade genética muito baixa na subpopulação do Paraguai. Isso pode ser intrigante se considerarmos que a maioria dos indivíduos das subpopulações de ES, RJ, SC e RS são da mesma localidade ou de localidades distantes no máximo 50 km, enquanto que os três indivíduos considerados como a subpopulação do Paraguai são de localidades distantes até 400 km entre si. Esse panorama sugere que a direção de

colonização de *O. nigripes* foi do Sul do Brasil em direção ao Sudeste em um primeiro momento, e a colonização das regiões adjacentes no Paraguai em uma segunda onda independente de colonização. Com *coi* o resultado foi similar. Apesar de não haver sequências provenientes de indivíduos do Paraguai, existem outras sequências provenientes de indivíduos de Goiás, Paraná e São Paulo. E o que foi visto é que a diversidade genética de PR e SP são intermediárias entre as subpopulações de SC/RS com maior diversidade e ES/RJ com menor diversidade. A subpopulação de Goiás possui uma diversidade genética alta, com um valor entre a de SC e PR.

Os dados de fluxo gênico também sugerem uma colonização direcional das regiões do Centro-Sudeste do Brasil e Paraguai a partir de indivíduos da região do Sul do Brasil. Para *citb*, é possível perceber que a taxa de fluxo gênico é alta na direção SC-RS => Paraguai, porém é baixa na direção oposta. Existe ainda uma nítida “quebra” entre as subpopulações do sul e do sudeste do Brasil. Apenas com *coi* foram amostradas regiões intermediárias, e com esse marcador é possível notar que a “quebra” ocorre entre PR e SP. Com esses dados, podemos imaginar a história demográfica de *O. nigripes* com pelo menos duas irradiações a partir da região onde seria a sua área de diferenciação original (ver item a seguir) – a região do Sul do Brasil, até o litoral do Paraná. Essas irradiações são representadas pela colonização das regiões de São Paulo e Goiás, culminando com a chegada de indivíduos no Espírito Santo.

Pela datação molecular com *citb* a subpopulação mais recente é a do Paraguai (43 mil anos), corroborando o que foi dito acima. Assumindo que nas subpopulações que foram analisadas tanto com *coi* quanto por *citb*, os valores encontrados foram similares, é possível pensar em um cenário, onde a subpopulação de SC e RS são as mais antigas, seguidas por PR e SP. As subpopulações de RJ, GO e ES são mais recentes em relação às outras do Brasil, sendo que essa última parece ser a mais recente de todas segundo o intervalo de 95% de densidade posterior. A posição geográfica de GO e ES, aliado ao tempo de divergência também similares, sugerem duas frentes de colonizações, uma para o Cerrado e outra para a Mata Atlântica do sudeste.

A rede de haplótipos com *citb* (Figura 4-33) possui um formato de estrela, com um haplótipo central, compartilhado por subpopulações de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de onde partem todos os outros haplótipos, a maioria separada por poucas mutações. Esse padrão é tido como evidência de uma expansão populacional recente (Avise, 1986), onde houve pouco tempo para a diferenciação de grupos de haplótipos exclusivos de cada região geográfica. Aliado a esse padrão, temos também diversos haplótipos de diferentes subpopulações conectados entre si, independentemente da conexão com o haplótipos ancestral, o que pode indicar algum grau de fluxo gênico entre essas subpopulações. A rede de haplótipos com *coi* (Figura 4-35) mostrou um

padrão similar à rede com *citb*. Porém, na análise com *coi* percebe-se uma estruturação geográfica incipiente, com a maioria dos haplótipos formando grupos com outros da mesma região geográfica. Existem algumas exceções: os haplótipos de SP e MG dividiram-se em dois grupos, agrupando-se tanto com haplótipos do Sul do Brasil, quanto do Sudeste (ES e RJ). Além disso, um haplótipo de RJ e outro de ES estão muito distantes dos outros da mesma região, e os haplótipos de GO não formam um grupo coeso.

Uma análise da variação cariológica de *O. nigripes* ao longo de sua distribuição geográfica mostrou uma distribuição clinal dos polimorfismos cromossômicos entre populações do sul do Brasil e Paraguai e populações do sudeste e nordeste do Brasil (Paresque *et al.*, 2007), diferente dos dados aqui obtidos, onde não encontramos esse padrão clinal.

Apenas dois estudos descreveram a diversidade genética de *O. nigripes*. Um desses trabalhos, utilizando *citb* como marcador, analisou um gradiente altitudinal ao longo de 58 km numa região de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul (Gonçalves *et al.*, 2009), e chegou a conclusão que não existe absolutamente nenhuma estruturação genética entre as três populações analisadas. Outro estudo, utilizando isoenzimas como marcadores, também encontrou uma falta de estruturação entre seis populações também do Rio Grande do Sul (Perini *et al.*, 2004). Esses resultados, juntamente com os dados mostrados aqui, sugerem que *O. nigripes* está sujeito a um isolamento por distância, porém os marcadores utilizados até o momento e a falta de amostragem em algumas regiões, como Uruguai, Argentina e Paraguai, não permitem uma compreensão total da história demográfica desta espécie.

5.5 História evolutiva de *Oligoryzomys*

Nossos resultados mostram que a diferenciação entre as tribos Thomasomyini (aqui representado por *Rhipidomys*) e Oryzomyini ocorreu há 6,4 milhões de anos atrás, compatível com o encontrado através de genes nucleares (Engel *et al.*, 1998; Stepan *et al.*, 2004). Segundo Reig (1984, 1986), a área de diferenciação original³ dos Oryzomyini estava localizada nos Andes do Equador, Colômbia e Venezuela, no Mioceno Inferior e Plioceno, e o surgimento de *Oligoryzomys* teria ocorrido a partir de linhagens que invadiram as terras baixas do noroeste dos

³ “ (...) Tal conceito foi introduzido diante da necessidade de elucidar e precisar conceitos de uso frequente em biogeografia, como ‘centro de origem’ e ‘centro de dispersão’, que são vagos demais. O conceito de Área de Diferenciação Original (ADO) foi definido como o ‘o espaço geográfico dentro do qual um determinado taxon experimentou a principal diferenciação (cladogênese) dos taxa subordinados que o compõem’. (...) a ADO de um dado taxon é a área onde se origina um novo taxon derivado do primeiro por cladogênese e que em seguida invade outra área na qual experimenta sua principal cladogênese e que, portanto, constitui a ADO do taxon derivado.” Reig, 1986, pág. 344

Andes, a oeste da atual Floresta Amazônica. Os resultados aqui mostrados indicam que *Oligoryzomys* surgiu há aproximadamente 4,1 milhões de anos (2,5 – 6 milhões de anos), durante o Plioceno.

O grupo mais antigo encontrado aqui e em outros trabalhos, *O. microtis*, iniciou sua diferenciação há aproximadamente 2,6 milhões de anos (1,3 – 3,9 milhões de anos), entre o Plioceno e o Pleistoceno. O hábitat atual desse complexo de espécies – regiões baixas da Floresta Amazônica – e a filogenia aqui encontrada reforçam a hipótese de que *Oligoryzomys* surgiu nas terras baixas a leste dos Andes Setentrionais (ADO1, Figura 5-1), e que sua diferenciação ocorreu do norte para o sul (com exceção das espécies da América Central), como ilustra a Figura 5-1, e das altitudes mais baixas para as mais altas (Engel *et al.*, 1998; Marshall, 1979; Reig, 1984; Reig, 1986).

A partir destes cenários foi postulada uma hipótese para a diversificação das espécies de *Oligoryzomys* analisados nesse estudo. Devido aos problemas associados aos marcadores mitocondriais discutidos posteriormente nesse trabalho, uma análise adicionando um outro marcador poderia melhorar a resolução. Os dados mostrados nesse trabalho (ausência de autocorrelação de taxas evolutivas na filogenia e desvio padrão da taxa não tendendo a zero) sugerem que os ramos evoluem a taxas diferentes dentro de uma mesma linhagem, indicando o relógio molecular relaxado como o melhor método. Nenhuma análise desse tipo foi até agora realizada para esse gênero. Todos os números considerados na datação molecular são as médias dos valores encontrados do tempo até o último ancestral comum do grupo. Porém, vale ressaltar que o intervalo de 95% deve ser considerado, e esse intervalo sempre virá entre parênteses.

A partir da Amazônia, uma linhagem distinta daquela que originou *O. microtis*, se dispersou dando origem aos ancestrais de pelo menos cinco linhagens:

- A linhagem ancestral de *Oligoryzomys* sp. 2 e sp. 3 que dispersou para os Andes, em direção ao sul, há aproximadamente 3,4 milhões de anos (2 – 4,8);
- A linhagem ancestral de *O. fornesi* que dispersou para a região onde hoje é o Cerrado brasileiro, há aproximadamente 3,1 milhões de anos (2,5 – 3,7);
- A linhagem ancestral de *O. fulvescens*, *O. costaricensis* e *O. vegetus* que dispersou para a América Central, há aproximadamente 2,8 milhões de anos (2,1 – 3,5);
- A linhagem ancestral de *O. moojeni*, *O. delicatus*, *Oligoryzomys* sp. 1, *O. rupestris*, *O. destructor* e *O. utiaritensis* que dispersou para a região onde hoje é o Cerrado brasileiro, há aproximadamente 2,5 milhões de anos (1,6 – 2,9);
- A linhagem ancestral de *O. longicaudatus*, *O. andinus*, *O. flavescens*, *O. chacoensis*, *O. stramineus* e *O. nigripes* dispersou para o sul da América do Sul (provavelmente na

região entre o Paraguai, norte da Argentina e sudoeste do Brasil), há aproximadamente 2,2 milhões de anos (1,2 – 2,6).

Os dados desse trabalho corroboram a hipótese de que a presença de *Oligoryzomys* na América Central representa uma colonização da linhagem ancestral de *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens* vinda da região Amazônica (Palma *et al.*, 2010b; Rogers *et al.*, 2009; Hanson *et al.*, 2011; Figura 5-1). *Oligoryzomys costaricensis*, que habita as florestas tropicais baixas do Panamá e Costa Rica, é a espécie mais basal do grupo, seguida por *O. vegetus* (habitante das florestas tropicais altas da mesma região) e *O. fulvescens*, cuja distribuição se estende até o México. Aparentemente a diversificação das três espécies foi simultânea, há aproximadamente 300 mil anos.

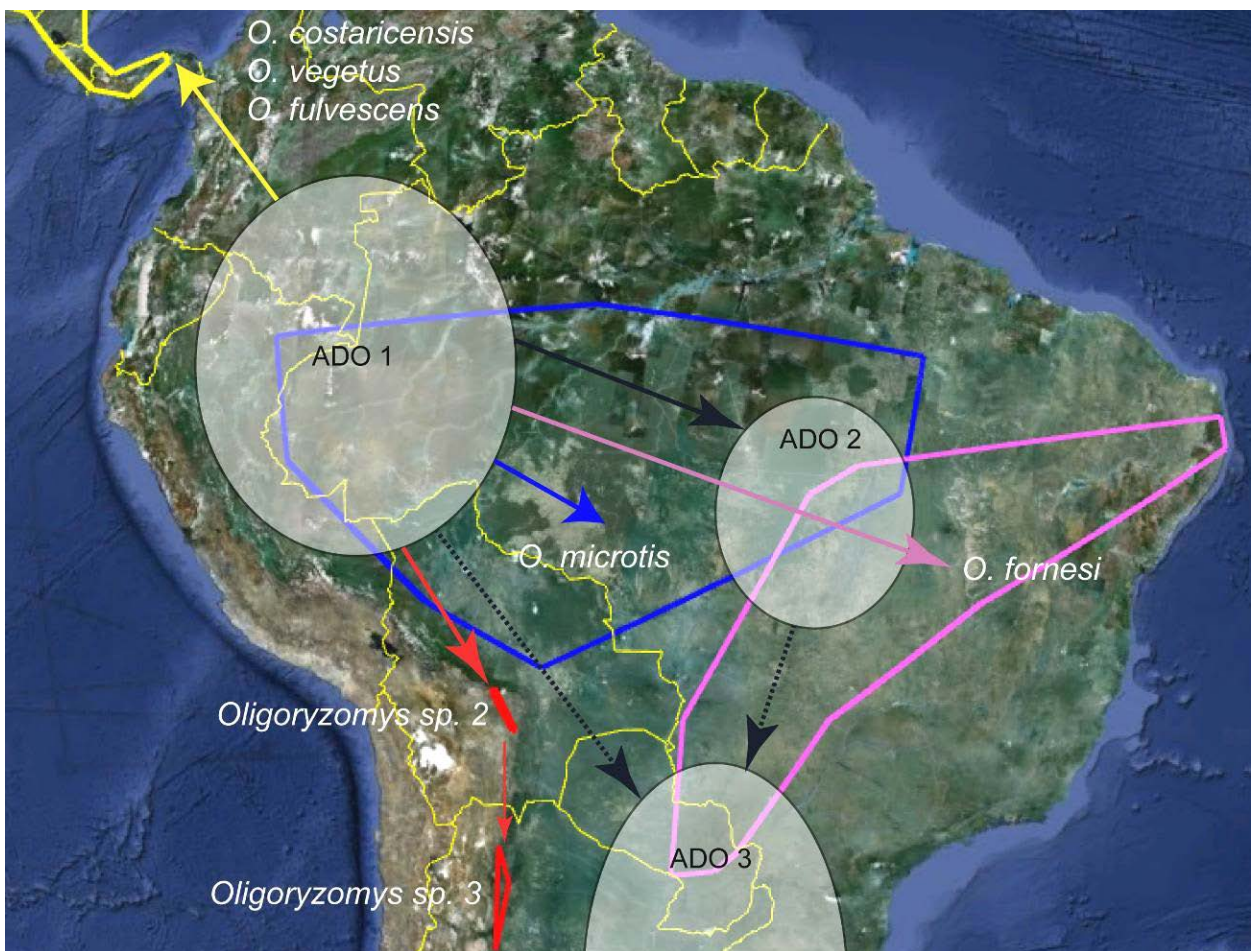


Figura 5-1. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de *Oligoryzomys*. A elipse branca ADO1 representa a área de diferenciação original do gênero. A elipse branca ADO2 representa a área de diferenciação original de *O. moojeni*, *O. utiaritensis*, *O. delicatus*, *O. destructor*, *O. rupestris* e *Oligoryzomys* sp.1. A elipse branca ADO3 representa a área de diferenciação original de *O. chacoensis*, *O. andinus*, *O. longicaudatus*, *O. flavescens*, *O. nigripes* e *O. stramineus*. As distribuições aproximadas das espécies são: azul = *O. microtis*, rosa = *O. fornesi*, vermelhos = *Oligoryzomys* sp.2 e sp.3, amarelo = *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens*. As setas representam a diversificação dos ancestrais: azul = *O. microtis*, preta = entres as áreas de diversificação (ADOs) de *Oligoryzomys*, rosa = *O. fornesi*, amarela = *O. costaricensis*, *O. vegetus* e *O. fulvescens*, vermelha = *Oligoryzomys* sp. 2 e sp. 3.

