

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

História da ocupação da Planície Costeira do RS  
pelo roedor *Deltamys kempi* - tentativa de  
reconstrução pela análise do mtDNA

MARTÍN ALEJANDRO MONTES

ORIENTADORA: PROFA. Dra. MARGARETE SUÑÉ MATTEVI  
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. SANDRO LUIS BONATTO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA  
AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR PARA  
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

PORTO ALEGRE  
JULHO DE 2003

# **1. Introdução**

# I. INTRODUÇÃO

## I.1. Ordem Rodentia Bowdich, 1821

A ordem Rodentia, com suas dois mil espécies e 450 gêneros, representa 43,5% das cinco mil espécies dos 1.200 gêneros atuais descritos nas 12 ordens de mamíferos. Estas cifras demonstram a importância desta ordem dentro da classe, já que 39% dos gêneros de Mammalia pertencem aos roedores (Wilson & Reeder, 1993).

O nome da ordem vem do latim *rodere* que significa roer. Os roedores, portanto, caracterizam-se por ter um mecanismo especial de mastigação baseado na ação de roer, o que conseguem graças a dois pares de poderosos incisivos e a um sistema muscular mandibular altamente especializado (McDonald, 1999).

Os roedores apresentam uma extraordinária variedade de adaptações o que lhes permite habitar em quase todas as regiões do mundo, exceto na Antártida, Nova Zelândia e algumas ilhas oceânicas. São encontrados tanto em climas frios como quentes, no nível do mar ou em altitudes elevadas, em regiões de selvas, savanas, desertos, etc. Para viver em tão variadas condições os roedores mostram adaptações à vida terrestre, arborícola, fossória, saltatória ou semi-aquática (Myers, 1999).

Os hábitos alimentares neste grupo são predominantemente herbívoros (sementes, grãos, frutos, raízes, partes verdes das plantas), mas algumas espécies são insetívoras, piscívoras ou carnívoras. Esta ampla gama de hábitos alimentares (são, preferentemente, generalistas com escassas especializações ecológicas) e a alta capacidade reprodutiva são considerados como os principais fatores de êxito nas radiações adaptativas realizadas pela ordem (McDonald, 1999).

As populações de roedores comumente mostram grandes variações demográficas, produto de sua alta taxa de reprodução, elevada taxa de mortalidade e curto ciclo vital. Os roedores apresentam estratégias de reprodução variável. As espécies de grande tamanho, em geral, se reproduzem uma vez ao ano e as espécies de pequeno tamanho o fazem em várias oportunidades ao ano (Hickman, 1998).

O tamanho dos roedores é variável, oscilando entre os 5 centímetros e 7 gramas em *Micromys minutus* e entre 1,3 metros de comprimento e 70 kilogramas de peso em *Hydrochoerus hydrochoeris*, a capivara (McDonald, 1999).

A ordem possui entre 12 e 22 dentes, exceto no gênero *Heliophobius*, que tem 28 dentes. São quatro incisivos com forma de cinzel, dois superiores e dois inferiores, que apresentam raízes abertas. O crescimento contínuo das raízes e a superfície externa do incisivo mais dura que a interna (fazendo com que tenha muito gumes), explicam porque os roedores necessitam roer e, assim, desgastar seus incisivos (McDonald, 1999).

Eles não apresentam caninos, em seu lugar têm um espaço denominado diastema. Para triturar os alimentos usam seus pré-molares e molares, tendo como máximo dois pré-molares acima e um abaixo e três molares acima e abaixo. Os dentes molares são formados por capas de esmalte que originam pregas que, vistas de cima, apresentam um padrão peculiar. Estes padrões, decorrentes da combinação de um esmalte dental macio e de um esmalte duro, são constantes em cada grupo e, portanto, objeto de valor zoológico para a classificação (Hickman, 1998).

## **I.2. Origem e evolução dos roedores**

O registro fóssil dos roedores é incompleto e com muitas interrogações, já que não se encontraram as formas intermediárias que permitiriam elucidar a sua origem e estabelecer as relações entre eles e os outros mamíferos. Muitos autores têm relacionado os roedores com as ordens Insectívora, Primates, Lagomorpha e Mixodonta (Li Chuan-Kuei *et al.*, 1987). Recentes trabalhos moleculares, de Frye & Hedges, 1995, trabalhando com os genes mitocondriais 12S, 16S e tRNA- valina e de Huchon *et al.*, 2002, utilizando três genes nucleares (Factor de von Willebrand, Proteína interfotoreceptora ligada a retinoide (IRBP), Receptor adrenérgico alfa 2B), suportam a monofilia da ordem Rodentia e a associação desta ordem com a ordem Lagomorpha, formando o clado Glires.

A primeira ocorrência dos roedores no registro fóssil data do Paleoceno da América do Norte onde se encontraram restos de *Paramys atavus*, representante da família Ischyromyidae (Paramyinae). A partir daí, a ordem se diversificou

amplamente no Eoceno, aparecendo no Eoceno Inferior na Europa e Ásia. Os roedores da Europa e da América do Norte do Eoceno Inferior são mais semelhantes entre si do que com os roedores da Ásia (Meléndez, 1990).

No Oligoceno, a ordem Rodentia sofreu uma segunda grande diversificação com o surgimento de novas famílias na Europa, Ásia e América do Norte e famílias próprias da África e América do Sul. Entre estas, os Phiomorfa apareceram na África no Oligoceno Inferior, enquanto os Caviomorfos surgiram na América do Sul (Meléndez, 1990; McDonald, 1999; Huchon & Douzery, 2001).

A terceira diversificação da ordem produziu-se no Mioceno, com o surgimento do grupo Muridae. Neste período se inicia a gênese e diversificação das famílias que encontramos atualmente povoando a Terra. Assim, nesta época apareceram na América do Sul todas as famílias atuais do subcontinente pertencentes a infra-ordem Caviomorpha. Deve-se ter em conta que, durante o Mioceno, a América do Sul permaneceu isolada – por decorrência, teve pouca imigração faunística. No limite entre o Mioceno e o Plioceno produziram-se importantes trocas faunísticas entre a América do Sul e a América do Norte (Reig, 1981; Huchon *et al.*, 2002).

### **I.3. Categorias subordinais dentro da ordem Rodentia**

A ordem Rodentia foi classificada em três sub-ordens maiores (Sciuromorpha, Myomorpha e Hystricomorpha) baseada nos diferentes arranjos da musculatura zigomassetérica (uma quarta forma, protrogomorpha, foi descrita depois por Wood, 1965).

Tullberg (1899) propôs duas categorias subordinais (Hystricognathi e Sciurognathi) baseadas no ângulo da mandíbula inferior.

A Subordem Hystricognathi apresenta uma condição histricomorfa com um canal infraorbital muito grande que é atravessado pelo músculo masseter intermediário, muito desenvolvido, originando na parte anterior do rosto, o arco zigomático. Também apresenta o tipo de mandíbula histricognato com a apófise do osso angular no plano paralelo ao corpo da mandíbula. O processo coronoideo é reduzido (Reig, 1981; Myers, 1999).

A subordem Sciurognathi apresenta a condição esciurognata, na qual o músculo masseter lateral está deslocado para frente, ligando-se à parte dianteira



Carleton (1984) e Wilson & Reeder (1993) consideraram também uma classificação dicotômica, reconhecendo unicamente Hystricognathi e Sciurognathi, sem dividir a última em infra-ordens. Enquanto a subordem Hystricognathi tem apenas 230 espécies agrupadas em 68 gêneros. Sciurognathi é muito mais rica sob o ponto de vista taxonômico, com cerca de 1.800 espécies em 375 gêneros em 11 famílias (Tabela 2).

**Tabela 2. Classificação da subordem Sciurognathi de acordo com Wilson & Reeder (1993).**

---

Ordem: Rodentia
Subordem: Sciurognathi
Família: Aplodontidae
Família: Sciuridae
Família: Castoridae
Família: Geomyidae
Família: Heteromyidae
Família: Dipodidae
Família: Anomaluridae
Família: Pedetidae
Família: Ctenodactylidae
Família: Myoxidae
Família: Muridae
Subfamília Sigmodontinae

---

A monofilia da subordem Hystricognathi tem recebido suporte por dados paleontológicos (Wood, 1975; Luckett & Hartenberger, 1985; Jaeger, 1988; Wyss *et al.*, 1993). Esta consideração está apoiada em características morfológicas e anatômicas tais como: configurações cranianas e dentais (Wood, 1985), características do ouvido médio (Lavocat & Parent, 1985), padrão da artéria carótida (Bugge, 1985), membranas fetais (Luckett, 1985) e miologia (Woods & Hermanson, 1985). Adicionalmente, dados cromossômicos (George, 1985), seqüências de proteínas ribonucleases (Beintema, 1985), seqüências de genes mitocondriais (Catzeflis *et al.*, 1995; Nedbal *et al.*, 1996) e nucleares (Huchon *et al.*, 1999; 2000) suportaram a existência e monofilia desta subordem.

De acordo com Wood (1985), os histricomorfos teriam evoluído a partir dos sciuromorfos. Os táxons que formam sciuromorfos, segundo dados moleculares (Nedbal *et al.*, 1996; Huchon *et al.*, 1999; 2000), constituem um grupo polifilético.

No caso da Infraordem Myomorpha, Nedbal *et al.* (1996), trabalhando com seqüências do gene ribossomal 12S e Montgelard *et al.* (2002), trabalhando com os genes 12S e citocromo *b*, não sustentaram esta categoria.

#### **I.4. Família Muridae**

Os membros desta família podem ser encontrados em todos os continentes exceto no antártico e em muitas ilhas oceânicas. Ocupam os ecossistemas que se estendem do deserto seco ao bosque tropical úmido, da tundra ou savana à floresta temperada. Também existem espécies que são semiaquáticas, subterrâneas e outras que habitam bosques tropicais. Seus hábitos de alimentação vão de onívoro verdadeiro aos especializados em minhocas, fungos subterrâneos e, inclusive, invertebrados aquáticos (Myers, 1999).

Os membros desta família apresentam de algumas gramas a um quilograma ou mais. A maioria tem olhos relativamente grandes. Os ouvidos externos variam de quase ausentes, por exemplo, nos cavadores como os *Spalax*, a moderadamente grande. Os muridos fossoriais têm patas relativamente curtas. Os pés de alguns são relativamente pequenos; os dos nadadores são grandes e quase completamente palmados, os de muitos trepadores são grandes e com fortes garras. A pata dianteira possui quatro dígitos com garras (o polegar é pequeno e possui uma unha); o pé traseiro tem cinco dígitos com garras (em alguns casos o primeiro dedo do pé tem uma unha). As caudas podem ser de quase ausente nos hamsteres siberianos a muito mais longas que a cabeça e o corpo em alguns ratos dos trópicos. Em muitas espécies a cauda fica quase nua, como nos ratos da Noruega; em outros são muito peludas. A pelagem é também altamente variável, em padrão e cor (Myers, 1999).

No crânio dos Muridae, o forâmen infraorbital é grande o suficiente para permitir a passagem do masseter mediano, que se origina no lado do rostrum e insere-se na mandíbula baixa. Na parte baixa, o forâmen se reduz e tem forma de olho de fechadura. A placa zigomática, formada pela base anterior do arco zigomático, é ampla e visível no crânio, ela serve como base para o masseter lateral. Esta disposição do masseter com uma ramificação passando pelo forâmen infraorbital e outra fixada à placa zigomática chama-se miomorfa. O jugal, um osso que forma o arco zigomático, é pequeno e não

contata com o lacrimal. Os frontais são reduzidos e envolvem as cavidades oculares e não apresentam processo pós-orbital. O osso interparietal é geralmente visível (Myers, 1999).

A família Muridae tem muita importância para a humanidade, já que algumas espécies causam prejuízos milionários na agricultura e nos alimentos armazenados. Outros são vetores de um grande número de doenças que afetaram e/ou afetam as populações humanas. Não obstante, muitas espécies são benéficas, já que algumas são controles biológicos para insetos prejudiciais, outras podem ser chaves para a manutenção da saúde dos bosques atuando como dispersores de sementes. Não podemos esquecer sua imensa utilidade para investigações médicas (Myers, 1999).

Simpson (1945) indicou a conveniência de diferenciar os Muridae como duas subfamílias da superfamília Muroidea.

A Família Muridae, segundo Wilson & Reeder (1993), compreende 1326 espécies (cerca de 29% de todos os mamíferos são roedores da família Muridae), 281 gêneros e 17 subfamílias, isto faz com que sejam a maior família de mamíferos.

Michaux *et al.* (2001), trabalhando com genes nucleares que codificam para proteínas (gene Lecitina Colesterol Acil Transferase, LCAT e Factor de von Willebrand, vWF) e Adkins *et al.* (2003), estudando o gene BRCA (gene supressor de tumor de câncer de mama) e o gene para o receptor do hormônio de crescimento, encontraram evidência da monofilia da maioria das subfamílias que fazem parte da família Muridae.

### **I.5. Subfamília Sigmodontinae**

O nome Sigmodontinae foi usado pela primeira vez por Thomas em 1897. De acordo com Wilson & Reeder (1993), esta subfamília inclui 423 espécies em 79 gêneros de toda América. Reig (1981) propôs que esta subfamília ocupa principalmente a América do Sul e representa 55% das espécies de roedores (aproximadamente 250 espécies) e 22% das espécies de mamíferos deste subcontinente. Eles não representam uma linhagem autóctone da América do Sul, que segundo o registro fóssil encontra-se presente desde o Plioceno inferior. A

Tabela 3 apresenta a classificação sugerida por Musser & Carleton (1984), mas também acrescenta novos táxons, bem como outras alterações sugeridas por diversos autores (Patton *et al.*, 1989; Hershkovitz, 1990; Patterson, 1992; Smith & Patton, 1993; Voss & Carleton, 1993; Patton & Silva, 1995; Steppan, 1995; Bonvicino *et al.*, 1998; Musser *et al.*, 1998; Weksler *et al.*, 1999).

**Tabela 3. Classificação da subfamília Sigmodontinae, de acordo com Musser e Carleton (1993), com modificações.**

---

Subfamília Sigmodontinae (64, 310)
Tribo Oryzomyini (15, 107)
Tribo Ichthyomyini (5, 15)
Tribo Akodontini (15, 65)
Gênero <i>Akodon</i> (29)
Gênero <i>Bolomys</i> (6)
Gênero <i>Thalpomys</i> (2)
Gênero <i>Oxymycterus</i> (9)
Gênero <i>Lenoxus</i> (1)
Gênero † <i>Dankomys</i> (1)
Gênero <i>Blarinomys</i> (1)
Gênero <i>Podoxomys</i> (1)
Gênero <i>Juscelinomys</i> (1)
Gênero <i>Abrothrix</i> (6)
Gênero <i>Chroeomys</i> (1)
Gênero <i>Chelemys</i> (4)
Gênero <i>Notiomys</i> (1)
Gênero <i>Pearsonomys</i> (1)
Gênero <i>Geoxus</i> (1)
Tribo Scapteromyini (3,6)
Tribo Wiedomyini (2, 2)
Tribo Phyllotini (15, 48)
Tribo Sigmodontini (1, 10)
Tribo Thomasomyine (9, 57)
Sigmodontinae <i>incertae sedis</i>

---

Entre parênteses nas tribos o número de gêneros e de espécies respectivamente e nos Gêneros o número de espécies.

Quarenta e quatro por cento dos Sigmodontinae pertencem aos Oryzomyini, 25% são Akodontini e 18% são Phyllotini. Assim, estas três tribos formam 87% das espécies da subfamília Sigmodontinae (Reig, 1980; 1981; 1984; 1987).

### **I.5.1. Local de diferenciação e antigüidade dos Sigmodontinae**

Existem três hipóteses para explicar o local de diferenciação e a antigüidade dos Sigmodontinae:



Hipótese clássica: sustentada por Baskin (1978), Patterson & Pascual (1972) e Simpson (1950). Estabelece que os Sigmodontinae são um elemento invasor recente da América do Sul e que eles teriam se diversificado na maioria de seus gêneros e espécies nas regiões tropicais da América do Norte antes de migrar para América do Sul, atravessando a ponte do Panamá, no Plioceno, há 3 milhões de anos (Marshall *et al.*, 1979 data a formação da ponte nessa época). Esta hipótese apresenta dois argumentos a favor: primeiro, o registro fóssil indica a presença de Sigmodontinae na América do Sul a partir da formação Chapadmalalense (Plioceno superior); segundo, estão presentes Phyllotini no Mioceno da América do Norte.



Hipótese alternativa principal: proposta primeiramente por Hershkovitz (1966; 1972), sustentada por Savage (1974) e desenvolvida por Reig (1975; 1978; 1980; 1981; 1984; 1987). Com base no extenso padrão de diversificação e marcado endemismo dos Sigmodontinae, sugere que a diferenciação foi local, na América do Sul, partindo de uma linhagem ancestral que ingressou no início do Mioceno. Assim, os Sigmodontinae fariam parte da fauna antiga da América do Sul. Uma vez dentro do subcontinente, os Sigmodontinae diferenciaram-se na maioria dos gêneros e espécies atuais. Acredita-se que o ingresso foi pelo extremo noroeste, a partir de uma linhagem da América do Norte. Esta linhagem ancestral teria alcançado a América do Sul por meio transaquático, antes do estabelecimento da ponte do Panamá.

A tribo Oryzomyini apresenta um alto grau de caracteres primitivos, levando a pensar que eles descenderam dos cricetidos do Oligoceno da América do Norte.

Como argumentos que sustentam esta hipótese pode-se citar: Reig (1978), que encontrou fósseis de Sigmodontinae nos estratos mais velhos do Montehermosense (estrato que foi datado por Marshall *et al.* 1979, em quatro milhões de anos); como estes fósseis são muito semelhantes às espécies atuais,

sugere-se que há quatro milhões de anos os Sigmodontinae já estavam diferenciados.



Uma terceira hipótese foi postulada por Marshall *et al.* (1979), que propôs que os Sigmodontinae originaram-se na América do Norte no Mioceno Superior há sete milhões de anos e que teriam chegado à América do Sul por dispersão transaquática, a partir da América Central, há 6 milhões de anos, já que existem registros de que o nível do mar era baixo e a distância entre a América Central e a América do Sul era menor, possibilitando, assim, esta dispersão. Segundo Marshall os primeiros Sigmodontinae habitavam florestas e diferenciaram-se em formas que ocuparam savanas no norte da América do Sul. Logo se dispersaram em direção ao sul, seguindo o lado oriental da Cordilheira dos Andes, chegando aos Pampas argentinos cerca de 3,5 – 4 milhões de anos atrás, coincidindo com os primeiros registros fósseis no Montehermosense.

Reig (1987) opinou que a hipótese clássica não é correta, já que se fosse teria que existir uma maior diversidade atual na América Central e América do Norte. Ele também considera que a hipótese de Marshall é errônea já que existem dados que comprovam que os principais eventos de diversificação não foram nas savanas da região norte da América do Sul. Considerando que cerca de 87% dos Sigmodontinae estão representados por Oryzomyini, Phyllotini e Akodontini que têm uma distribuição principalmente andina. Reig (1984; 1987) propôs que a principal área de diferenciação dos Sigmodontinae ocorre nos Andes, sendo este o eixo de dispersão.