Oligoryzomys sp. 2 e *Oligoryzomys* sp. 3 representam a primeira invasão do gênero nos Andes a partir do ADO1, em direção ao sul, *Oligoryzomys* sp. 2, mais antiga e mais próximo da Amazônia, diversificou-se há 900 mil anos (392 mil – 1,5 milhão de anos), enquanto que *Oligoryzomys* sp. 3, mais recente, diferenciando-se há 110 mil anos (9 mil – 256 mil anos), como ilustra a Figura 5-1.

A origem das outras espécies parece incerta, e não é possível saber quantas linhagens evolutivas diferentes saíram da Amazônia (ADO1) e foram em direção ao centro-sul da América do Sul. Aparentemente, uma dessas linhagens deu origem a *O. fornesi*, que iniciou sua diversificação há 550 mil anos (192 mil – 970 mil anos), e hoje habita o Cerrado e outras paisagens de savana da América do Sul, do Nordeste brasileiro ao Paraguai (Figura 5-1).

Outra linhagem originou algumas espécies distribuídas ao norte da América do Sul, centro da Brasil e Andes, designadas grupo verde. As topologias filogenéticas desse trabalho em de outros da literatura indicam que a área de diferenciação original dessas espécies (ADO2) é a região onde hoje é o Cerrado do Brasil Central (Figura 5-2). A espécie mais antiga desse grupo é *O. moojeni*, que iniciou sua diversificação há 570 mil anos (178 mil – 1 milhão de anos), encontrada apenas em regiões do Cerrado de Goiás e Tocantins. A segunda diferenciação dentro do grupo foi o surgimento de *O. delicatus* e *Oligoryzomys* sp. 1, a partir de uma linhagem que invadiu o norte da América do Sul há aproximadamente 1,6 milhão de anos (1,1 – 2,15 milhões de anos). Após, uma linhagem deu origem, a leste, a *O. rupestris*, há 1,7 milhão de anos (1,05 – 2,42 milhões de anos), e essa espécie, que habita regiões altas de campos rupestres, diversificou-se há 30 mil anos (1 – 88 mil anos). A oeste, uma outra linhagem deu origem a *O. utiaritensis* e *O. destructor* há 1,35 milhão de anos (0,7 – 2,1 milhões de anos). O ancestral de *O. utiaritensis* chegou a região de transição entre Cerrado-Amazônia no centro-oeste do Brasil e iniciou sua diversificação há 157 mil anos (46 – 298 mil anos), e o ancestral de *O. destructor* alcançou a região andina do Peru e Equador há 23 mil anos (1 – 74 mil anos).

A origem das outras espécies é incerta, podendo ser a partir de linhagens da Amazônia (ADO1) ou do Brasil Central (ADO2) (Figura 5-3). Essa diferenciação ocorreu há 2,2 milhões de anos (1,2 – 2,6 milhões de anos). Dados filogenéticos e geográficos sugerem que área de diferenciação original dessas outras espécies de *Oligoryzomys* foi a região do noroeste da Argentina, Paraguai e sudoeste do Brasil (ADO3), e somente depois de diferenciadas as espécies ocuparam a ampla área geográfica em que ocorrem atualmente.

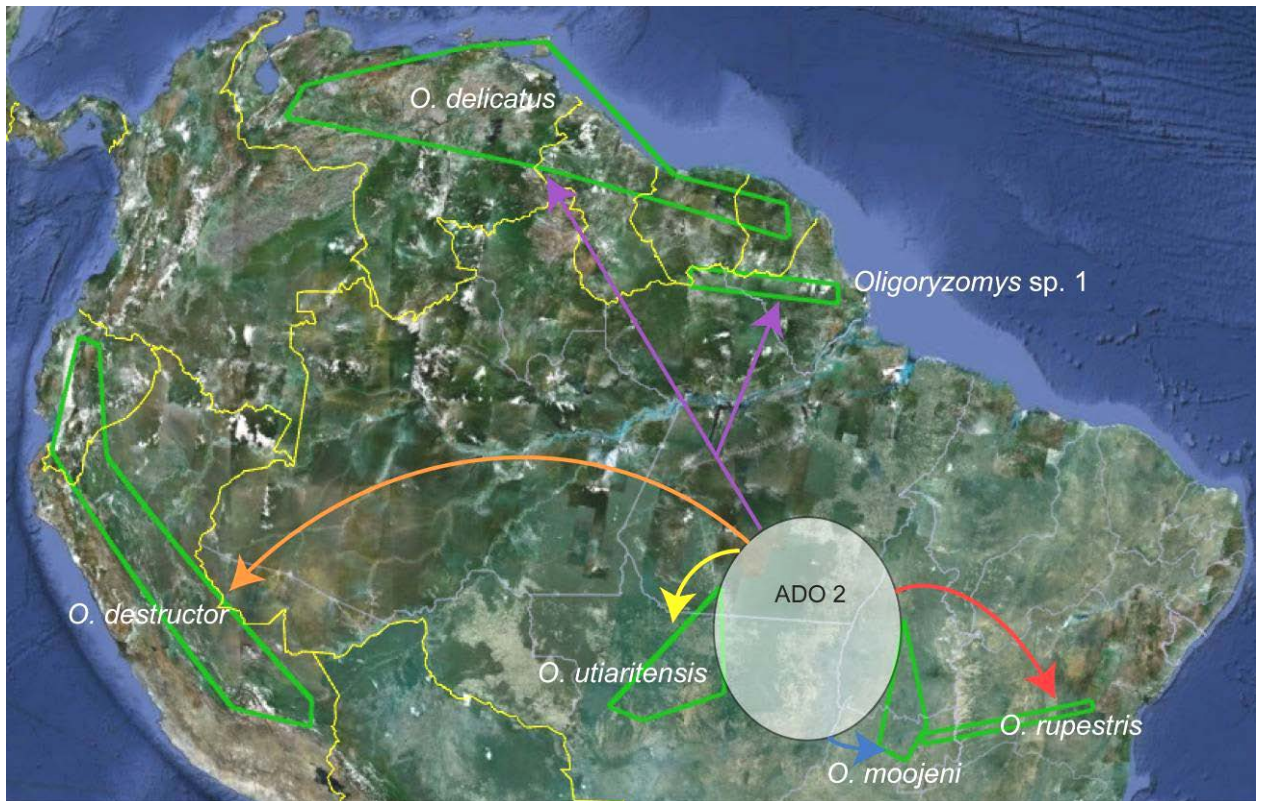


Figura 5-2. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de *Oligoryzomys*. A elipse branca ADO2 representa a área de diferenciação original de *O. moojeni*, *O. utiaritensis*, *O. delicatus*, *O. destructor*, *O. rupestris* e *Oligoryzomys* sp.1 (grupo verde). Os contornos verdes representam a distribuição geográfica atual aproximada dessas espécies. As setas representam a diversificação dos ancestrais de *O. rupestris* (vermelha), *O. moojeni* (azul), *O. utiaritensis* (amarelo), *O. destructor* (laranja), *O. delicatus* e *Oligoryzomys* sp.1 (roxa) a partir da ADO2.

Dentro desse grupo, as espécies do grupo roxo (*flavescens*, *longicaudatus*, *andinus* e *chacoensis*) são mais antigas. A diversificação de *O. flavescens* ocorreu há 400 mil anos (160 – 700 mil anos), e hoje sua população, que tem uma ampla distribuição geográfica, é estruturada geneticamente. Existem registros fósseis associados a *O. flavescens*, datados do piso Ensenadense (0,8 – 1,2 milhão de anos) da Argentina (Vogolino e Pardiñas, 2005). Porém, a identificação desses fósseis foi feita a partir de comparações do tamanho do primeiro molar com as espécies atuais de *Oligoryzomys* que habitam a região. Encontramos a maioria das espécies de *Oligoryzomys* diversificando-se há não mais de 1 milhão de anos, e provavelmente esses fósseis não são de *O. flavescens* ou de alguma espécie atual. O tempo de diversificação de *O. longicaudatus* de 290 mil anos (91 – 540 mil anos) foi compatível com todos os trabalhos que relatam o primeiro aparecimento dessa espécie (a mais representada do gênero no registro fóssil) no piso Lujanense (entre 11 a 800 mil anos atrás) do Chile e Argentina (Pardiñas, 2008; Pardiñas *et al.*, 2002). A mesma época de diversificação foi encontrada para *O. andinus*. Com posicionamento filogenético incerto, *O. chacoensis* diferenciou-se há 110 mil anos (20 – 250 mil anos).

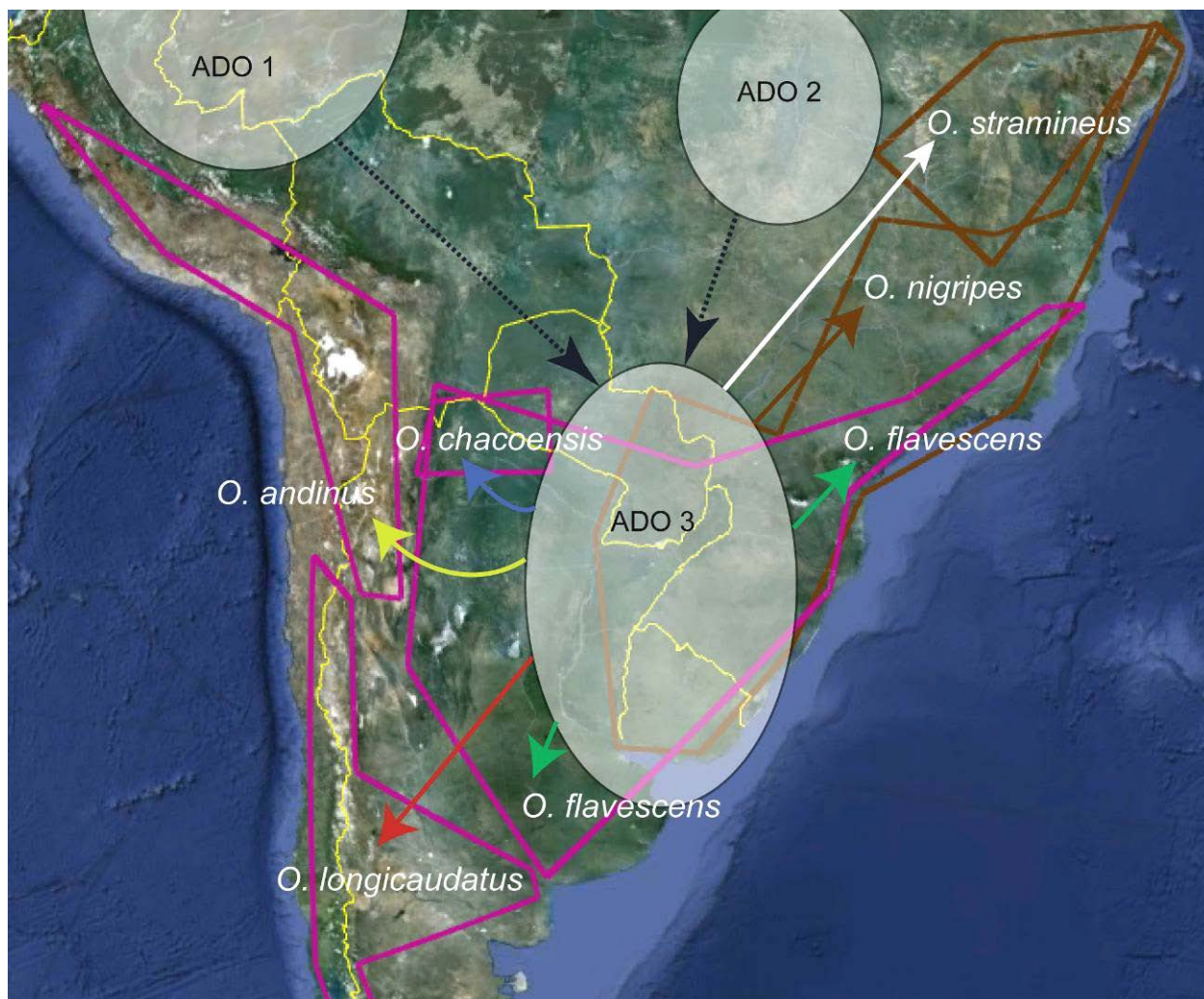


Figura 5-3. Mapa mostrando a hipótese sobre a origem biogeográfica de *Oligoryzomys*. As elipses ADO1 e ADO2 foram descritas nas figuras 5-1 e 5-2. A elipse ADO3 representa a área de diferenciação original de *O. chacoensis*, *O. andinus*, *O. longicaudatus*, *O. flavescens* (grupo roxo), *O. nigripes* e *O. stramineus* (grupo marrom). Os contornos roxos representam a distribuição geográfica atual aproximada de *O. chacoensis*, *O. andinus*, *O. longicaudatus* e *O. flavescens*. Os contornos marrons representam a distribuição geográfica atual aproximada de *O. nigripes* e *O. stramineus*. As setas representam a diversificação dos ancestrais de *O. longicaudatus* (vermelha), *O. andinus* (amarela), *O. chacoensis* (azul), *O. flavescens* (verde), *O. nigripes* (marrom) e *O. stramineus* (branco) a partir da ADO3. As setas pretas pontilhadas representam as possíveis origens da ADO3.