Das três tribos, Oryzomyini é a mais primitiva em caracteres dentários e cranianos e vários autores (Reig, 1978; 1980; 1981; 1984) relacionaram esta tribo com os Cricetodontinae da América do Norte durante o Oligoceno. Os Oryzomyini habitam a selva orófila e têm hábitos alimentares onívoros e/ou insetívoros. Esta tribo apresenta um número maior de gêneros e subgêneros no norte dos Andes, o que, segundo Reig (1987), estaria indicando que este foi o local desta diversificação. Assim, eles descenderiam dos Cricetodontinae da América do Norte e seriam o estoque mais antigo a partir dos quais começou a evolução dos Sigmodontinae.

A região setentrional dos Andes durante o Eoceno, Mioceno e Pliopaleoceno sofria uma ativa orogenia (Van der Hammen, 1961), gerando um aumento na heterogeneidade dos ambientes, impulsionando a diferenciação dos Oryzomyini ancestrais para adaptar-se aos distintos ambientes (Reig, 1987).

Numa etapa posterior, na diferenciação e diversificação dos Sigmodontinae, surgiu a tribo Akodontini.

Os dados moleculares de Smith & Patton (1999), não deixam dúvidas acerca da monofilia da subfamília Sigmodontinae e também esclarecem sua próxima relação com os murídeos da América do Norte (*Peromyscus*, *Reithrodontomys*, *Neotoma* e *Scotinomys*).

## I.6. A tribo Akodontini

A tribo Akodontini foi descrita por Vorontzov em 1959, sendo formada por os seguintes gêneros com representantes atuais: *Abrothrix*, *Akodon*, *Bolomys*, *Chroeomys*, *Oxymycterus*, *Chelemys*, *Geoxus*, *Notiomys*, *Blarinomys*, *Podoxymys*, *Lenoxus*, *Juscelinomys*, *Pearsonomys*, *Thalpomys*, *Deltamys* (subgênero?) e um gênero extinto: *Dankomys* (Reig, 1987).

A tribo pode ser caracterizada como constituída por roedores Sigmodontinae de tamanho pequeno ou médio com sistema digestivo onívoro ou insetívoro, sem especializações para alimentar-se de plantas; o estômago é unilocular hemiglandular, em alguns casos pode ser discoglandular; o intestino grosso é curto, usualmente menor que 15% do comprimento do intestino delgado; cecum pequeno ou ausente; dentes molares subhypsodontos a mesodontos, excepcionalmente braquiodontos, com cristas secundárias e terciárias planas; o crânio apresenta placa zigomática pequena ou moderadamente desenvolvida; o palato é amplo, curto ou moderadamente longo; as glândulas prepuciais usualmente simples, com glândulas penianas complexas. O cariótipo desta tribo apresenta um 2n que nunca supera os 54 cromossomos (Reig, 1984).

Os Akodontini são predominantemente andinos (Reig, 1984) e muitos deles habitam terras abertas, embora alguns de seus representantes possam habitar

florestas tropicais, subtropicais ou habitat temperado; alguns gêneros exploram o habitat subterrâneo (*Blariomys*, *Chelemys*, *Geoxus* e *Notiomys*).

Muitas espécies são onívoras (Meserve, 1981; Meserve & Glanz, 1978; Pearson, 1983); algumas espécies são especializadas numa dieta insetívora, como *Oxymycterus* (Kravetz, 1973), *Notiomys* e *Geoxus* (Pearson, 1983; 1984). *Chelemys* alimenta-se principalmente de fungos e algumas espécies de *Bolomys* são vegetarianas (Reig, 1987), embora os demais Akodontini não sejam herbívoros.

### **I.6.1. Evolução da tribo Akodontini**

Os Akodontini são mais atuais que os Oryzomyini na estrutura molar, do crânio, nas glândulas acessórias do macho (Voss & Linzey, 1981) e no cariótipo (Gardner & Patton, 1976). Eles são provavelmente descendentes diretos dos Oryzomyini. Simultaneamente, os Akodontini são mais primitivos que os Phyllotini no padrão molar e sistema digestivo (Voss & Linzey, 1981) e podem ser seus ancestrais.

Os Akodontini têm uma dieta generalista, com algumas exceções. Dentro da tribo, a maioria das espécies pertence aos gêneros *Akodon*, *Oxymycterus* e *Bolomys* (80,3%), cujos representantes são encontrados em ambientes tão diferentes como a Puna, o Chaco, os pampas, os patamares patagônicos, as selvas subtropicais, regiões abertas, etc. Embora sua dieta e distribuição sejam variáveis, eles são principalmente andinos, com a maioria das espécies distribuídas nesta região, por isso eles devem ter-se diferenciado nesta região, entre 20º e 30º de latitude, já que este é o local com mais abundância de espécies, gêneros e subgêneros.

A linhagem ancestral de Akodontini deve ter sido uma forma semelhante aos *Akodon* atuais.

### **I.7. O gênero *Akodon***

O gênero foi cunhado por Meyen em 1833, ao descrever *Akodon boliviensis*, que é a espécie-tipo. A distribuição deste gênero compreende os vales andinos, terras altas e bordas das florestas de montanha da Argentina,

Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela; no Chile e nos prados das regiões temperadas da Argentina, Bolívia, SE do Brasil, Chile, e Paraguai.

Reig (1987) propôs ser *Akodon* formado por seis subgêneros, alguns deles posteriormente elevados à categoria de gênero:

*Akodon* Meyen, 1833.

*Hesperomys* Wagner, 1839.

*Habrothrix* Thomas, 1884.

*Chalcomys* Thomas, 1916.

*Thaptomys* Thomas, 1916.

*Bolomys* Thomas 1916.

*Deltamys* Thomas, 1917.

As espécies do gênero *Akodon* apresentam a cauda mais curta do que a cabeça e o corpo, as patas traseiras são relativamente curtas e as orelhas são pequenas. Os molares tendem à simplificação e o terceiro molar mostra redução de tamanho (Reig, 1987).

O comprimento da cabeça e do corpo oscila entre 72 e 141 mm e o tamanho da cauda varia entre 50 e 100 mm. As garras são longas. O dorso apresenta uma coloração que varia entre o cinza e marrom e o ventre vai do branco ao cinza.

A alimentação é principalmente onívora baseada em frutos, sementes, insetos e vegetais.

O número de espécies reconhecidas neste gênero é muito variável: Eisenberg & Redford (1999) reconheceram entre 26 e 45 espécies, enquanto que Reig (1984) indicou 34 espécies.

## **I.8. *Deltamys kemp***

### **I.8.1. Posição taxonômica**

O gênero foi proposto por Thomas em 1917, através de animais capturados por R. Kemp na ilha Ella, no Delta do Paraná (Província de Buenos Aires), sendo esta sua localidade-tipo. Thomas denominou esta espécie de

*Deltamys kemp*, conhecida vulgarmente como “Raton aveludado”. Gyldenstolpe (1932) e Tate (1932) também o propuseram como gênero.

Ellerman (1941) propôs ser *Deltamys* um *Akodon* diferenciado, incluindo-o dentro do gênero *Akodon*, como um subgênero. Cabrera (1961), Massoia (1964) e Reig (1981) concordam com essa posição.

Todos os autores que propuseram ser *Deltamys* um subgênero de *Akodon*, fundamentaram-se em características externas e medidas cranianas e o compararam com a espécie-tipo *Akodon*, *A. boliviensis*. Os dados citogenéticos podem ajudar a resolver esta questão. Todas as espécies de *Akodon* estudadas apresentaram um pequeno par de metacêntricos que tem sido considerado como marcador do gênero (Bianchi *et al.*, 1971; Lobato *et al.*, 1981); em *Deltamys* não foi encontrado esse par (Fronza *et al.*, 1981; Sbalqueiro *et al.*, 1984; Castro *et al.*, 1991). González & Massoia (1995) revalidaram o gênero *Deltamys* com uma espécie, *D. kemp*, e duas subespécies, *D. k. kemp* e *D. k. langguthi*.

### **I.8.2. Distribuição**

Massoia (1964) e Hershkovitz (1972) descreveram *D. kemp* como uma espécie semiaquática de distribuição restrita: no leste da Argentina (Ilha Ella no Delta; Quilmes; Punta Lara) e sul do Uruguai (Depto de Montevideu, Parque Lecop). Posteriormente, foi encontrado no Brasil na reserva ecológica do Taim, Rio Grande do Sul (Sbalqueiro *et al.*, 1984). Castro *et al.* (1991) ampliaram esta distribuição para mais ao norte do Brasil, localizando-o em Tapes e Tramandaí, Rio Grande do Sul.

### **I.8.3. Características morfológicas e historia natural**

*D. kemp* é muito semelhante externamente a *A. azarae*, diferenciando-se desta por ter o corpo mais arredondado e a cauda proporcionalmente mais longa. O comprimento das patas e das orelhas de *D. kemp* é semelhante ao de *A. azarae*. *D. kemp* apresenta orelhas mais ovaladas e cobertas de pequenos pêlos pretos, em *A. azarae* os pêlos que cobrem as orelhas são avermelhados. A coloração do dorso é preta. Os flancos e a cabeça são de cor cinza escuro devido aos pêlos dessas partes terem sua porção terminal de cor ocre. O ventre é de cor

cinza chumbo. Alguns animais têm uma mancha branca no maxilar. A porção inferior de todos os pêlos tem cor cinza chumbo (Massoia, 1964; González & Massoia, 1995). A pelagem apresenta a particularidade de ser muito densa, fina e suave com aspecto de veludo.

O ambiente habitado por *D. kempi* é do tipo banhado inundável, com abundância de *Scirpus giganteus*. Embora possa ser encontrado em habitats limnicos, não apresenta adaptações externas especializadas para a vida aquática (Massoia, 1964; Gonzáles & Massoia, 1995).

Quanto à alimentação são, provavelmente, generalistas, já que são capturados em armadilhas com diferentes iscas. No estômago têm-se encontrado restos de invertebrados que se assemelham a insetos, coleópteros e ortópteros (Massoia, 1964).

Massoia (1964) relatou que Formes capturou prole em Quilmes (Provincia de Buenos Aires) num ninho de fibras vegetais dentro de um tronco oco. Segundo o autor, o ninho se assemelha ao de outras espécies de *Akodon* (p. ex. *A. arviculoides* e *A. azarae*).

#### I.8.4. Cariótipos

Fronza *et al.* (1981) foram os primeiros a estudar citogeneticamente *D. kempi*. Os autores analisaram um macho e uma fêmea, provenientes da Reserva Biológica "Punta Lara" (Buenos Aires, Argentina). Encontraram tanto o macho como a fêmea com um número diplóide ( $2n$ ) de 37 e um número fundamental (NF= número de braços cromossômicos) de 38, apresentando o cariótipo de ambos 36 acrocêntricos e um elemento ímpar submetacêntrico. Como as bandas G foram obtidas apenas na fêmea e a meiose é possível apenas de ser acessada nos machos, embora a observação de um número ímpar nos dois sexos, o cariótipo da espécie foi interpretado como sendo do tipo  $XY_1Y_2/XX$ .

Posteriormente, Sbalqueiro *et al.* (1984) analisaram oito fêmeas e seis machos coletados na Reserva Ecológica de Taim, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os machos apresentaram  $2n=37$  e  $NF=38$ , seis fêmeas mostraram  $2n=38/NF=38$  e duas  $2n=37/NF=38$ .

Pelo bandejamento G foram identificados 17 pares de autossomos acrocêntricos nas seis fêmeas com cariótipos de  $2n=38/NF=38$  e em todos os machos. Além destes, três elementos adicionais foram observados nos machos: um cromossomo submetacêntrico grande (o maior do cariótipo) e dois acrocêntricos ímpares, sendo que o menor deles tinha um padrão de bandas igual ao braço longo do submetacêntrico grande. Nas fêmeas com cariótipo  $2n=38/NF=38$ , o submetacêntrico grande e os dois acrocêntricos ímpares não estavam presentes, sendo observados apenas acrocêntricos (19 pares). Estas diferenças entre os cariótipos de machos e fêmeas foram interpretadas pelos autores como sendo devidas à ocorrência de uma fusão cêntrica entre o cromossomo Y e um autossomo (Y/A) que deu origem a um sistema cromossômico múltiplo de determinação do sexo do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ . Esta interpretação foi confirmada pelas análises, feitas pelos os autores, do padrão de bandejamento C e da meiose dos machos. Para maior clareza, este rearranjo está ilustrado na Figura 1.

Num terceiro trabalho, Castro *et al.* (1991), analisaram treze machos e quinze fêmeas capturados nas proximidades de Tapes e Tramandaí no Estado do Rio Grande do Sul. Nos 28 indivíduos analisados, sete cariótipos diferentes foram observados, envolvendo duas fusões cêntricas distintas, tanto em homozigose como em heterozigose.

É importante fazer notar que a análise da meiose mostra que os machos heterozigotos para fusão cêntrica Y/A ou para as fusões entre autossomos mostram trivalentes com orientação alternada, gerando, como resultado, somente gametas balanceados.

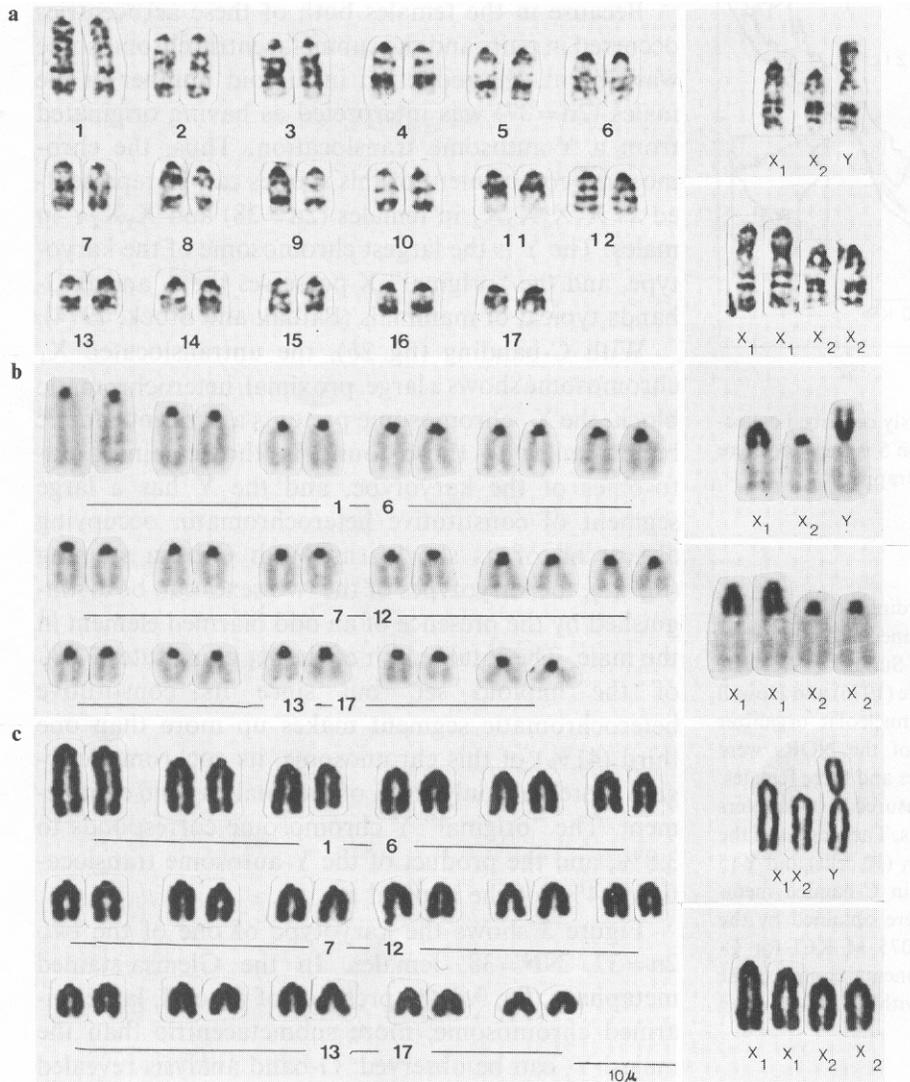


Figura 1: Autossomos e par sexual de machos com  $2n=37/NF=38$  e das fêmeas com  $2n=38/NF=38$  em bandas G (a), bandas C (b) e coloração convencional (c) (retirado de Sbalqueiro *et. al.*, 1984).

Uma relação dos rearranjos cromossômicos até agora descritos em *D. kempis* encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Números diplóide (2n) e fundamental (NF) e fusões cêntricas observadas em *D. kempfi* nos diferentes locais do Estado do Rio Grande do Sul (baseado em Castro *et. al.*, 1991).

2n/NF	Número de espécimes	Fusões	Locais*	Autor
Machos				
35/38	1	t(9;15)/t(9;15)	4	A
36/38	1	t(2;3)	3	A
36/38	7	t(9;15)	4	A
37/38	4; 1; 6	Zero	4; 2; 1	a, b, c
Fêmeas				
36/38	2	t(9;15)/t(9;15)	4	A
37/38	6	t(9;15)	4	A
37/38	1	Não identificada	1	B
37/38	2	t(1;13)	2	C
38/38	7;6	Zero	4; 2	A, c

\* O número dos locais corresponde aos da Figura 2.

a: Castro *et al.*, 1991; b: Fronza *et al.*, 1981; c: Sbalqueiro *et al.*, 1984.

A fusão cêntrica encontrada na Argentina não foi identificada pelos autores, mas Castro *et al.* (1991) consideraram não ser a mesma encontrada nos demais locais do Brasil.

Analisando a Tabela acima observa-se que as fusões são locais específicas (Figura 2), Taim apresentando a t(1;13), Tapes a t(2;3) e Tramandaí a t(9;15). Dos 44 indivíduos analisados citogeneticamente, 45% portaram algum tipo de fusão cêntrica. Castro *et al.* (1991) propuseram que estes rearranjos estão desempenhando um papel adaptativo na exploração dos habitats por esta espécie.

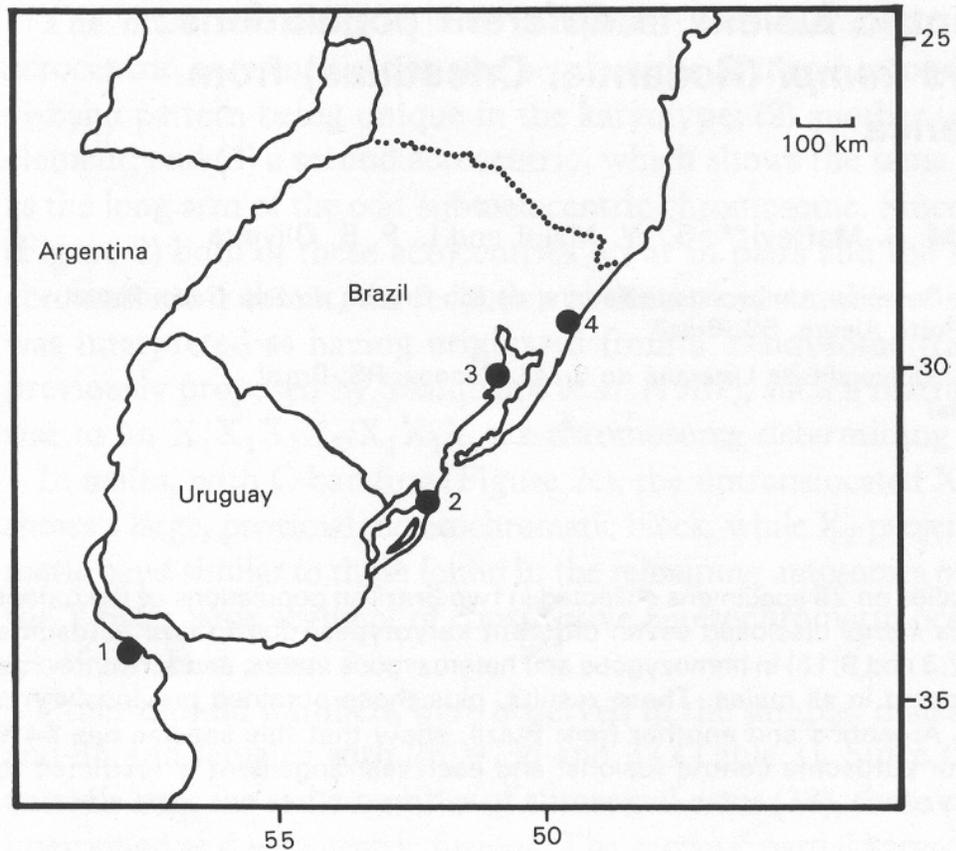


Figura 2: Pontos de coleta de *D. kempfi*: (1) La Plata (Fronza *et al.*, 1981); (2) Taim (Sbalqueiro *et al.*, 1984); (3) Tapes (Castro *et al.*, 1991); (4) Tramandaí (Castro *et al.*, 1991).