O tempo até o último ancestral comum de *O. nigripes* encontrado nesse trabalho foi de 190 mil anos (61 – 365 mil anos). A extensão geográfica que *O. nigripes* ocupa pode ser comparada a de *O. flavescens*. Nesta última, foi encontrada uma forte estruturação genética, com distâncias genéticas que alcançam a de espécies distintas, claramente associadas à distância geográficas. O mesmo padrão não foi encontrado em *O. nigripes*, o que pode ser consequência de *O. nigripes* ser uma espécie mais recente que *O. flavescens* (400 mil anos).

Oligoryzomys stramineus, espécie filogeneticamente mais próxima de *O. nigripes* em todas as análises, diferenciou-se há 90 mil anos (8 – 210 mil anos). Apesar de sua distribuição geográfica se sobrepor com a distribuição de outras espécies, como *O. moojeni* e *O. fornesi*, *O.*

stramineus é originado de uma linhagem vinda do sul da América do Sul, e pode estar associada a ampliação da distribuição de *O. nigripes*, associado a Mata Atlântica, do sul para o nordeste do Brasil, com quem também ocorre em simpatria em Minas Gerais (Weksler e Bonvicino 2005).

5.6 Problemas e limitações do uso de genes mitocondriais em estudos evolutivos

Durante os sequenciamentos necessários para realizar o presente trabalho, surgiram inúmeros problemas, já apresentados no item 4.9. Mesmo repetindo o sequenciamento de algumas amostras, os problemas se repetiram na maioria das vezes. Diversas sequências foram descartadas por apresentarem muitas ambiguidades, códons de parada prematuros e posicionamento filogenético considerado anormal (considerando outras informações taxonômicas, como cariótipo, morfologia e localização geográfica).

Existe uma extensa literatura que descreve a integração de sequências mitocondriais no genoma nuclear, Numts, de diversas espécies de vertebrados e invertebrados (Hazkani-Covo *et al.*, 2010), e a coamplificação dessas sequências e sua inclusão em estudos evolutivos pode causar diversos problemas de interpretação de resultados. Por exemplo, resultados errôneos em estudos populacionais de gorila já foram publicados, causando problemas na interpretação de unidades evolutivas que poderiam ser utilizadas em medidas de conservação (Anthony *et al.*, 2007; Thalmann *et al.*, 2005). Diversos estudos ainda apontam como uma das causas da coamplificação de Numts o uso de iniciadores universais (Smith *et al.*, 1992), o que aconteceu nesse trabalho. No presente trabalho, apresentamos diversas evidências de que esse fenômeno ocorre em *Oligoryzomys*. Apesar de haver outros fenômenos que levam a existência de haplótipos mitocondriais diferentes, a marcação nuclear de sequências mitocondriais em cromossomos de *O. nigripes*, mostradas aqui por FISH, indica que os diversos haplótipos encontrados de *citb* no mesmo indivíduo ocorram devido a presença de Numts.

Analisando *citb* foram detectadas sequências que não podem pertencer ao genoma mitocondrial, devido a presença de a um alto grau de polimorfismo (tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos) e a presença de códons de parada prematuros. Algumas dessas sequências podem ter sido produzidas por erros na amplificação pela Taq polimerase, porém algumas evidências sugerem que esse não é o caso da maioria das sequências. Por exemplo, a taxa de inserções/deleções causadas pela Taq polimerase é cinco vezes menor do que a taxa de mutações pontuais (Eckert e Kunkel, 1990; Tindall e Kunkel, 1988), e em diversas sequências foram encontrados um número alto desse tipo de alteração, algumas vezes compartilhados por mais de um haplótipo. Algumas sequências que não são mitocondriais (como as de *O. moojeni* com vários códon de parada) não apresentam inserções/deleções, o que nos leva a crer que a maior

parte desse tipo de alterações, encontrada em sequências de sete espécimes, não é devido a erros da Taq polimerase. Além disso, estudos mostram que pelo menos 56% das mutações produzidas pela Taq polimerase são substituições do tipo C↔T (Tindall e Kunkel, 1988). Apenas três (*O. microtis* SVS04, *O. stramineus* MN46410 e *O. rupestris* MN50326) dos oito espécimes clonados se encaixam nesse padrão.

Entre as seis espécies de *Oligoryzomys* com clone de *citb*, a única em que não foi detectado a presença de Numts foi *O. microtis* (SVS04). Além da evidência da taxa de substituição discutida acima, não foram encontradas inserções/deleções, nem haplótipos muito diferenciados. Porém, alguns estudos apontam que a clonagem não é um método eficiente para detectar todas as inserções presentes em um indivíduo, independentemente do número de clones analisados (Chung e Steiper, 2008; Hlaing *et al.*, 2009; Mirol *et al.*, 2000).

Em amostras de *O. fornesi*, *O. nigripes* e *O. moojeni*, diversas sequências foram encontradas, algumas próximas ao que parece ser o haplótipo mitocondrial, e outras não. Haplótipos de clones de *O. nigripes* e *O. fornesi*, geneticamente similares as espécies do gênero, foram encontrados em uma posição filogenética basal em relação aos haplótipos não clonados de *Oligoryzomys*. Alguns Numts podem representar verdadeiros fósseis moleculares, com sequências que se assemelhariam às sequências ancestrais, pois a taxa de mutação nuclear é mais baixa do que a taxa de mutação mitocondrial (Hlaing *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 1996; Mirol *et al.*, 2000; Nergadze *et al.*, 2010). As sequências encontradas aqui podem representar uma inserção anterior a diferenciação das espécies existentes do gênero. Porém, mais estudos desse tipo, ou até mesmo análises genômicas, precisam ser realizados para detectar a presença dessas inserções em outras espécies de *Oligoryzomys*, para corroborar essa hipótese. O mesmo fenômeno ocorre em *O. moojeni*, porém os haplótipos clonados não parecem tão antigos, e agrupam-se com espécies filogenéticas próximas como *O. utiaritensis* e *O. rupestris*. Isso poderia ser decorrente de inserções ocorridas antes e durante a diferenciação desse grupo de espécies. O agrupamento de sequências de *O. moojeni* com as de *O. utiaritensis* na filogenia com *citb* pode ser explicado por esse fenômeno: sequências de Numts dessas amostras foram amplificadas pela PCR, e não a sequência mitocondrial. Além disso, diversas outras evidências apontam que esses espécimes sejam *O. moojeni*, mostrando que pode haver problema com identificação baseadas apenas em sequências de genes mitocondriais.

Haplótipos de clones muito próximos às sequências presumivelmente mitocondriais, podem representar inserções recentes, que não tiveram tempo de se diferenciar. Esse fenômeno já foi descrito em estudos com clones e análises do genoma nuclear completo (Hlaing *et al.*, 2009; Mirol *et al.*, 2000), onde foram encontradas sequências quase idênticas às sequências mitocondriais. Não foram encontrados sequências de clones de *O. rupestris* e *O. stramineus* fora

do clado que contém outras sequências dessas espécies. Como vimos no item 5.2.11, a diversidade encontrada dentro de *O. rupestris* é maior que a esperada, e isso pode ser decorrente de uma diversificação recente ou de Numts. Porém, não foram encontrados clones que justificassem essa segunda hipótese.

Também foi detectada a presença de Numts de *coi*, mas as sequências dos clones eram mais similares entre si, do que as encontradas com *citb*. Nas três espécies clonadas, as taxas de C⇌T foram menores que 43%, e os haplótipos clonados encontrados se agrupam com outras sequências da mesma espécie.

A extensão e quantidade de Numts variam enormemente entre as espécies já analisadas (Hazkani-Covo *et al.*, 2010). Em todas as análises com genoma nuclear completo, toda a extensão do genoma mitocondrial está representada no núcleo, sem uma preferência por alguma região específica (Hazkani-Covo *et al.*, 2010; Hlaing *et al.*, 2009). Diversas evidências ainda mostram que a produção de Numts é um processo contínuo, existindo inserções antigas e compartilhadas por diversos grupos e inserções recentes, muito semelhantes a sequência mitocondrial (Hazkani-Covo *et al.*, 2010; Hlaing *et al.*, 2009; Nergadze *et al.*, 2010). Dessa forma, não podemos excluir a possibilidade do gênero *Oligoryzomys*, e outros roedores, apresentarem Numts. Isso não altera a utilidade dos marcadores mitocondriais em estudos evolutivos. Porém, esses estudos precisam ser acompanhados de outros tipos de dados, como marcadores nucleares, morfologia e cariótipos, para que as conclusões tiradas não sejam mascaradas pela possível homoplasia causada pelos Numts.

Conclusões

6 - Conclusões

- Considerando apenas as espécies analisadas aqui, *Oligoryzomys* é um gênero monofilético, com pelo menos quatro grupos de espécies;
- A diversidade de *Oligoryzomys* é subestimada, podendo existir pelo menos quatro espécies não descritas; as análises também revelaram possíveis erros de identificação nas sequências depositadas no GenBank;
- Os três marcadores moleculares utilizados (*citb*, *coi* e *beta-fibint7*) nas análises filogenéticas mostraram topologias na maioria das vezes coincidentes, e poderiam ser utilizados em conjunto para uma filogenia completa do gênero;
- *Oligoryzomys* diferenciou-se dos outros orizomíneos no final do Mioceno e início do Plioceno, há aproximadamente 6,5 milhões de anos, sendo a espécie *O. microtis* a espécie mais antiga, diferenciando-se há aproximadamente 2,5 milhões de anos, e *O. destructor* a espécie mais recente, diferenciando-se há aproximadamente 23 mil anos ;
- *Oligoryzomys nigripes* possui uma estruturação genética incipiente entre subpopulações do Sudeste e Sul do Brasil, mas a diferenciação entre as subpopulações dentro dessas regiões é pequena;
- A área de diferenciação original de *O. nigripes* é a região do sul do Brasil, e pelo menos duas frentes de colonização ocorreram: uma em direção ao Paraguai e outra em direção ao centro e sudeste do Brasil;
- *Oligoryzomys utiaritensis* é uma espécie válida, distinta de *O. nigripes* pela morfologia, morfometria, filogenia molecular e citogenética;
- Existem inserções de sequências mitocondriais no genoma nuclear de pelo menos cinco espécies de *Oligoryzomys*.

Referências

7 - Referências

- Allen, JA (1916). "Mammals collected on the Roosevelt Brazilian Expedition, with field notes by Leo E. Miller." Bulletin of the American Museum of Natural History **35**: 559-610.
- Almeida, EJC e Yonenaga-Yassuda, Y (1991). "Pericentric inversions and sex chromosome heteromorphisms in *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae)." Caryologia **44**: 63-73.
- Andrades-Miranda, J, Oliveira, LF, Lima-Rosa, CAV, Nunes, AP, Zanchin, NIT, *et al.* (2001). "Chromosome studies of seven species of *Oligoryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Brazil." Journal of Mammalogy **82**(4): 1080-1091.
- Anisimova, M e Gascuel, O (2006). "Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative." Systematic Biology **55**(4): 539-552.
- Aniskin, VM e Volobouev, VT (1999). "Comparative chromosome banding of two South-American species of rice rats of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae)." Chromosoma Research **7**: 557-562.
- Anthony, NM, Clifford, SL, Bawe-Johnson, M, Abernethy, KA, Bruford, MW, *et al.* (2007). "Distinguishing gorilla mitochondrial sequences from nuclear integrations and PCR recombinants: guidelines for their diagnosis in complex sequence databases." Molecular Phylogenetics and Evolution **43**(2): 553-566.
- Antunes, A, Pontius, J, Ramos, MJ, O'Brien, SJ e Johnson, WE (2007). "Mitochondrial Introgressions into the Nuclear Genome of the Domestic Cat." Journal of Heredity **98**(5): 414-420.
- Avise, JC (1986). "Mitochondrial DNA and the Evolutionary Genetics of Higher Animals." Philosophical Transactions of the Royal Society of London **B312**(1154): 325-342.
- Avise, JC, Arnold, J, Ball, RM, Bermingham, E, Lamb, T, *et al.* (1987). "Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics." Annual Review of Ecology and Systematics **18**: 489-522.
- Ballard, JWO e Whitlock, MC (2004). "The incomplete natural history of mitochondria." Mol Ecol **13**(4): 729-744.
- Bandelt, HJ, Forster, P e Rohl, A (1999). "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies." Molecular Biology and Evolution **16**(1): 37-48.
- Bonvicino, CR, D'Andrea, PS e Borodin, PM (2001). "Pericentric inversion in natural populations of *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Sigmodontinae)." Genome **44**(5): 791-796.