### I.9. O DNA mitocondrial no estudo da filogeografia

A questão de como definir uma espécie e o que este conceito representa em termos reais ou operacionais sempre gerou extensas discussões na área da Biologia Evolutiva, talvez porque realmente seja impossível chegar-se a um acordo sobre uma definição consensual com respeito as infindáveis variações encontradas na natureza. Se esta é a situação sobre a definição de espécie, para táxons infra-específicos estas dificuldades são ainda maiores sendo, ultimamente, definições neste nível consideradas arbitrárias ou tipológicas, sem sentido populacional. No entanto, parece muito claro que existem subdivisões reais que refletem as separações histórico/geográficas e/ou ecológicas de grupos

pertencentes à mesma espécie (Moritz, 1994). Como estes subgrupos podem compor uma fração da biodiversidade do todo da espécie, poderiam representar, em termos evolutivos, unidades tão ou mais reais do que o conjunto total de populações que constituem o universo de uma espécie. Desta forma, a identificação de sua presença dentro do "conjunto espécie" é extremamente importante porque, dependendo do grau de isolamento passado ou atual entre os grupos, pode-se supor que representem unidades com "destinos" evolutivos independentes. A identificação da forma como se apresenta a biodiversidade (uniforme ou fragmentada) de uma dada espécie é fundamental, portanto, no traçado de qualquer projeto para sua conservação.

A variabilidade genética é um dos atributos universais das populações naturais e tem sido, por muitos anos, uma das grandes preocupações dos geneticistas de populações, que têm buscado metodologias para quantificar e explicar essa variabilidade em termos de sua origem, manutenção e importância para a evolução.

Com base na diversidade biológica, nesse século houve grandes avanços na estimativa de filogenias, como também nas análises de variações microevolutivas. Até a década de 60, os estudos baseavam-se nas características morfológicas e na variação ambiental, metodologias que continuam sendo hoje utilizadas com maior sofisticação. Porém, primeiro com as análises dos cariótipos e, posteriormente, com a elucidação das bases moleculares da herança, as macromoléculas biológicas têm assumido progressivamente uma importante função nos estudos evolutivos.

Por outro lado, a invenção da reação em cadeia pela polimerase ou PCR (Saiki *et al.*, 1988), tornou acessível numerosas classes de polimorfismos, principalmente aqueles gerados das análises do DNA nuclear e mitocondrial. Por serem capazes de evidenciar bandas (alelos) gênero-específicas e espécie-específicas, além dos polimorfismos a nível inter-individual, permitem avaliar a variabilidade das populações de diferentes espécies, possibilitando estimar o fluxo gênico decorrente de migrações entre diferentes áreas (Hadrys *et al.*, 1992). Estes marcadores são úteis em estudos filogeográficos, definindo a filogeografia como a área de estudo que lida com a distribuição histórica e geográfica de

linhagens genealógicas (=linhagens de genes), especialmente aquelas dentro e entre espécies proximamente relacionadas. Através da filogeografia é possível observar se séries de linhagens independentes mostram padrões geográficos concordantes, o que permitiria reconstruir a história biogeográfica dos biomas com base nos padrões compartilhados pelos táxons.

Este tipo de abordagem, por decorrência, permite relacionar as distribuições espaciais de alelos, cujas relações filogenéticas são conhecidas ou podem ser estimadas (Avise, 2000). Uma análise filogeográfica, portanto, resulta da integração de estudos de genética molecular evolutiva, história natural, biologia de populações, paleontologia, geografia histórica e especiação. É um campo novo de estudo cuja maior parte das análises utiliza o mtDNA (da Silva & Patton, 1998; Avise, 2000; Patton *et al.*, 2000). O emprego preferencial desta molécula como ferramenta advém de algumas propriedades altamente favoráveis aos estudos filogenéticos que apresenta, principalmente o tamanho reduzido e relativa simplicidade, o fato de ser haplóide, ser de herança matrilinear, ter baixa frequência de rearranjos derivados de recombinação, inversão ou transposição e, ainda, apresentar altas taxas de substituições, deleções e inserções de nucleotídeos e usual ausência de recombinação genética intermolecular (Thorpe *et al.*, 1994; Strauss, 1999; Avise, 2000).

Com poucas exceções, o genoma mitocondrial animal, que ocorre de centenas a milhares de cópias por célula, é uma molécula circular fechada, de 15-20 kilobases em comprimento, composta de 37 genes codificando para 22 tRNAs, 2 rRNAs e 13 mRNAs. É composto de uma região controladora (denominada de D-Loop em vertebrados), que inicia a replicação e a transcrição. Neles são raras ou ausentes íntrons, grandes famílias de DNA repetitivo, pseudogenes e ou seqüências espaçadoras entre genes (Hoelzel *et al.*, 1993).

Estes atributos fazem com que, tanto os fragmentos de restrição quanto as análises das suas seqüências sejam utilizados por excelência em estudos evolutivos, principalmente na construção das árvores genealógicas dos genes nos táxons (filogenias) e nas suas distribuições geográficas (filogeografia). Como ocorre alguma variação na taxa de substituição de seus genes, alguns são mais informativos em estudos intra-específicos (região controladora), outros nas

relações entre hierarquias taxonômicas superiores (gene do citocromo *b* em roedores).

A haploidia de herança materna, embora, por um lado, seja uma característica do DNA mitocondrial (na avaliação da contribuição de linhagens maternas em certos parâmetros demográficos e no tamanho amostral necessário) é, por outro lado, sua principal limitação, fornecendo estimativas distorcidas naquelas populações em que eventos como dispersão ou migração ocorrem com taxas diferentes entre machos e fêmeas. No entanto, embora levando em conta as ressalvas acima, as comparações de seqüências do mtDNA no contexto filogeográfico que serão feitas no presente Projeto trarão informações importantes sobre a história biogeográfica das populações de *Deltamys* na Planície Costeira do Rio Grande do Sul.

## I.10. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram, Através das análises da seqüência do gene mitocondrial citocromo *b* de populações da Planície Costeira do Rio Grande do Sul:

1. Investigar se ocorrem diferenças nesta seqüência entre os indivíduos procedentes de seis localidades desta região na tentativa de traçar possíveis relações filogeográficas.
2. Verificar se os conjuntos de espécimes agrupados pelos cariótipos correspondem aos mesmos conjuntos quando agrupados pelas seqüências de DNA mitocondrial, já que os rearranjos cromossômicos observados nesta espécie são próprios de cada local.
3. Estimar os tempos de divergência entre os haplótipos que ocorreram na amostra.
4. Contribuir, com esta análise, para o esclarecimento do status de *Deltamys* como gênero.

# **2. Materiais e Métodos**

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. AS AMOSTRAS

Foi analisado um total de 26 exemplares da espécie *Deltamys kempfi* (Tabela 5) coletados em seis localidades do Estado do Rio Grande do Sul (assinaladas no mapa da Figura 3).

**Tabela 5: Procedência geográfica, sexo e quantidade de espécimes analisados de *D. kempfi*.**

Local	Acrônimos	Coordenadas	M	F	D	Total
Torres (1)	TOR	29 ° 19 ' S; 49 ° 46 ' W	1			1
Osório (2)	OSO	29 ° 54 ' S; 50 ° 16 ' W			1	1
Tramandaí (3)	TRA	29 ° 57 ' S; 50 ° 11' W	6	8	4	18
Charqueadas (4)	CHA	29 ° 58 ' S; 51 ° 36 ' W	2			2
Tapes (5)	TAP	30 ° 40 ' S; 51° 23 ' W	1			1
Taim (6)	TAI	32 ° 29 ' S, 52 ° 34' W			3	3

M = macho; F = fêmea; D = sexo desconhecido. Os números entre parêntesis correspondem às localidades relacionadas na Figura 3.

As peles e crânios dos espécimes investigados estão depositados no Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil. Treze dos animais estudados tiveram seus cariótipos analisados no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do Departamento de Genética da UFRGS.

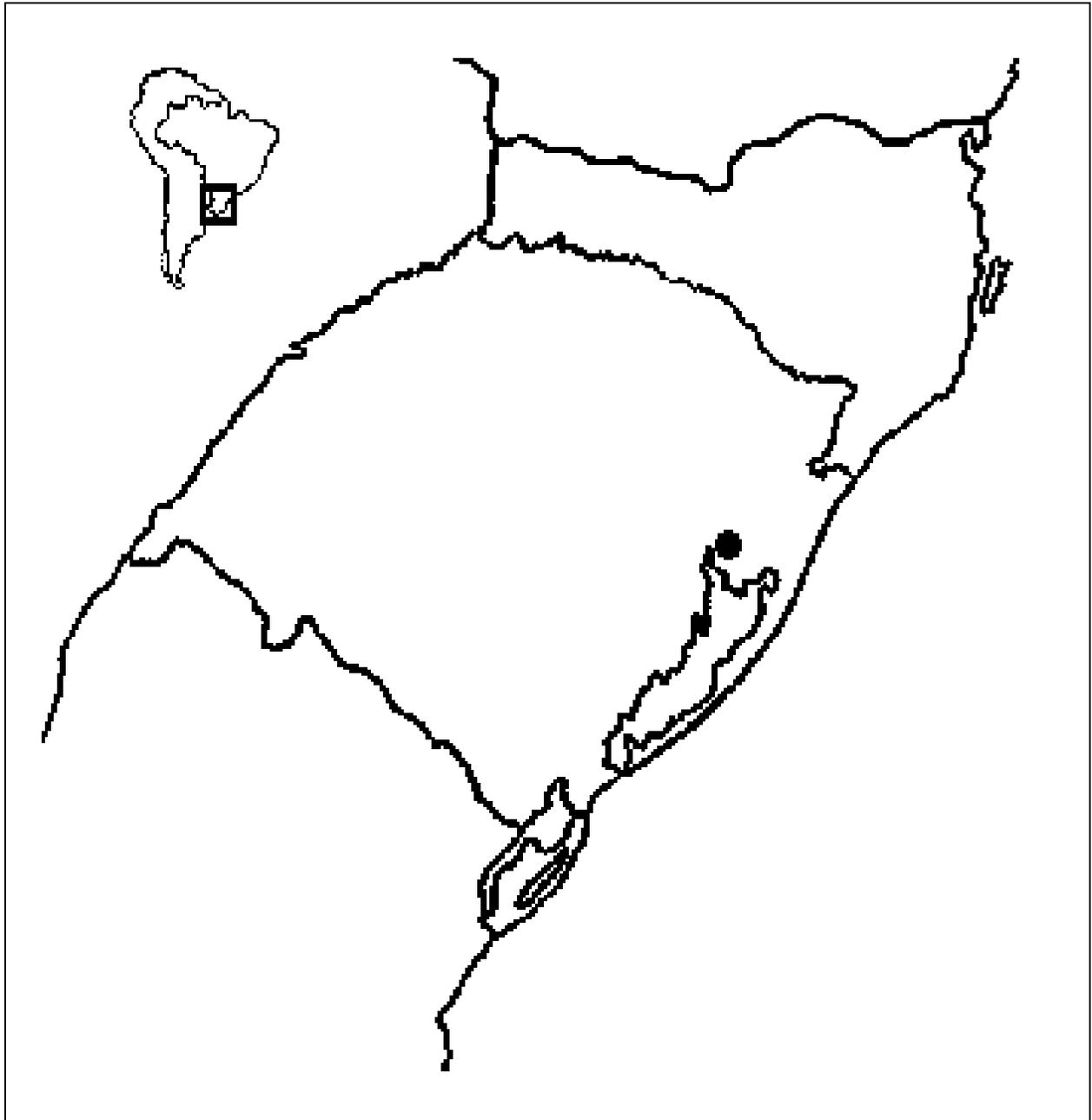


Figura 3. Mapa do Rio Grande do Sul mostrando as localidades de coleta de *D. kempí*. 1. Torres; 2. Osório; 3. Tramandaí; 4. Charqueadas; 5. Tapes; 6. Taim

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de tecidos (rim, fígado, coração ou músculo, armazenados em um freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  em álcool 70% ou envoltos por plástico e papel laminado) através do procedimento de precipitação com sal descrito por Medrano e cols. (1990) ou com fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), com algumas modificações, como descrito a seguir:

#### *Extração com Sal*

1. Cortar cerca de 20 mg de tecido da amostra e colocar em um tubo de microcentrífuga ou “eppendorf” de 1500 $\mu\text{l}$ .
2. Lavar com tampão STE (NaCl 0,1M, Tris 10mM e EDTA 1mM com pH final 8 ).
3. Adicionar ao tubo com o tecido lavado e sem STE, 550 $\mu\text{l}$  de tampão de lise (NaCl 0,1 M, Tris 50mM e EDTA 50mM com pH final 8 ), 27,5  $\mu\text{l}$  de SDS 20%, 5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercapto 2% e 20  $\mu\text{l}$  de proteinase K.
4. Levar ao banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda a noite.
5. Retirar do banho e adicionar 600 $\mu\text{l}$  de NaCl 4M.
6. Agitar por 15 segundos e centrifugar por 30 minutos a 13.000 rpm.
7. Retirar o sobrenadante e dividir em três tubos de 1500 $\mu\text{l}$ , cerca de 400 $\mu\text{l}$  em cada um deles.
8. Adicionar dois volumes de etanol absoluto, cerca de 800 $\mu\text{l}$ , em cada um dos tubos.
9. Deixar os três tubos toda a noite na geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
10. No dia seguinte, centrifugar por trinta minutos e retirar o sobrenadante que deve ser descartado, já que o DNA fica precipitado.
11. Lavar o DNA com etanol 70%: pipetar cerca de 700  $\mu\text{l}$  do reagente em cada um dos três tubos, centrifugar por cinco minutos e repetir o processo mais uma vez.
12. Colocar os tubos com o DNA precipitado, sem etanol, para secar em uma estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por trinta minutos.
13. Adicionar 30 $\mu\text{l}$  de tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM com pH final 8 ) em cada tubo e levar ao banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , também por trinta

minutos, para que o DNA entre em suspensão. Para finalizar, juntar sempre o material dos três tubos em um único tubo para maior praticidade de trabalho.

#### *Extração com fenol-clorofórmio*

1. Cortar 10 mg de tecido e colocar num “eppendorf”.
2. Adicionar 500 µl de STE, 75 µl de SDS 10%, 20 µl de proteinase K, 5 µl de β-mercapto-etanol.
3. Incubar por duas horas a 55 °C com agitação.
4. Adicionar um volume igual (600 µl) de fenol-clorofórmio 1:1 e agitar.
5. Centrifugar cinco minutos a 14.000 r.p.m.
6. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo.
7. Repetir por três vezes os passos 4, 5 e 6.
8. Adicionar um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitar.
9. Centrifugar cinco minutos a 14.000 r.p.m.
10. Transferir o sobrenadante para um novo “eppendorf”.
11. Adicionar um volume igual de isopropanol gelado e deixar 30 minutos na geladeira.
12. Centrifugar cinco minutos a 14.000 r.p.m. e descartar tudo.
13. Adicionar 300 µl de etanol absoluto 70% (gelado) e agitar.
14. Deixar no mínimo 30 minutos na geladeira.
15. Centrifugar dois minutos a 14.000 r.p.m., descartar tudo e deixar secar.
16. Ressuspender em TE.

### **2.2.2. Amplificação**

A amplificação do gene mitocondrial citocromo *b* foi feita utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descritos na literatura para *Mus musculus* (número de acesso no GenBank NC\_001569). Numa primeira fase, foi tentada a amplificação de todo o gene (1.141 pb) mediante o emprego dos “primers” externos MVZ 5 e MVZ 14 (Smith & Patton, 1991), o que geraria um fragmento de 1.245 pb, mas isso não foi possível, provavelmente, pelo estado em geral degradado do material. Optou-se, então, por amplificar o gene alvo mediante a utilização de dois conjuntos de “primers”: o primeiro incluindo os primers MVZ 5 e

o MVZ 16 (um “primer” interno, descrito em Smith & Patton, 1999) que produz um fragmento de 878 pb correspondente à primeira parte do citocromo *b*; o segundo conjunto incluindo os “primers” MVZ 14 e MVZ 23 (“primer” interno, da Silva & Patton, 1993) que produz um fragmento de 605 pb.

As seqüências diretas (“forward”) e reversas (reverse”) destes “primers” e suas posições na seqüência mitocondrial de *Mus musculus* encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6: “Primers” utilizados na amplificação e no seqüenciamento do citocromo *b* de *D. kempí*. O código IUPAC é usado para os sítios degenerados. A posição em *Mus* se refere à posição na seqüência completa do mtDNA em *Mus musculus* (Bibb *et al.*, 1981).**

“Primer”	Seqüência 5' → 3'	Posição em <i>Mus</i>
“Forward”		
MVZ-5	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	14.115
MVZ-23	TACTCTCTTCCTCCACGCGAAACJGGNTC	14.752
“Reverse”		
MVZ-16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	14.940
MVZ-14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC	15.309

Na Figura 4 é apresentada uma representação parcial do genoma da mitocôndria mostrando os genes de citocromo *b*, tRNA-Glu e tRNA-Thr

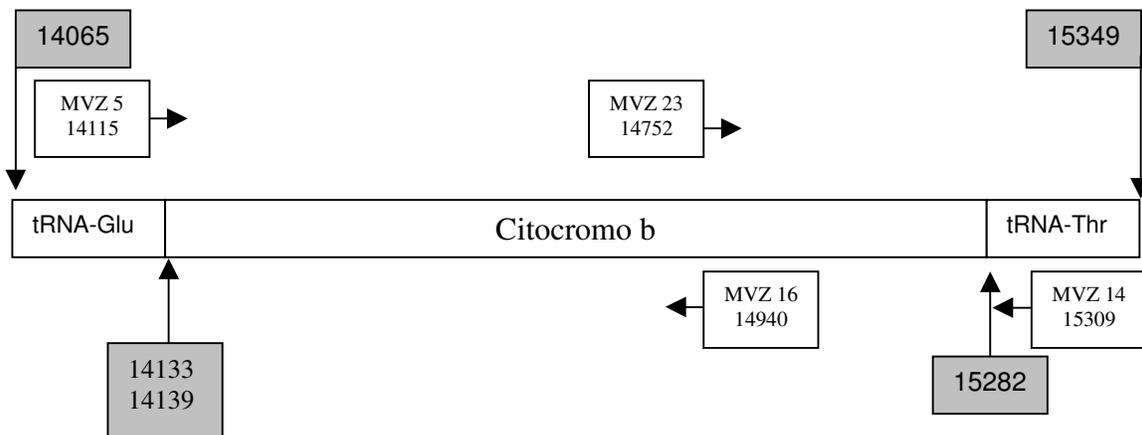


Figura 4: Representação parcial do genoma da mitocôndria mostrando os genes tRNA-Glu, citocromo *b* e tRNA-Thr. As caixas cinzas indicam a posição de início e fim dos genes e as caixas brancas os “primers” e suas posições segundo a seqüência da mitocôndria de *Mus musculus*.