- Bonvicino, CR e Moreira, MA (2001). "Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences." Molecular Phylogenetics and Evolution **18**(2): 282-292.
- Bonvicino, CR, Moreira, MAM e Seuánez, HN (2006). Análise Genética de Mamíferos Silvestres de Importância Sanitária e Econômica. Dimensões Humanas da Biodiversidade – O desafio de novas relações sociedade-natureza no século XXI. Garay, I e Becker, B. Petrópolis, Vozes: 283-298.
- Bonvicino, CR, Oliveira, JA e D'Andrea, PS (2008). Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS.
- Bonvicino, CR e Weksler, M (1998). "A new species of *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from northeastern and central Brazil." Zeitschrift für Säugetierkunde **63**: 90-103.
- Borisenko, AV, Lim, BK, Ivanova, NV, Hanner, RH e Hebert, PDN (2008). "DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname." Molecular Ecology Resources **8**(3): 471-479.
- Bradley, RD e Baker, RJ (2001). "A test of the genetic species concept: Cytochrome *b* sequences and mammals." Journal of Mammalogy **82**(4): 960-973.
- Bradley, RD, Durish, ND, Rogers, DS, Miller, JR, Engstrom, MD, *et al.* (2007). "Toward a Molecular Phylogeny for *Peromyscus*: Evidence from Mitochondrial Cytochrome-b Sequences." Journal of Mammalogy **88**(5): 1146-1159.
- Cabrera, A (1961). "Catalogo de los mamíferos de America del Sur." Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia **4**(2): 309-732.
- Calderón, G, Pini, N, Bolpe, J, Levis, S, Mills, J, *et al.* (1999). "Hantavirus Reservoir Hosts Associated with Peridomestic Habitats in Argentina." Emerging Infectious Diseases **5**(6): 792-797.
- Calvignac, S, Konecny, L, Malard, F e Douady, CJ (2011). "Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts)." Mitochondrion **11**(2): 246-254.
- Capllonch, P, Autino, A, Díaz, M, Barquez, RM e Goytia, M (1997). "Los Mamíferos del Parque Biológico Sierra de San Javier, Tucumán, Argentina: Observaciones sobre su Sistemática y Distribución." Mastozoología Neotropical **4**(1): 49-71.
- Carleton, MD e Musser, GG (1989). "Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): a synopsis of *Microryzomys*." Bulletin of the American Museum of Natural History **191**: 1-83.

- Carleton, MD e Musser, GG (1995). "Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae): definition and distribution of *Oligoryzomys vegetus* (Bangs, 1902)." Proceedings of the Biological Society of Washington **108**(2): 338-369.
- Carroll, DS e Bradley, RD (2005). "Systematics of the genus *Sigmodon*: DNA sequences from Beta-Fibrinogen and Cytochrome *b*." The Southwestern Naturalist **50**(3): 342-349.
- Carroll, DS, Mills, JN, Montgomery, JM, Bausch, DG, Blair, PJ, *et al.* (2005). "Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **72**(1): 42-46.
- Casado, F, Bonvicino, CR, Nagle, C, Comas, B, Manzur, TD, *et al.* (2010). "Mitochondrial divergence between 2 populations of the hooded capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates)." Journal of Heredity **101**(3): 261-269.
- Chiappero, MB, Calderón, GE e Gardenal, CN (1997). "*Oligoryzomys flavescens* (Rodentia, Muridae): gene flow among populations from central-eastern Argentina." Genetica **101**: 105-113.
- Childs, JE, Ksiazek, TG, Spiropoulou, CF, Krebs, JW, Morzunov, S, *et al.* (1994). "Serologic and Genetic Identification of *Peromyscus maniculatus* as the Primary Rodent Reservoir for a New Hantavirus in the Southwestern United States." Journal of Infectious Diseases **169**(6): 1271-1280.
- Chu, Y-K, Owen, R e Jonsson, C (2011). "Phylogenetic exploration of hantaviruses in Paraguay reveals reassortment and host switching in South America." Virology Journal **8**(1): 399.
- Chu, Y-K, Owen, RD, Gonzalez, LM e Jonsson, CB (2003). "The complex ecology of Hantavirus in Paraguay." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **69**(3): 263-268.
- Chung, WK e Steiper, ME (2008). "Mitochondrial COII Introgression into the Nuclear Genome of Gorilla gorilla." Int J Primatol **29**(5): 1341-1353.
- Creighton, GK e Strauss, RE (1986). "Comparative patterns of growth and development in cricetine rodents and the evolution of ontogeny." Evolution **40**(1): 94-106.
- D'Andrea, PS, Fernandes, FA, Cerqueira, R e Rey, L (2002). "Experimental evidence and ecological perspectives for the adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Schistosomatidae) to a wild host, the water-rat, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmodontinae)." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **97**: 11-14.
- Delfraro, A, Clara, M, Tome, L, Achaval, F, Levis, S, *et al.* (2003). "Yellow pigmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay." Emerging Infectious Diseases **9**(7): 846-852.

- Depaulis, F, Mousset, S e Veuille, M (2003). "Power of Neutrality Tests to Detect Bottlenecks and Hitchhiking." Journal of Molecular Evolution **57**(0): S190-S200.
- Drummond, A e Rambaut, A (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." BMC Evolutionary Biology **7**(1): 214.
- Drummond, AJ, Ho, SYW, Phillips, MJ e Rambaut, A (2006). "Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence." PLoS Biol **4**(5): e88.
- Dubey, S, Michaux, J, Br nner, H, Hutterer, R e Vogel, P (2009). "False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogene." Molecular Phylogenetics and Evolution **50**(3): 633-641.
- Eckert, KA e Kunkel, TA (1990). "High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Nucleic Acids Research **18**(13): 3739-3744.
- Elder, FFB e Hsu, TC (1988). Tandem fusion in the evolution of mammalian chromosomes. The Cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. Daniel, A. Liss, NY: 481-506.
- Engel, SR, Hogan, KM, Taylor, JF e Davis, SK (1998). "Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents." Molecular Biology and Evolution **15**(1): 35-49.
- Espinosa, MB e Reig, OA (1991). "Cytogenetics and karyosystematics of South America oryzomyine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). III. Banding karyotypes of Argentinean *Oligoryzomys*." Zeitschrift f r S ugetierkunde **56**: 306-317.
- Excoffier, L, Foll, M e Petit, RJ (2008). "Genetic Consequences of Range Expansions." Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **40**(1): 481-501.
- Excoffier, L e Lischer, HEL (2010). "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." Molecular Ecology Resources **10**(3): 564-567.
- Excoffier, L, Smouse, PE e Quattro, JM (1992). "Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data." Genetics **131**(2): 479-491.
- Felsenstein, J (1981). "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach." J Mol Evol **17**(6): 368-376.
- Felsenstein, J (1985). "Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap." Evolution **39**(4): 783-791.
- Forster, M. (2010). "Fluxus Technology Ltd." 2011, disponível em <http://www.fluxus-engineering.com/>.
- Francés, J e D'El a, G (2006). "*Oligoryzomys delticola* es sinônimo de *O. nigripes* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)." Mastozoologia Neotropical **13**(1): 123-131.

- Fu, YX (1997). "Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection." Genetics **147**(2): 915-925.
- Galtier, N, Nabholz, B, GléMin, S e Hurst, GDD (2009). "Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal." Molecular Ecology **18**(22): 4541-4550.
- Gardner, AL e Patton, JL (1976). "Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetine complex." Occasional Papers Museum Zoology, Louisiana State University **49**: 1-47.
- Gibson, A, Gowri-Shankar, V, Higgs, PG e Rattray, M (2005). "A Comprehensive Analysis of Mammalian Mitochondrial Genome Base Composition and Improved Phylogenetic Methods." Molecular Biology and Evolution **22**(2): 251-264.
- Gonçalves, GL, Marinho, JR e Freitas, TRO (2009). "Genetic structure of sigmodontine rodents (Cricetidae) along an altitudinal gradient of the Atlantic Rain Forest in southern Brazil." Genetics and Molecular Biology **32**: 882-885.
- González-Ittig, RE e Gardenal, CN (2008). "Co-amplification of mitochondrial pseudogenes in *Calomys musculus* (Rodentia, Cricetidae): a source of error in phylogeographic studies." Genome **51**(1): 73-78.
- González-Ittig, RE, Salazar-Bravo, J, Barquez, RM e Gardenal, CN (2010). "Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South America." Zoologica Scripta **39**(6): 511-526.
- Goodwin, GG (1953). "Catalogue of the Type Specimens of Recent Mammals in the American Museum of Natural History." Bulletin of the American Museum of Natural History **102**(3): 207-412.
- Guindon, S, Dufayard, J-F, Lefort, V, Anisimova, M, Hordijk, W, *et al.* (2010). "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." Systematic Biology **59**(3): 307-321.
- Guindon, S e Gascuel, O (2003). "A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood." Systematic Biology **52**(5): 696-704.
- Gyldenstolpe, N (1932). "A manual of Neotropical sigmodont rodents." Kunglia Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar **11**(3): 1-164.
- Haiduk, MW, Bickham, JW e Schmidly, DJ (1979). "Karyotypes of six species of *Oryzomys* from Mexico and Central America." Journal of Mammalogy **60**: 610-615.
- Hall, TA (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.

- Hanson, JD, Indorf, JL, Swier, VJ e Bradley, RD (2010). "Molecular divergence within the *Oryzomys palustris* complex: evidence for multiple species." Journal of Mammalogy **91**(2): 336-347.
- Hanson, JD, Utrera, A e Fulhorst, CF (2011). "The Delicate Pygmy Rice Rat (*Oligoryzomys delicatus*) Is the Principal Host of Maporal Virus (Family Bunyaviridae, Genus *Hantavirus*)." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **11**(6): 691-696.
- Hazkani-Covo, E, Zeller, RM e Martin, W (2010). "Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (<italic>numts</italic>) in Sequenced Nuclear Genomes." PLoS Genet **6**(2): e1000834.
- Hebert, PDN, Cywinska, A, Ball, SL e deWaard, JR (2003). "Biological identifications through DNA barcodes." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **270**(1512): 313-321.
- Hershkovitz, P (1940). "Four new oryzomyine rodents from Ecuador." Journal of Mammalogy **21**(78-84).
- Hjelle, B e Torres-Pérez, F (2010). "Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens." Viruses **2**: 2559-2586.
- Hlaing, T, Tun-Lin, W, Somboon, P, Socheat, D, Setha, T, *et al.* (2009). "Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies." BMC Genet **10**: 11.
- Huelsenbeck, JP, Ronquist, F, Nielsen, R e Bollback, JP (2001). "Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology." Science **294**(5550): 2310-2314.
- Irwin, DM, Kocher, TD e Wilson, AC (1991). "Evolution of the cytochrome b gene of mammals." Journal of Molecular Evolution **32**(2): 128-144.
- Kerr, SF, Emmons, LH, Melby, PC, Liu, C, Perez, LE, *et al.* (2006). "LEISHMANIA AMAZONENSIS INFECTIONS IN ORYZOMYS ACRITUS AND ORYZOMYS NITIDUS FROM BOLIVIA." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **75**(6): 1069-1073.
- Kimura, M (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." Journal of Molecular Evolution **16**(2): 111-120.
- Kingman, JFC (2000). "Origins of the Coalescent: 1974–1982." Genetics **156**(4): 1461-1463.
- Kuhner, MK (2006). "LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters." Bioinformatics **22**(6): 768-770.

- Langer-Safer, PR, Levine, M e Ward, DC (1982). "Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences **79**(14): 4381-4385.
- Lima, JFS, Bonvicino, CR e Kasahara, S (2003). "A new karyotype of *Oligoryzomys* (Sigmodontinae, Rodentia) from Central Brazil." Hereditas **139**: 1-6.
- Lopez, JV, Cevario, S e O'Brien, SJ (1996). "Complete Nucleotide Sequences of the Domestic Cat (*Felis catus*) Mitochondrial Genome and a Transposed mtDNA Tandem Repeat (Numt) in the Nuclear Genome." Genomics **33**(2): 229-246.
- Lopez, JV, Yuhki, N, Masuda, R, Modi, W e O'Brien, SJ (1994). "Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat." Journal of Molecular Evolution **39**(2): 174-190.
- Marshall, LG (1979). "A model for paleobiogeography of South American cricetine rodents." Paleobiology **5**(2): 126-132.
- Massoia, E (1973). "Descripción de *Oryzomys fornesi*, nueva especie y nuevos datos sobre algunas especies y subespecies argentinas del subgénero *Oryzomys* (*Oligoryzomys*) (Mammalia-Rodentia-Cricetidae)." Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA Serie I Biología y Producción Animal **10**: 21-37.
- Matocq, MD, Shurtliff, QR e Feldman, CR (2006). "Phylogenetics of the woodrat genus *Neotoma* (Rodentia: Muridae): Implications for the evolution of phenotypic variation in male external genitalia." Molecular Phylogenetics and Evolution **42**(3): 637-652.
- McCain, CM (2004). "The mid-domain effect applied to elevational gradients: species richness of small mammals in Costa Rica." Journal of Biogeography **31**(1): 19-31.
- McCarthy, C (1998). Chromas version 1.45 (32-bit). Southport, Queensland, Australia, School of Health Science, Griffith University, Australia.
- Medeiros, DBA, Rosa, EST, Marques, AAR, Simith, DB, Carneiro, AR, *et al.* (2010). "Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **105**: 665-671.
- Miller, MA, Pfeiffer, W e Schwartz, T (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. Proceedings of Gateway Computing Environment Workshop (GCE), Nova Orleans, LA, EUA.
- Mills, JN (2006). "Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers." Biodiversity **7**(1): 9-17.
- Mills, JN e Childs, JE (1998). "Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health." Emerging Infectious Diseases **4**(4): 529-537.