As reações de amplificação, utilizando o conjunto de “primers” MVZ 5 e MVZ 16, foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1 µl DNA genômico; 1 x tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl); 0,2 mM de dNTPs; 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 µM de cada “primer”; 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Biotools) e água q.s.p. No caso dos “primers” MVZ 14 e MVZ 23 mudou-se a concentração final do MgCl<sub>2</sub> para 2,0 mM.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas utilizando-se programas específicos para cada par de "primers", conforme apresentado na Tabela 7:

**Tabela 7: Condições de PCR.**

<u>MVZ-5 e MVZ-16</u>			
	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1º ciclo	94 °C 5 min	65 °C 1,5 min	72 °C 2 min
Do 2 ao 10 ciclo	94 °C 2 min	64 °C (-1°C por ciclo) 1,5 min	72 °C 2 min
Do 11 ao 35 ciclo	94 °C 2 min	55 °C 2 min	72 °C 2 min
<u>MVZ 14 e MVZ 23</u>			
1º ciclo	94 °C 5 min	50 °C 1,5 min	72 °C 2 min
39 ciclos	94 °C 2 min	50 °C 1,5 min	72 °C 2 min

### **2.2.3. A quantificação do DNA amplificado**

Os produtos das PCR foram quantificados, por comparação visual, com um marcador de baixo peso molecular (“Low DNA Mass Ladder”, Invitrogen).

### **2.2.4. Purificação enzimática**

Foi feita mediante a utilização das enzimas Exonuclease I (EXO, Amersham Biosciences, e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Amersham Biosciences). O protocolo consistiu em misturar 0,33 µl de EXO, 0,33 µl de SAP, 0,34 µl de água e 6 µl de produto do PCR. A seguir a mistura foi colocada no termociclador com o seguinte programa: 30 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C.

### **2.2.5. Seqüenciamento**

O seqüenciamento foi feito de forma automática utilizando um seqüenciador MEGABASE 1000.

Protocolo de seqüenciamento:

1. Utilizou-se entre 30 e 50 ng de DNA (volume calculado de acordo com o resultado da quantificação do PCR);
2. A seguir adicionou-se os “primers” de seqüenciamento MVZ 5, MVZ 16 e MVZ 14 numa concentração final variando entre 2 e 5  $\mu$ M mais água bidestilada até que o volume total de 6  $\mu$ l fosse atingido;
3. Após adicionou-se a solução de pré-mix (ddNTPs marcados, dNTPs normais, *polimerase*, tampão) num volume de 4  $\mu$ l;
4. Esta mistura foi submetida, no termociclador, à seguinte reação: 1) 95°C, 20 seg; 2) 50°C, 15 seg; 3) 60°C, 1 min; 4) repetir 34 vezes as etapas 1, 2 e 3; 5) manter em 4° C até o final;
5. Foi feita uma segunda purificação enzimática para eliminar os ddNTPs marcados não incorporados e, depois, colocada num seqüenciador MEGABASE 1000.

## 2.2.6. ANÁLISE DOS DADOS

As seqüências obtidas foram lidas utilizando-se o programa Chromas 1.45, os cromatogramas resultantes foram analisados no programa CONSED (sistema operacional Linux), alinhados com o Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) e revisados manualmente com o auxílio do programa BIOEDIT (Hall *et al.*, 1999).

Para as comparações intraespecíficas e intrapopulacionais foram utilizadas as distâncias de Kimura dois parâmetros (K2p) e Tamura-Nei (T-N) com correção gama, que é a distância mais semelhante ao modelo selecionado pelo MODELTEST. O erro padrão da distância e da diversidade nucleotídica foi estimado utilizando 500 replicações de bootstrap no MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Foi também utilizado o método de árvore de haplótipos Median-joining com programa Network para obter as relações filogenéticas dos espécimes dos locais amostrados. As relações entre as linhagens obtidas foram avaliadas pelos

métodos de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), pelo emprego do programa Paup 4.01.

Todas as seqüências de outras espécies utilizadas como grupos externos foram obtidas do GenBank (*Akodon boliviensis*, M35691; *Thaptomys nigrita*, AF108666; *Bolomys lasiurus*, U03528; *Oxymycterus josei*, AF175289).

A ocorrência de possíveis correlações entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas foi avaliada pelo teste de Mantel, empregando o programa NTSYS-pc 1.80 (Rohlf. 1993).

Na calibração do relógio molecular foram usadas três estimativas:

1<sup>a</sup> - *taxa de transversões*: tomando como base dados de um conjunto de táxons de mamíferos (ungulados principalmente), Irwin *et al.* (1991), calcularam uma taxa de 0,5 % de transversões na terceira posição do códon por MA (milhões de anos).

2<sup>a</sup> - *registro fóssil*: baseada na separação *Mus/Rattus* com registro fóssil de 10 MA (Ruedas & Kirsch, 1997) - a análise de uma seqüência de 801 pb do citocromo *b* permitiu identificar 45 transversões em 267 terceiras posições de bases, correspondendo a 16,85 % de diferenças em 10 milhões de anos ou 1,7 % por milhão de ano;

3<sup>a</sup> - *registro fóssil*: estimativa específica para Sigmodontinae e que utiliza a data de divergência entre dois gêneros akodontinos, *Akodon* e *Bolomys*, registrada como sendo de 3,55 MA por Reig (1987) – indica um tempo de divergência entre os gêneros das tribos de 1-3 MA, dentro das tribos de Sigmodontinae de 5-6 MA e entre as tribos como sendo de 7 MA. Essa informação permitiu a Smith & Patton (1993) estimar que, nesta subfamília, as transversões na terceira posição do códon ocorreriam numa taxa de 2,3 % por milhão de anos.

# **3. Resultados**

### 3. Resultados

#### 3.1. A seqüência do gene citocromo *b* obtida

Foram obtidas 733 pb da seqüência do citocromo *b* de 26 espécimes de *D. kempfi* provenientes de seis localidades. Este fragmento, segundo o alinhamento com *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* (NC\_001665), começa na posição 67 e vai até a posição 799 (do total dos 1.141 pb que constituem a seqüência inteira do gene) e apresentou oito haplótipos diferentes. Difere de *Mus* em 142 bases (aproximadamente 19,4%) e 148 bases (cerca de 20,2%) com referência a *Rattus*.

#### 3.2. Composição de bases

Na Tabela 8 encontram-se as freqüências em que foram observadas em *D.kempfi* as bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C), respectivamente, na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> posição. Observa-se que, tanto no caso de todas as posições dos códons ( $\chi^2 = 53,53$ ; GL= 3;  $p > 0,001$ ), como na segunda ( $\chi^2 = 36,39$ ; GL= 3;  $0,01 < p < 0,001$ ) e, especialmente, na terceira posição ( $\chi^2 = 88,66$ ; GL= 3;  $p > 0,001$ ) ocorreram desvios nas distribuições destas freqüências. A única posição em que as quatro bases incidiram com freqüências iguais, foi na primeira ( $\chi^2 = 0,77$ ; GL= 3). Estes desvios significantes parecem ser devidos, principalmente, a uma deficiência de guanina na segunda e, mais evidentemente, na terceira posição.

**Tabela 8. Composição de bases de *D. kempfi* em 733 pb do citocromo *b* discriminando ou não as posições dos codons.**

	G %	A %	C %	T %	Total	Total de bases
Média <i>D.kempfi</i>	13,3	28,9	28,7	29,1	100 %	733
Primeira posição (P1)	24,1	26,6	23,2	26,1	100 %	245
Segunda posição (P2)	13,9	19,7	26,6	39,8	100 %	244
Terceira posição (P3)	1,9	40,4	36,2	21,5	100 %	244

### 3.3. Variação na seqüência

Do conjunto de 26 espécimes de *D. kempfi* e 733 pb em comum utilizados, 712 resultaram conservados, 21 foram sítios variáveis e 12 foram informativos para a análise de parcimônia (Tabela 9). Quatro (19%) dos nucleotídeos variáveis apresentaram-se na primeira posição do códon, um (4,8%) na segunda posição e 16 (76,2%) mostraram-se variáveis na terceira posição.

**Tabela 9. Posição dos sítios variáveis na seqüência de 733 pb do citocromo *b* de 26 espécimes de *D. kempfi*. A primeira coluna refere-se à denominação dos haplótipos, sendo as três primeiras letras do nome indicativas da localidade.**

Haplótipos	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6	6	6	7	7	7	7
	0	2	2	5	9	0	3	3	0	3	3	5	8	1	4	4	7	1	1	2	3
	8	3	8	6	5	0	0	9	8	5	1	2	2	8	3	7	5	1	2	3	2
TAI3	C	C	A	G	C	T	T	G	C	G	C	C	C	C	A	T	A	A	A	C	A
TAI2		T							T					T	C					T	
CHA1			G			C		A	T						C		T	T	T	T	
TRA1			G			C		A			T	T	T		T	C	T			T	T
OSO			G	A	T	C		A			T	T	T		T	C	T			T	T
TRA/TOR						C		A			T	T	T		T	C	T			T	T
TAI1			G			C		A			T	T	T		C						T
TAP	T					C	C	A		A	T		T		T	C		T		T	T
Posição	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>								

\* Posições em negrito foram informativas para a análise de parcimônia; TRA/TOR refere-se ao haplótipo compartilhado entre Tramandaí e Torres.