- Miranda, GB, Oliveira, LFB, Andrades-Miranda, J, Langguth, A, Callegari-Jacques, SM, *et al.* (2009). "Phylogenetic and phylogeographic patterns in sigmodontine rodents of the genus *Oligoryzomys*." Journal of Heredity **100**(3): 309-321.
- Mirol, PM, Mascheretti, S e Searle, JB (2000). "Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in *Ctenomys* (Caviomorpha, rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence." Heredity (Edinb) **84** (Pt 5): 538-547.
- Moojen, J (1952). Os Roedores do Brasil. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Livro, Biblioteca Científica Brasileira.
- Musser, GG e Carleton, MD (2005). Superfamily Muroidea. Mammal Species of the World - A Taxonomic and Geographic Reference. Wilson, DE e Reeder, DM. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. **2**: 894-1531.
- Myers, P e Carleton, MD (1981). "The species of *Oryzomys* (*Oligoryzomys*) in Paraguay and the identity of Azara's "Rat sixième ou Rat à Tarse Noir." Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology University of Michigan **161**: 1-41.
- Myers, P, Lundrigan, B e Tucker, PK (1995). "Molecular Phylogenetics of Oryzomyine Rodents: The Genus *Oligoryzomys*." Molecular Phylogenetics and Evolution **4**(4): 372-382.
- Nergadze, SG, Lupotto, M, Pellanda, P, Santagostino, M, Vitelli, V, *et al.* (2010). "Mitochondrial DNA insertions in the nuclear horse genome." Animal Genetics **41**: 176-185.
- Nichol, ST, Spiropoulou, CF, Morzunov, S, Rollin, PE, Ksiazek, TG, *et al.* (1993). "Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness." Science **262**(5135): 914-917.
- Oliveira, RC, Teixeira, BR, Mello, FCA, Pereira, AP, Duarte, AS, *et al.* (2009). "Genetic characterization of a Juitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil." Acta Tropica **112**(2): 212-218.
- Padula, P, Valle, MGD, Alai, MG, Cortada, P, Villagra, M, *et al.* (2002). "Andes Virus and First Case Report of Bermejo Virus Causing Fatal Pulmonary Syndrome." Emerging Infectious Diseases **8**(4): 437-439.
- Padula, PJ, Colavecchia, SB, Martínez, VP, Gonzalez Della Valle, MO, Edelstein, A, *et al.* (2000). "Genetic Diversity, Distribution, and Serological Features of Hantavirus Infection in Five Countries in South America." Journal of Clinical Microbiology **38**(8): 3029-3035.
- Palma, RE, Cancino, RA e Rodríguez-Serrano, E (2010a). "Molecular systematics of *Abrothrix longipilis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Chile." Journal of Mammalogy **91**(5): 1102-1111.

- Palma, RE, Rivera-Milla, E, Salazar-Bravo, J, Torres-Pérez, F, Pardiñas, UFJ, *et al.* (2005). "Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America." Journal of Mammalogy **86**(1): 191-200.
- Palma, RE, Rodríguez-Serrano, E, Rivera-Milla, E, Hernandez, CE, Salazar-Bravo, J, *et al.* (2010b). "Phylogenetic relationships of the pygmy rice rats of the genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae)." Zoological Journal of the Linnean Society **160**(3): 551-566.
- Pardiñas, UFJ (2008). "A New Genus of Oryzomyine Rodent (Cricetidae: Sigmodontinae) from the Pleistocene of Argentina." Journal of Mammalogy **89**(5): 1270-1278.
- Pardiñas, UFJ, D'Elía, G e Ortiz, PE (2002). "Sigmodontinos Fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: Estado Actual de su Conocimiento y Prospectiva." Mastozoología Neotropical **9**(2): 209-252.
- Paresque, R, Silva, MJJ, Yonenaga-Yassuda, Y e Fagundes, V (2007). "Karyological geographic variation of *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1818 (Rodentia, Cricetidae) from Brazil." Genetics and Molecular Biology **30**: 43-53.
- Patton, JL, da Silva, MNF e Malcolm, JR (1996). "Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents." Molecular Ecology **5**: 229-238.
- Patton, JL e Silva, MNF (1995). "A review of the spiny mouse genus *Scolomys* (Rodentia: Muridae: Sigmodontinae) with the description of a new species from the western Amazon of Brazil." Proceedings of the Biological Society of Washington **108**(2): 319-337.
- Patton, JL, Silva, MNF e Malcolm, JR (2000). "Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and Ecological Diversification of Amazonia." Bulletin of the American Museum of Natural History **244**: 1-306.
- Percequillo, AR, Weksler, M e Costa, LP (2011). "A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography." Zoological Journal of the Linnean Society **161**(2): 357-390.
- Perini, MV, A. Weimer, T, Callegari-Jacques, SM e Mattevi, MS (2004). "Biochemical Polymorphisms and Genetic Relationships in Rodents of the Genera *Oryzomys* and *Oligoryzomys* (Sigmodontinae) From Brazil." Biochemical Genetics **42**(9): 317-329.
- Pfeiffer, W e Stamatakis, A (2010). Hybrid MPI/Pthreads parallelization of the RAxML phylogenetics code, Atlanta, GA.
- Philippe, H e Forterre, P (1999). "The Rooting of the Universal Tree of Life Is Not Reliable." Journal of Molecular Evolution **49**(4): 509-523.

- Pincelli, MP, Barbas, CSV, Carvalho, CRR, Souza, LTM e Figueiredo, LTM (2003). "Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus." Jornal de Pneumologia **29**: 309-323.
- Pinto, CM, Ocaña-Mayorga, S, Lascano, MS e Grijalva, MJ (2006). "INFECTION BY TRYPANOSOMES IN MARSUPIALS AND RODENTS ASSOCIATED WITH HUMAN DWELLINGS IN ECUADOR." Journal of Parasitology **92**(6): 1251-1255.
- Posada, D (2008). "jModelTest: phylogenetic model averaging." Molecular Biology and Evolution **25**(7): 1253-1256.
- Prychitko, TM e Moore, WS (2000). "Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene and nuclear beta-fibrinogen intron 7 in woodpeckers." Molecular Biology and Evolution **17**(7): 1101-1111.
- Rambaut, A. (2009). "FigTree Version 1.3.1." 2010, disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Rambaut, A e Drummond, A. (2007). "Tracer v1.4." 2010, disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ray, N, Currat, M e Excoffier, L (2003). "Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations." Molecular Biology and Evolution **20**(1): 76-86.
- Reig, OA (1984). "Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muróideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae)." Revista Brasileira de Genética **7**(2): 333-365.
- Reig, OA (1986). Diversity patterns and differentiation of high andean rodents. High altitude tropical biogeography, Oxford University Press: 404-439.
- Reis, SFd (1988). "Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva." Revista Brasileira de Zoologia **5**: 571-580.
- Richter, MH, Hanson, JD, Cajimat, MN, Milazzo, ML e Fulhorst, CF (2010). "Geographical range of Rio Mamore virus (family Bunyaviridae, genus Hantavirus) in association with the small-eared pygmy rice rat (*Oligoryzomys microtis*)." Vector Borne and Zoonotic Diseases **10**(6): 613-620.
- Rigby, PWJ, Dieckmann, M, Rhodes, C e Berg, P (1977). "Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I." Journal of Molecular Biology **113**(1): 237-251.
- Rivera, PC, González-Ittig, RE, Fraire, HJR, Levis, S e Gardenal, CN (2007). "Molecular identification and phylogenetic relationships among the species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) present in Argentina, putative reservoirs of hantaviruses." Zoologica Scripta **36**(3): 231-239.
- Robinson, TJ e Elder, FFB (1993). "Cytogenetics: its role in wildlife management and the genetic conservation in mammals." Biological Conservation **63**(1): 47-51.

- Rocha, RG, Ferreira, E, Costa, BMA, Martins, ICM, Leite, YLR, *et al.* (2011). "Small mammals of the mid-Araguaia River in central Brazil, with the description of a new species of climbing rat." Zootaxa **2789**: 1-34.
- Rodríguez, F, Oliver, JL, Marín, A e Medina, JR (1990). "The general stochastic model of nucleotide substitution." Journal of Theoretical Biology **142**(4): 485-501.
- Rogers, AR e Harpending, H (1992). "Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences." Molecular Biology and Evolution **9**(3): 552-569.
- Rogers, DS, Arenas, EA, González-Cózatl, FX, Hardy, DK, Hanson, JD, *et al.* (2009). Molecular phylogenetics of *Oligoryzomys fulvescens* based on cytochrome b gene sequences, with comments on the evolution of the genus *Oligoryzomys*. 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al Conocimiento y Conservación de los Mamíferos Mexicanos. Cervantes, FA, Universidad Autonoma de México.
- Romano-Lieber, NS, Yee, J e Hjelle, B (2001). "Serologic survey for hantavirus infections among wild animals in rural areas of São Paulo State, Brazil." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **43**: 325-327.
- Ronquist, F e Huelsenbeck, JP (2003). "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." Bioinformatics **19**(12): 1572-1574.
- Rosa, EST, Medeiros, DBA, Nunes, MRT, Simith, DB, Pereira, AS, *et al.* (2011). "Pygmy Rice Rat as Potential Host of Castelo dos Sonhos Hantavirus." Emerging Infectious Diseases **17**(8): 1527-1530.
- Rosa, ESTd, Lemos, ERS, Medeiros, DBA, Simith, DB, Pereira, AS, *et al.* (2010). "Hantaviruses and Hantavirus Pulmonary Syndrome, Maranhão, Brazil." Emerging Infectious Diseases **16**(12): 1952-1955.
- Sambrook, J e Russell, DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sbalqueiro, IJ, Mattevi, MS, Oliveira, LF e Solano, MJV (1991). "B chromosome system in populations of *Oryzomys flavescens* (Rodentia, Cricetidae) from southern Brazil." Acta Theriologica **36**: 193-199.
- Schneider, S e Excoffier, L (1999). "Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA." Genetics **152**(3): 1079-1089.
- Silva, LAFd, Moreira, MAM, Bezerra, JP, Tovar, FJ, Almeida, CAS, *et al.* (1995). "Analysis of rDNA variation in the genus *Didelphis* (Marsupialia)." Revista Brasileira de Genética **18**(1): 37-42.

- Silva, MV, Vasconcelos, MJ, Hidalgo, NTR, Veiga, APR, Canzian, M, *et al.* (1997). "Hantavirus Pulmonary Syndrome: Report of the first three cases in São Paulo, Brazil." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **39**: 231-234.
- Smith, MF e Patton, JL (1991). "Variation in mitochondrial Cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae)." Molecular Biology and Evolution **8**(1): 85-103.
- Smith, MF e Patton, JL (1993). "The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe." Biological Journal of the Linnean Society **50**(3): 149-177.
- Smith, MF e Patton, JL (1999). "Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome *b*." Journal of Mammalian Evolution **6**(2): 89-128.
- Smith, MF, Thomas, WK e Patton, JL (1992). "Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent." Molecular Biology and Evolution **9**(2): 204-215.
- Sokal, RR e Rohlf, FJ (1994). Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. New York, W. H. Freeman.
- StatSoft, I (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com. Tulsa, OK, USA.
- Steppan, SJ, Adkins, RM e Anderson, J (2004). "Phylogeny and Divergence-Date Estimates of Rapid Radiations in Muroid Rodents Based on Multiple Nuclear Genes." Systematic Biology **53**(4): 533-553.
- Strauss, RE (2010). Discriminant groups of organisms. Morphometrics for Nonmorphometricians (Lecture Notes in Earth Sciences vol. 124). Elewa, AMT. Berlin, Springer-Verlag: 73-91.
- Suzuki, A, Bisordi, I, Levis, S, Garcia, J, Pereira, LE, *et al.* (2004). "Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil." Emerging Infectious Diseases **10**(12): 2127-2134.
- Tamura, K e Kumar, S (2002). "Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages." Molecular Biology and Evolution **19**(10): 1727-1736.
- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, *et al.* (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." Molecular Biology and Evolution **28**(10): 2731-2739.
- Thalmann, O, Serre, D, Hofreiter, M, Lukas, D, Eriksson, J, *et al.* (2005). "Nuclear insertions help and hinder inference of the evolutionary history of gorilla mtDNA." Molecular Ecology **14**(1): 179-188.

- Tindall, KR e Kunkel, TA (1988). "Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Biochemistry **27**(16): 6008-6013.
- Tobe, SS, Kitchener, AC e Linacre, AMT (2010). "Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes." PLoS ONE **5**(11): e14156.
- Triant, DA e DeWoody, JA (2007). "THE OCCURRENCE , DETECTION , AND AVOIDANCE OF MITOCHONDRIAL DNA TRANSLOCATIONS IN MAMMALIAN SYSTEMATICS AND PHYLOGEOGRAPHY." Journal of Mammalogy **88**(4): 908-920.
- Tschudi, JJv e Cabanis, JL (1844). Untersuchungen über die Fauna Peruana. St. Gallen, Scheitlin und Zollikofer.
- Vincent, MJ, Quiroz, E, Gracia, F, Sanchez, AJ, Ksiazek, TG, *et al.* (2000). "Hantavirus Pulmonary Syndrome in Panama: Identification of Novel Hantaviruses and Their Likely Reservoirs." Virology **277**(1): 14-19.
- Vogolino, D e Pardiñas, UFJ (2005). "Roedores sigmodontinos (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) y otros micromamíferos pleistocénicos del norte de la provincia de Buenos Aires (Argentina): reconstrucción paleoambiental para el Ensenadense cuspidal." Ameghiniana **42**: 143-158.
- Voss, RS, Lunde, DP e Simmons, NB (2001). "The Mammals of Paracou, French Guiana: A Neotropical Lowland Rainforest Fauna Part 2. Nonvolant Species." Bulletin of the American Museum of Natural History **263**: 1-236.
- Weksler, M (2006). "Phylogenetic relationships of oryzomine rodents (Muroidea, Sigmodontinae) : separate and combined analyses of morphological and molecular data." Bulletin of the American Museum of Natural History **296**: 1-149.
- Weksler, M e Bonvicino, CR (2005). "Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with the description of two new species." Arquivos do Museu Nacional **63**(1): 113-130.
- Weksler, M, Lanier, HC e Olson, LE (2010). "Eastern Beringian biogeography: historical and spatial genetic structure of singing voles in Alaska." Journal of Biogeography **37**(8): 1414-1431.
- Weksler, M, Percequillo, AR e Voss, RS (2006). "Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae)." American Museum Novitates 29-29.
- Wickliffe, JK, Hoffmann, FG, Carroll, DS, Dunina-Borkavskaya, YV, Bradley, RD, *et al.* (2003). "Intron 7 (Fgb-I7) of the Fibrinogen, Beta Polypeptide (Fgb): A Nuclear DNA Phylogenetic Marker for Mammals." Occasional Papers of Museum of Texas Tech University **219**: 1-6.

- Wilson, DE e Reeder, DM (2005). Mammal Species of the World – A Taxonomic and Geographic Reference. Baltimore, USA, The Johns Hopkins University Press.
- Wright, S (1922). "Coefficients of Inbreeding and Relationship." The American Naturalist **56**(645): 330-338.
- Wright, S (1965). "The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating." Evolution **19**(3): 395-420.
- Xia, X e Xie, Z (2001). "DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution." Journal of Heredity **92**(4): 371-373.
- Yang, Z (1994). "Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods." J Mol Evol **39**(3): 306-314.
- Yonenaga, Y, Frota-Pessoa, O, Kasahara, S e Almeida, EJC (1976). "Cytogenetic studies on Brazilian rodents." Ciência e Cultura (São Paulo) **28**: 202-211.

Anexos

ANEXO I

PROTOCOLO DE FISH

- 1) Mergulhar as lâminas em solução de 2x SSC (pH 7,0), temperatura ambiente, por 2 min.
- 2) Desidratar em série crescente de álcoois 70%, 85% e 100% (1 min. cada), temperatura ambiente.
- 3) Secar as lâminas à temperatura ambiente.
- 4) Fazer o mix da sonda de acordo com o protocolo de *Nick translation*.
- 5) Co-desnaturação: Aplicar a sonda na área da lâmina a ser analisada, cobrir com a lamínula (22x22mm), selar com cola e desnaturar por 75°C, 5 min.
- 6) Hibridização: Deixar a lâmina 16-18 horas a 37°C em câmara úmida ou *hybrite*.
- 7) Lavagem pós-hibridização:
 - a) Remover a lamínula com cuidado para não arranhar o material.
 - b) Lavar a lâmina em solução de 2x SSC / 0,1% Igepal por 2 min. em temperatura ambiente.
 - c) Lavar a lâmina em solução de 0,4x SSC/ 0,3% Igepal por 2 min, (pH 7,0-7,5), 72°C (+- 1°C) sem agitação.
 - d) Lavar a lâmina em solução de 2x SSC / 0,1% Igepal (pH 7,0+-0,2) por 1 min. em temperatura ambiente, sem agitação.
 - e) Desidratar o tecido de forma progressiva com álcoois 70%, 85% e 100% (-20°C) por 1 min. cada. Depois secar em temperatura ambiente.
 - f) Colocar 10-13 µl de DAPI na lamínula e pressionar a lâmina contra a lamínula para corar o material. Selar com cola. Deixar a lâmina em posição horizontal para não escorrer o DAPI

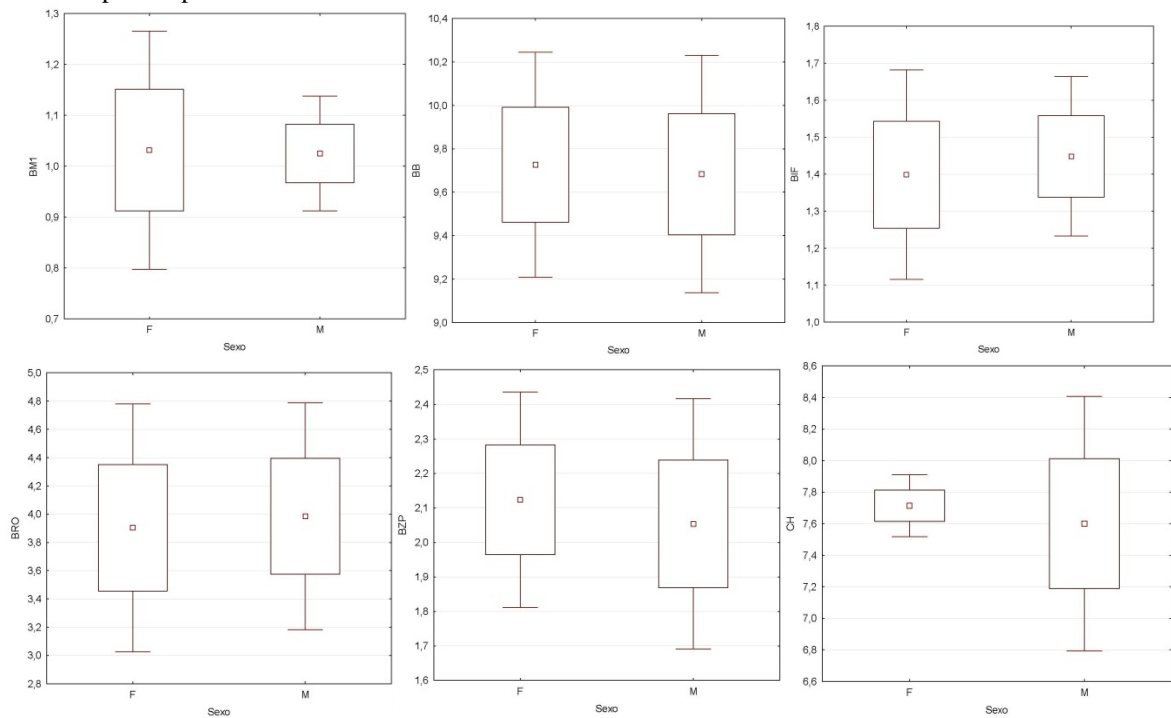
ANEXO II

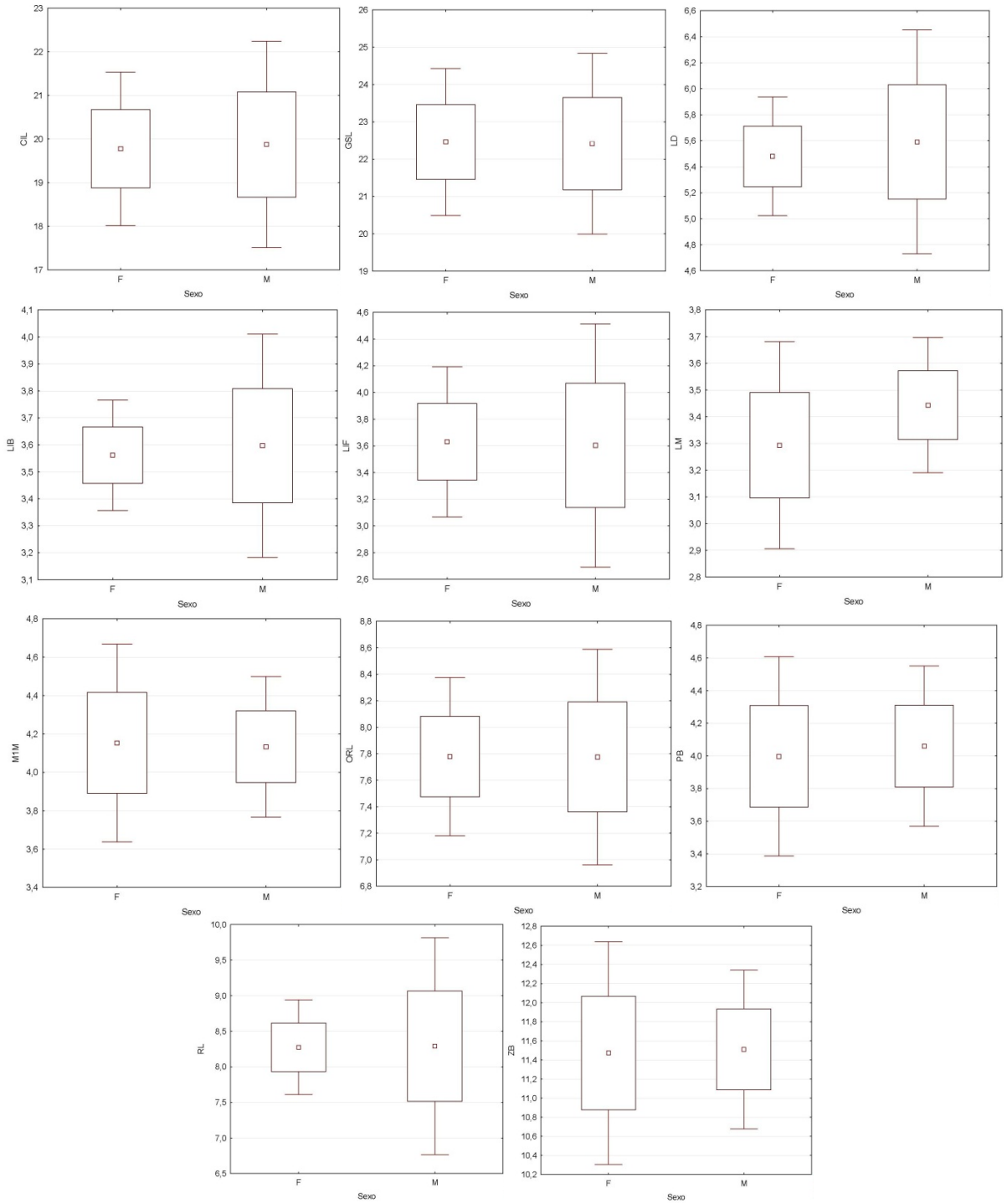
Teste t para detectar dimorfismo sexual em *O. fornesi*

Tabela: Valores de t, graus de liberdade (gl) e p para as 17 medidas cranianas.

	t	gl	p
GSL	0,067	10	0,948
CIL	-0,160	10	0,876
M1M	0,152	10	0,882
LD	-0,551	10	0,594
PB	-0,388	10	0,706
LIF	0,120	10	0,907
BIF	-0,669	10	0,518
RL	-0,048	10	0,963
BRO	-0,330	10	0,748
CH	0,656	10	0,527
BB	0,276	10	0,788
LM	-1,554	10	0,151
BM1	0,123	10	0,904
LIB	-0,364	10	0,723
ORL	0,016	10	0,988
ZB	-0,123	10	0,905
BZP	0,703	10	0,498

Figuras: Gráficos de Box & Whisker mostrando a média (quadrado pequeno), média + desvio padrão e média + 1,96*desvio padrão para cada uma das 17 variáveis.





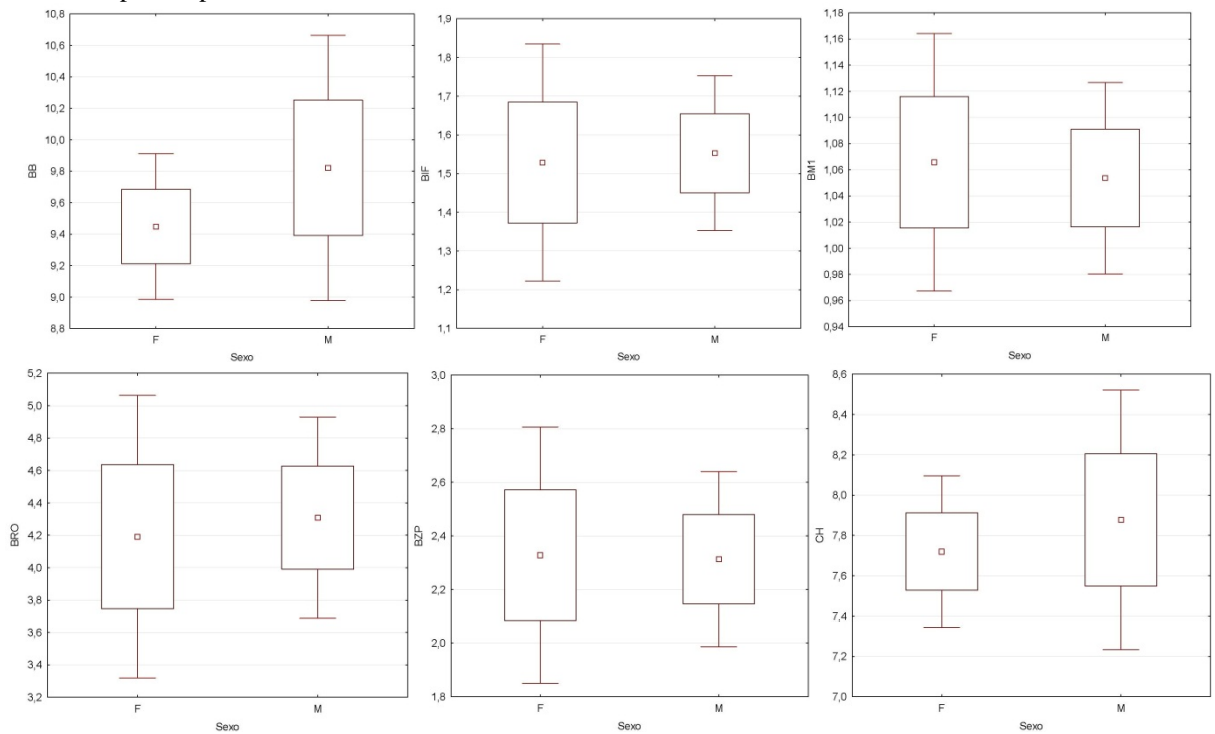
ANEXO III

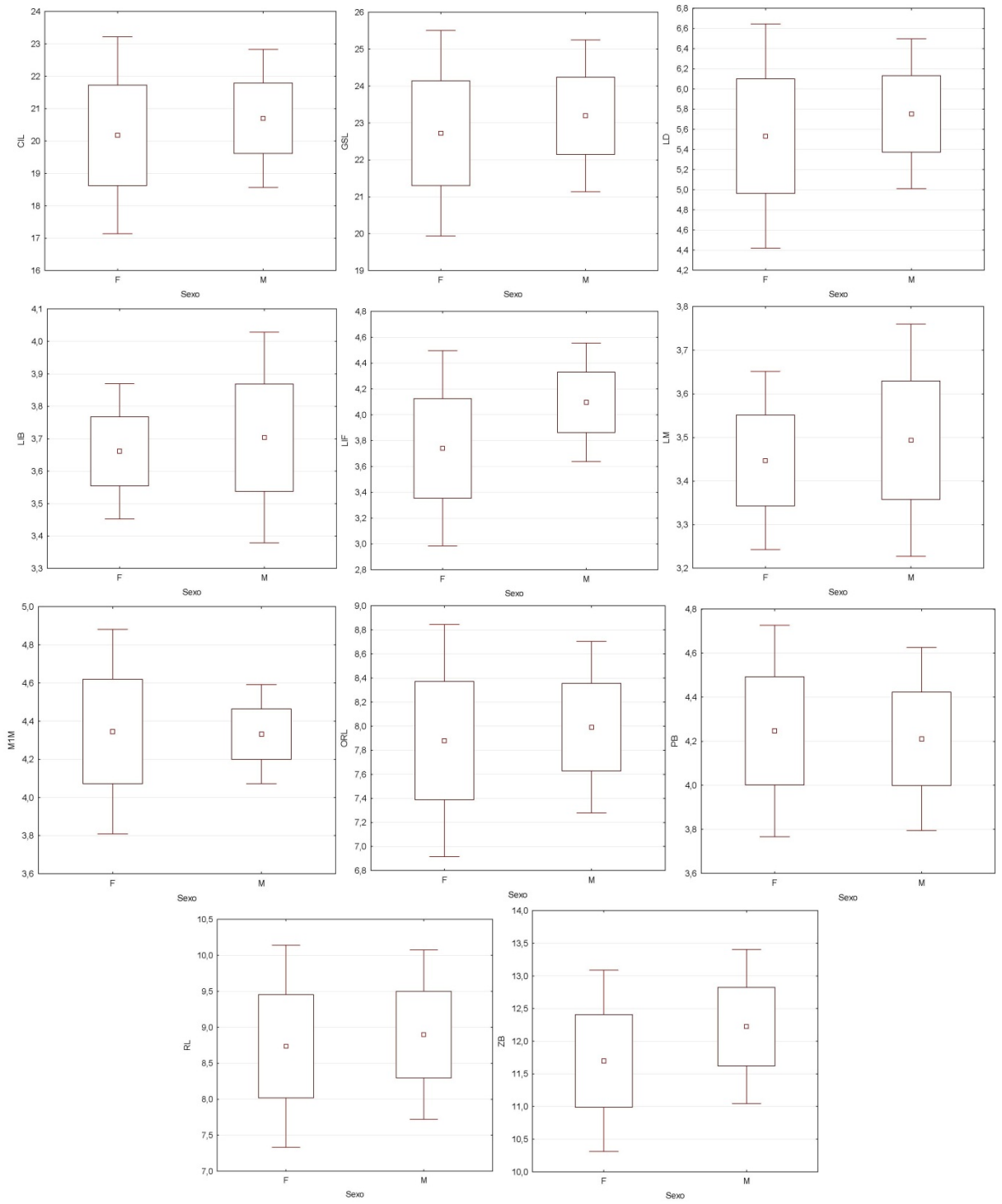
Teste t para detectar dimorfismo sexual em *O. moojeni*

Tabela: Valores de t, graus de liberdade (gl) e p para as 17 medidas cranianas.

	t	gl	p
GSL	-0,862	19	0,3993
CIL	-0,903	19	0,3776
M1M	0,155	19	0,8784
LD	-1,068	19	0,2990
PB	0,353	19	0,7281
LIF	-2,656	19	0,0662
BIF	-0,431	19	0,6717
RL	-0,545	19	0,5919
BRO	-0,698	19	0,4934
CH	-1,167	19	0,2577
BB	-2,121	19	0,0673
LM	-0,791	19	0,4386
BM1	0,627	19	0,5383
LIB	-0,609	19	0,5499
ORL	-0,589	19	0,5628
ZB	-1,779	19	0,0913
BZP	0,166	19	0,870

Figuras: Gráficos de Box & Whisker mostrando a média (quadrado pequeno), média + desvio padrão e média + 1,96*desvio padrão para cada uma das 17 variáveis.





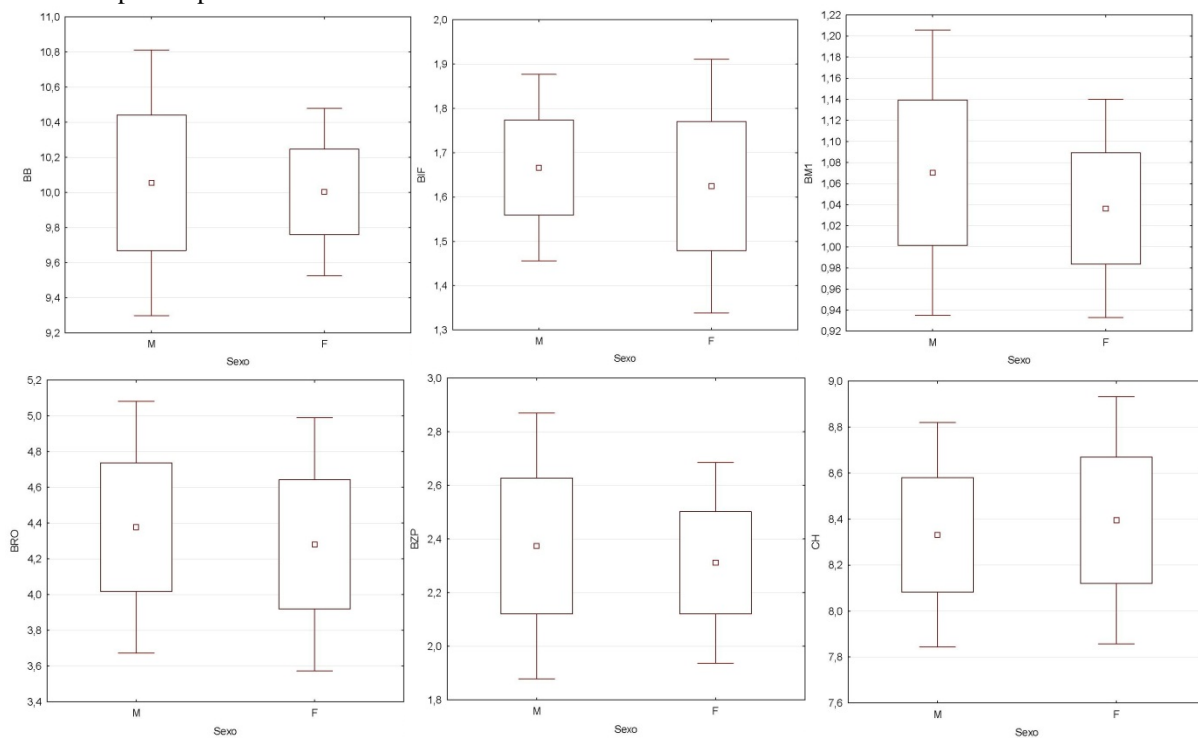
ANEXO IV

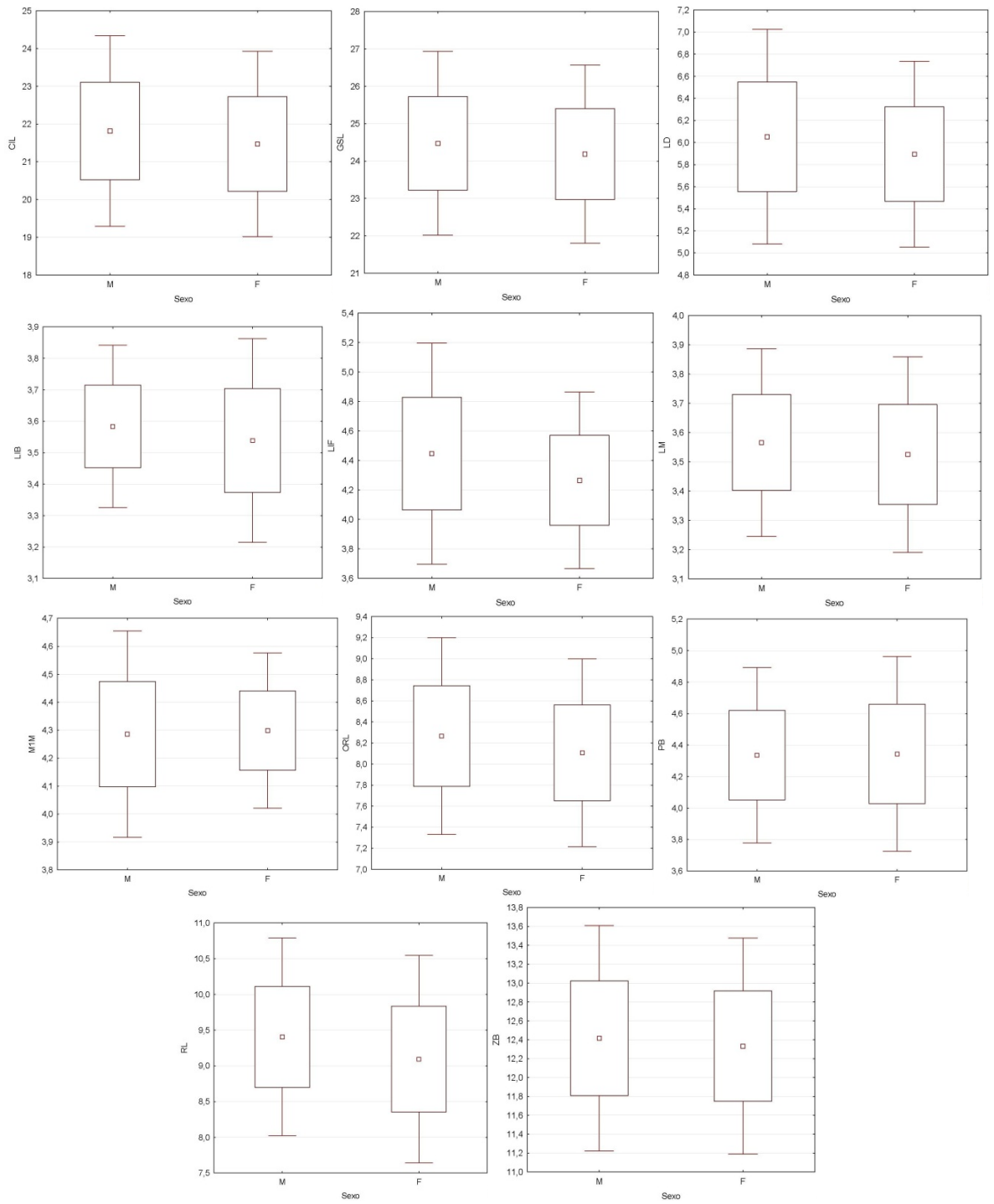
Teste t para detectar dimorfismo sexual em *O. nigripes*

Tabela: Valores de t, graus de liberdade (gl) e p para as 17 medidas cranianas.

	t	gl	p
GSL	0,779	44	0,440
CIL	0,898	44	0,374
M1M	-0,252	44	0,802
LD	1,120	44	0,269
PB	-0,091	44	0,928
LIF	1,718	44	0,093
BIF	1,114	44	0,271
RL	1,441	44	0,157
BRO	0,895	44	0,376
CH	-0,813	44	0,421
BB	0,518	44	0,607
LM	0,815	44	0,419
BM1	1,808	44	0,077
LIB	1,033	44	0,307
ORL	1,132	44	0,264
ZB	0,466	44	0,643
BZP	0,916	44	0,365

Figuras: Gráficos de Box & Whisker mostrando a média (quadrado pequeno), média + desvio padrão e média + 1,96*desvio padrão para cada uma das 17 variáveis.





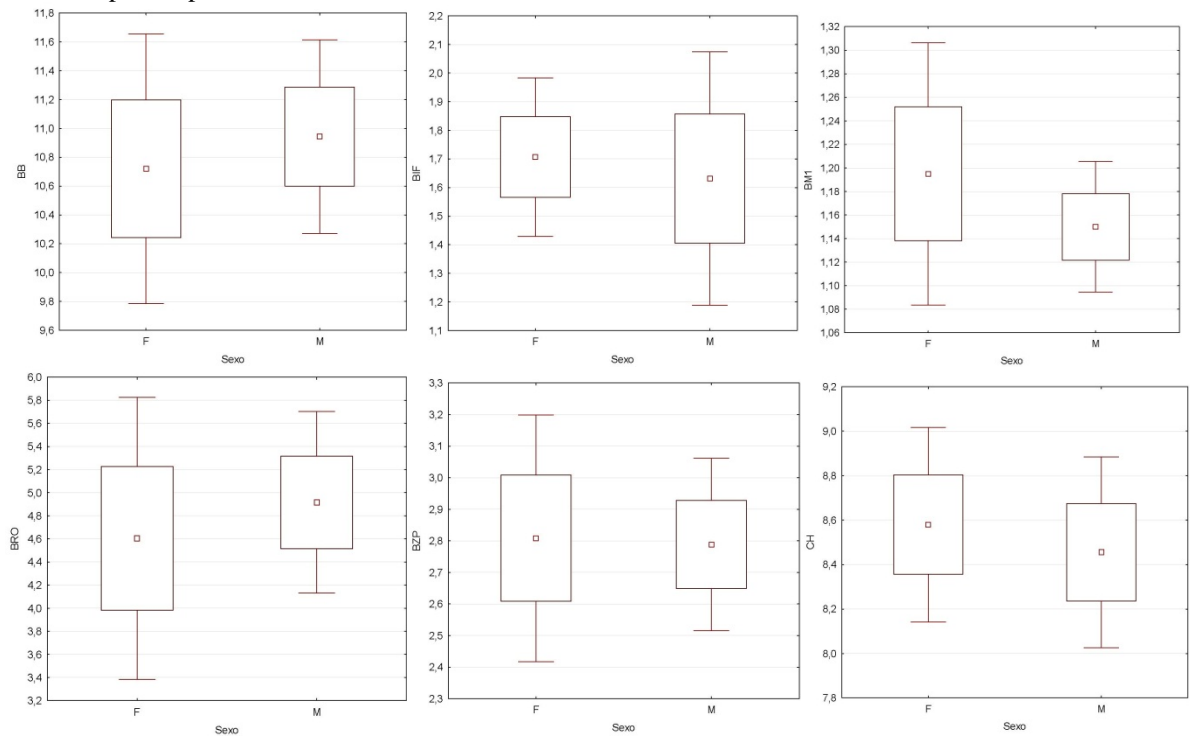
ANEXO V

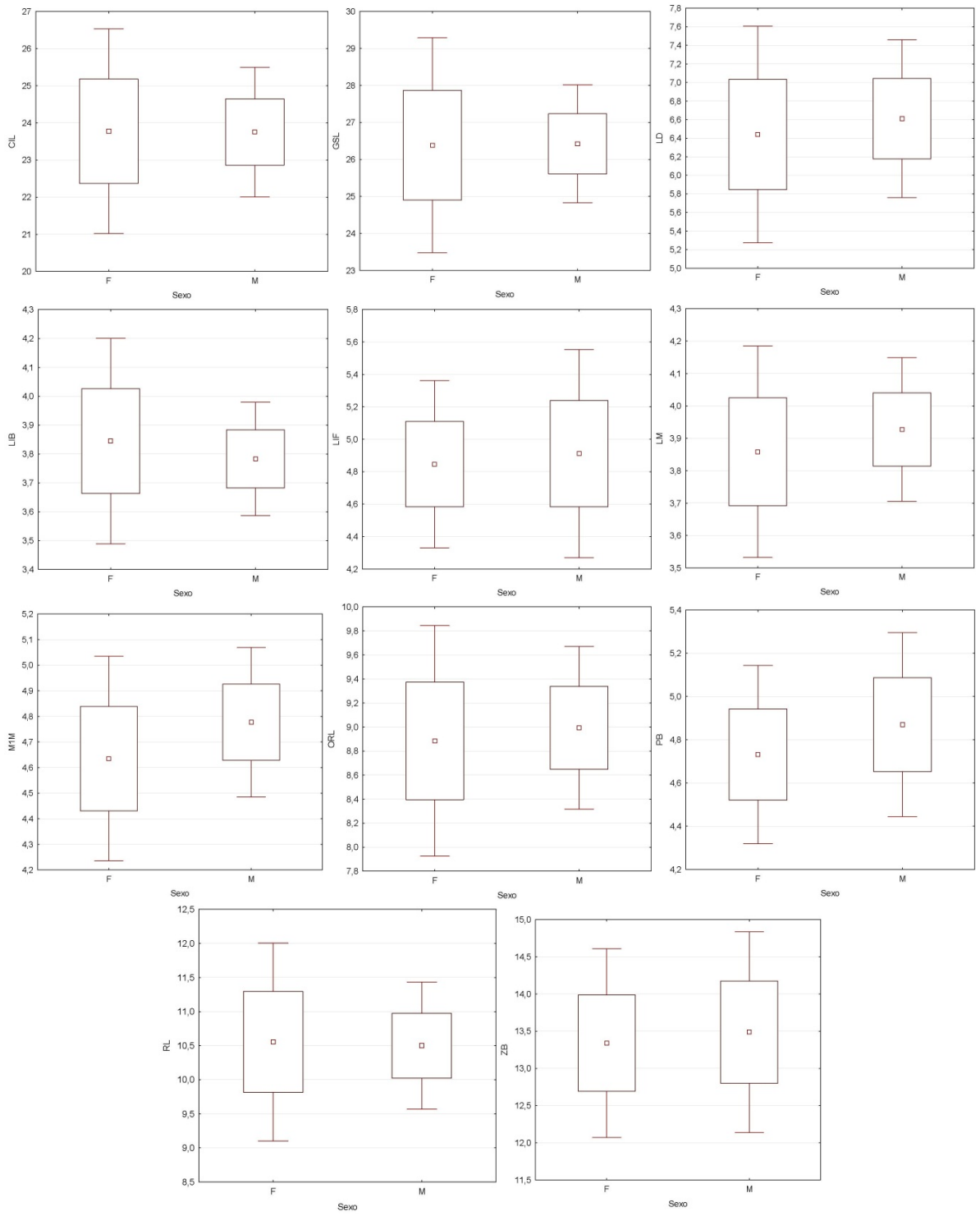
Teste t para detectar dimorfismo sexual em *O. stramineus*

Tabela: Valores de t, graus de liberdade (gl) e p para as 17 medidas cranianas

	t	gl	p
GSL	-0,061	11	0,953
CIL	0,032	11	0,975
M1M	-1,452	11	0,174
LD	-0,595	11	0,564
PB	-1,160	11	0,270
LIF	-0,388	11	0,705
BIF	0,704	11	0,496
RL	0,157	11	0,878
BRO	-1,092	11	0,298
CH	1,011	11	0,334
BB	-0,978	11	0,349
LM	-0,884	11	0,396
BM1	1,853	11	0,091
LIB	0,781	11	0,451
ORL	-0,471	11	0,647
ZB	-0,390	11	0,704
BZP	0,210	11	0,838

Figuras: Gráficos de Box & Whisker mostrando a média (quadrado pequeno), média + desvio padrão e média + 1,96*desvio padrão para cada uma das 17 variáveis.





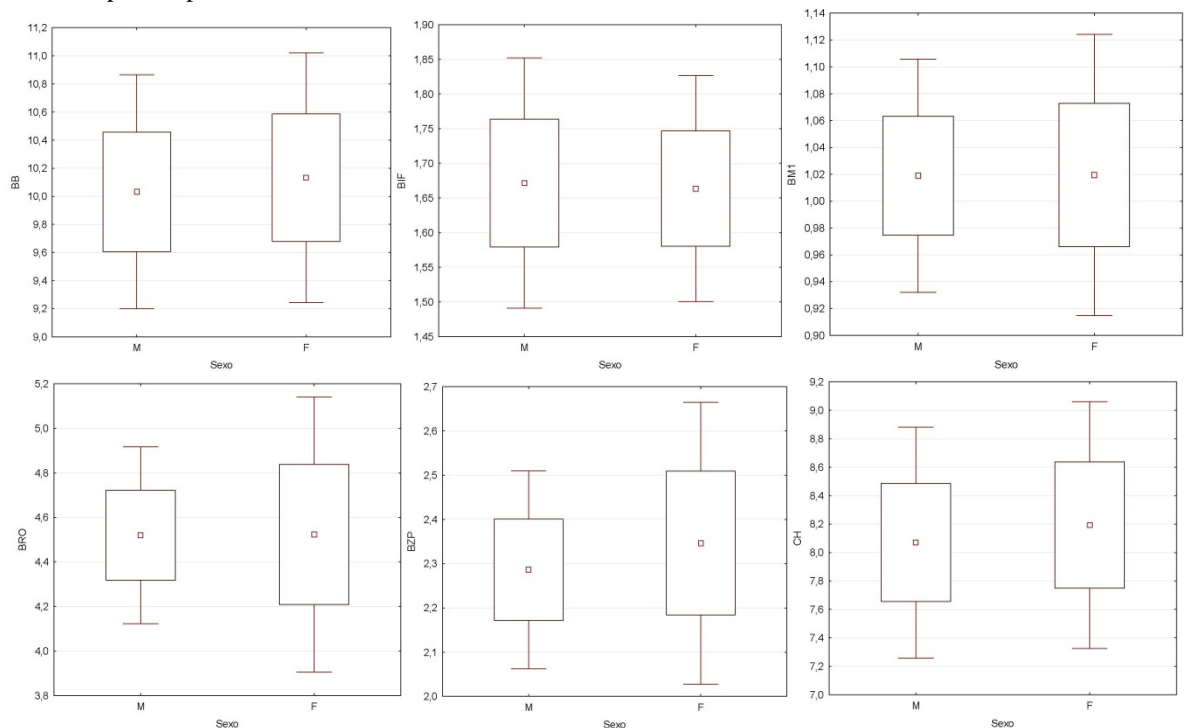
ANEXO VI

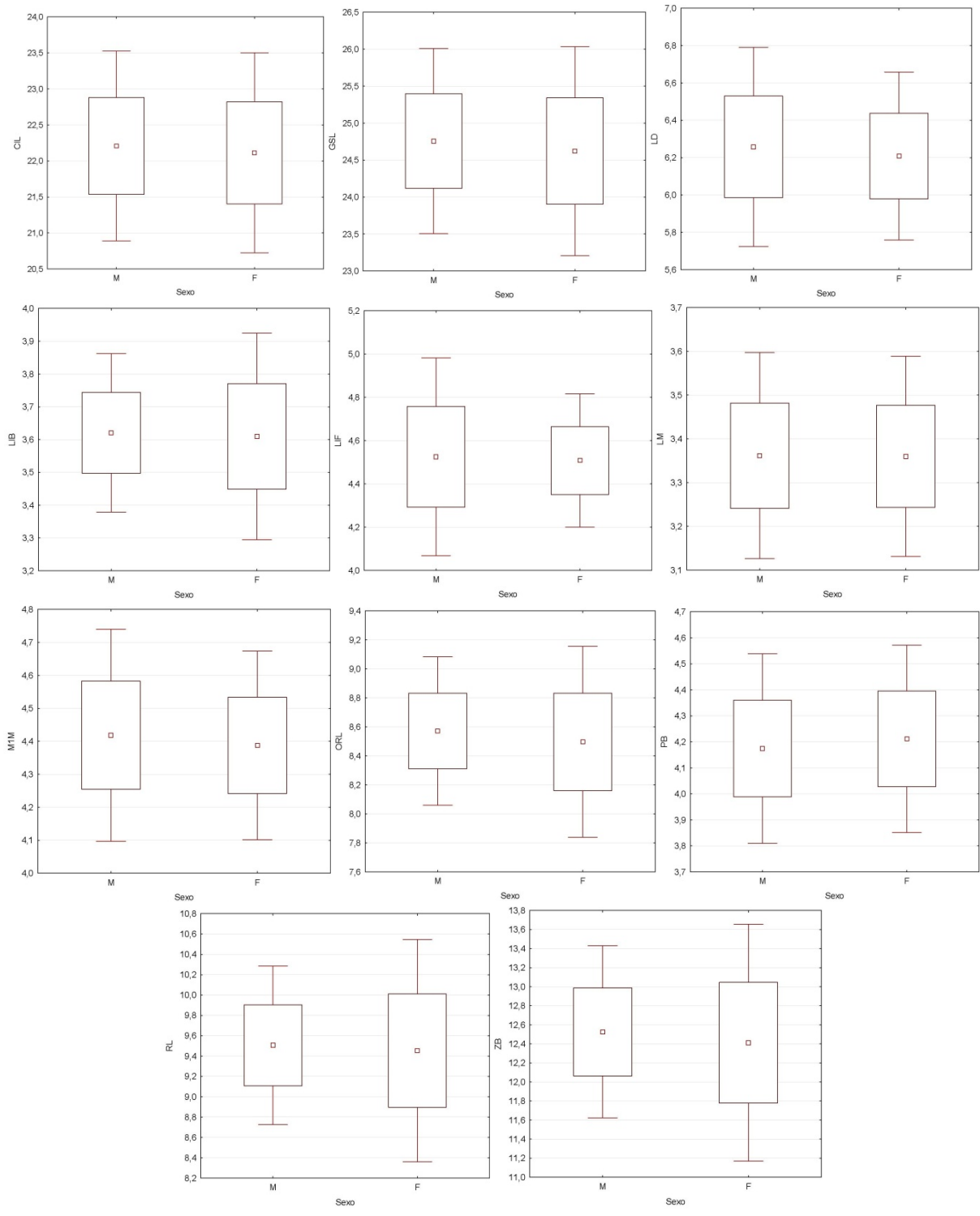
Teste t para detectar dimorfismo sexual em *O. utiaritensis*

Tabela: Valores de t, graus de liberdade (gl) e p para as 17 medidas cranianas

	t	gl	p
GSL	0,620	37	0,539
CIL	0,431	37	0,669
M1M	0,622	37	0,537
LD	0,607	37	0,548
PB	-0,630	37	0,533
LIF	0,273	37	0,787
BIF	0,288	37	0,775
RL	0,335	37	0,739
BRO	-0,041	37	0,968
CH	-0,891	37	0,379
BB	-0,716	37	0,479
LM	0,042	37	0,967
BM1	-0,035	37	0,972
LIB	0,239	37	0,812
ORL	0,776	37	0,442
ZB	0,638	37	0,527
BZP	-1,331	37	0,191

Figuras: Gráficos de Box & Whisker mostrando a média (quadrado pequeno), média + desvio padrão e média + 1,96*desvio padrão para cada uma das 17 variáveis.





ANEXO VII

Agrellos, R.; Bonvicino, C. R.; Rosa, E. S. T.; Marques, A. A. R.; D'Andrea, P. S.; Weksler, M. (2012). “The taxonomic status of the Castelo dos Sonhos Hantavirus reservoir, *Oligoryzomys utiaritensis* Allen 1916 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae)”. *Zootaxa*, **3220**:1-28.