Dos sítios informativos para a análise de parcimônia, um (8,4%) ocorreu na primeira posição e 11 (91,6%) na terceira. Como esperado pela degeneração do código genético, a maior parte dos sítios variáveis e dos sítios informativos para parcimônia foi na terceira posição (Tabela 9).

Dos 21 sítios variáveis observados, 16 (76,2%) foram transições (TS) e cinco (23,8%) transversões (TV) (Tabela 10).

Das transições, 14 (87,5%) apresentaram-se como silenciosas, sem gerar mudanças nas seqüências de aminoácidos, e duas (12,5%) foram não

silenciosas, mudando o aminoácido codificado por esse códon. Das silenciosas, uma (7,14%) ocorreu na primeira posição do códon e 13 (92,9%) na terceira posição. Das duas mutações não silenciosas, uma (50%) ocorreu na primeira posição do códon e outra na segunda posição (Tabela 10).

Das cinco transversões identificadas, 60% foram silenciosas e localizaram-se na terceira posição do códon e 40% foram não silenciosas e na primeira posição do códon.

**Tabela 10. Relação das transições (TS) e transversões (TV) silenciosas ou não silenciosas observadas nos 21 sítios variáveis dos 733 pb do citocromo *b* seqüenciados em *D. kempfi*.**

Códon	Base	1 <sup>a</sup> posição	2 <sup>a</sup> posição	3 <sup>a</sup> posição	Total
TS	Silenciosa	1	0	13	14
	Não silenciosa	1	1	0	2
TV	Silenciosa	0	0	3	3
	Não silenciosa	2	0	0	2
Razão TS/TV		1	0	4,3	3,2

Os diferentes haplótipos observados na amostra apresentaram uma distribuição exclusiva do local, pois aqueles encontrados num dado local de coleta, em geral, não ocorreram nos outros locais. Torres foi a exceção, já que o haplótipo do único espécime investigado na localidade também estava presente em Tramandaí. Na Tabela 11 apresentam-se os haplótipos de acordo com os locais analisados.

**Tabela 11. Lista dos haplótipos (primeira coluna) observados nos 26 espécimes nas seis localidades investigadas.**

Haplótipos	Tramandaí (N=18)	Torres (N=1)	Osório (N=1)	Tapes (N=1)	Charqueadas (N=3)	Taim (N=3)
TAI3	-	-	-	-	-	1
TAI2	-	-	-	-	-	1
CHA1	-	-	-	-	2	-
TRA8	6	-	-	-	-	-
OSO	-	-	1	-	-	-
TRA/TOR	12	1	-	-	-	-
TAI1	-	-	-	-	-	1
TAP	-	-	-	1	-	-

### 3.4. Tradução da seqüência

Para determinar a fase de leitura das seqüências observadas, estas foram alinhadas com a seqüência do citocromo *b* de *Mus musculus*. A seguir, foi traduzida, tendo produzido um fragmento de 244 aminoácidos. A composição, em média, do fragmento foi a seguinte: alanina 6,56%, cisteína 1,23%, aspartato 3,69%, glutamato 1,23%, fenilalanina 8,20%, glicina 7,79%, histidina 3,28%, isoleucina 9,46%, lisina 1,23%, leucina 14,68%, metionina 2,54%, aspargina 5,30%, prolina 4,92%, glutamina 0,82%, arginina 1,64%, serina 6,97%, treonina 8,18%, valina 4,90%, triptofano 3,28% e tirosina 4,13%.

A seqüência de 244 aminoácidos gerada pela tradução do fragmento de 733 nucleotídeos apresentou mudanças que reduziram o número de sítios variáveis de 21 para quatro. Como conseqüência, reduziram-se também para cinco os oito haplótipos nucleotídicos (Tabela 12).

**Tabela 12. Localização da variabilidade aminoacídica dentro dos Haplótipos nucleotídicos e sua distribuição por local de coleta - relação de haplótipos, aminoácidos e ocorrência.**

<i>Haplótipos</i>	8 6	2 1	2 1	2 3	Tramandaí (N=18)	Torres (N=1)	Osório (N=1)	Tapes (N=1)	Charqueadas (N=2)	Taim (N=3)
TAI3	V	M	I	N	-	-	-	-	-	1
OSO	I	L	T		-	-	1	-	-	-
CHA1			T	Y	-	-	-	-	2	-
TRA8		L	T		6	-	-	-	-	-
TAP		L	T		-	-	-	1	-	-
TRATOR		L	T		12	1	-	-	-	-
TAI1			T		-	-	-	-	-	1
TAI2			T		-	-	-	-	-	1

### 3. 5. Distâncias genéticas

A distância genética, analisando a amostra como um todo mediante o modelo Kimura dois parâmetros, foi de 0,00519 com desvio padrão (dp, calculado a partir do bootstrap) de 0,00145, variando entre 0,0000 e 0,01941. Também foi calculada utilizando-se o modelo de Tamura-Nei (com uma distribuição gama igual a 0,42) que gerou uma distância genética de 0,00538 (dp = 0,00146, 500 replicações).

Na Tabela 13.a., são apresentadas as distâncias genéticas observadas entre os oitos haplótipos calculadas de acordo com o modelo de Kimura dois parâmetros. Em 13.b., as mesmas análises efetuadas pelo modelo Tamura-Nei (gama = 0,42) mostraram resultados similares.

**Tabela 13.a. Matriz das distâncias genéticas entre os haplótipos de acordo com o modelo de Kimura dois parâmetros (diagonal inferior). Entre colchetes os desvios padrões.**

	TAI3	TAI2	CHA1	TRA8	OSO	TRA/TOR	TAI1	TAP
TAI3		[0,0031]	[0,0042]	[0,0047]	[0,0051]	[0,0045]	[0,0040]	[0,0049]
TAI2	0,0069		[0,0037]	[0,0050]	[0,0054]	[0,0048]	[0,0047]	[0,0052]
CHA1	0,0124	0,0110		[0,0038]	[0,0043]	[0,0041]	[0,0037]	[0,0041]
TRA/TOR	0,0152	0,0166	0,0110		[0,0018]	[0,0014]	[0,0024]	[0,0034]
OSO	0,0180	0,0194	0,0138	0,0027		[0,0023]	[0,0030]	[0,0039]
TRA8	0,0138	0,0152	0,0124	0,0014	0,0041		[0,0027]	[0,0031]
TAI1	0,0110	0,0152	0,0096	0,0041	0,0069	0,0055		[0,0038]
TAP	0,0166	0,0180	0,0124	0,0096	0,0124	0,0082	0,0110	

**13.b. Matriz das distâncias genéticas entre os haplótipos de acordo com o modelo de Tamura-Nei (gama = 0,42; diagonal inferior). Entre colchetes os desvios padrões.**

	TAI3	TAI2	CHA1	TRA8	OSO	TRA/TOR	TAI1	TAP
TAI3		[0,0032]	[0,0044]	[0,0051]	[0,0056]	[0,0048]	[0,0042]	[0,0052]
TAI2	0,0071		[0,0044]	[0,0054]	[0,0059]	[0,0052]	[0,0050]	[0,0056]
CHA1	0,0127	0,0112		[0,0042]	[0,0047]	[0,0045]	[0,0038]	[0,0044]
TRA8	0,0157	0,0172	0,0113		[0,0018]	[0,0014]	[0,0024]	[0,0037]
OSO	0,0187	0,0203	0,0142	0,0028		[0,0024]	[0,0031]	[0,0043]
TRA/TOR	0,0142	0,0158	0,0127	0,0014	0,0042		[0,0028]	[0,0034]
TAI1	0,0113	0,0159	0,0099	0,0041	0,0069	0,0055		[0,0041]
TAP	0,0172	0,0188	0,0127	0,0098	0,0127	0,0084	0,0113	

A distância genética média dentro da população de Tramandaí, n=16, foi de 0,0007 (dp=0,0006, 500 replicações), dentro da população de Taim, n=3, foi de 0,0114 (dp=0,0035, 500 replicações). Os dois indivíduos de Charqueadas apresentaram o mesmo haplótipo e as demais localidades, por serem representadas por um único exemplar, não foram incluídas nos cálculos.

Na Tabela 14 é apresentada uma matriz com os valores das distâncias genéticas entre as localidades.

**Tabela 14. Matriz das distâncias genéticas do citocromo *b* entre as diferentes localidades de *D. kempí* (diagonal inferior). Entre colchetes os desvios padrões.**

	Taim	Tramandaí	Torres	Osório	Tapes	Charqueadas
Taim		[0,0032]	[0,0032]	[0,0038]	[0,0038]	[0,0031]
Tramandaí	0,0118		[0,0005]	[0,0020]	[0,0034]	[0,0035]
Torres	0,0120	0,0005		[0,0020]	[0,0035]	[0,0035]
Osório	0,0148	0,0032	0,0027		[0,0040]	[0,0038]
Tapes	0,0152	0,0092	0,0096	0,0124		[0,0040]
Charqueadas	0,0110	0,0115	0,0110	0,0138	0,0124	

A hipótese de que as distâncias genéticas estivessem correlacionadas com as distâncias geográficas foi testada, considerando todos os indivíduos da amostra, pelo teste de Mantel que gerou um coeficiente de correlação de matrizes ( $r$ ) de 0.43214 ( $p = 0.0002$ ), mostrando existir uma baixa correlação entre estes dois fatores (Figura 5).

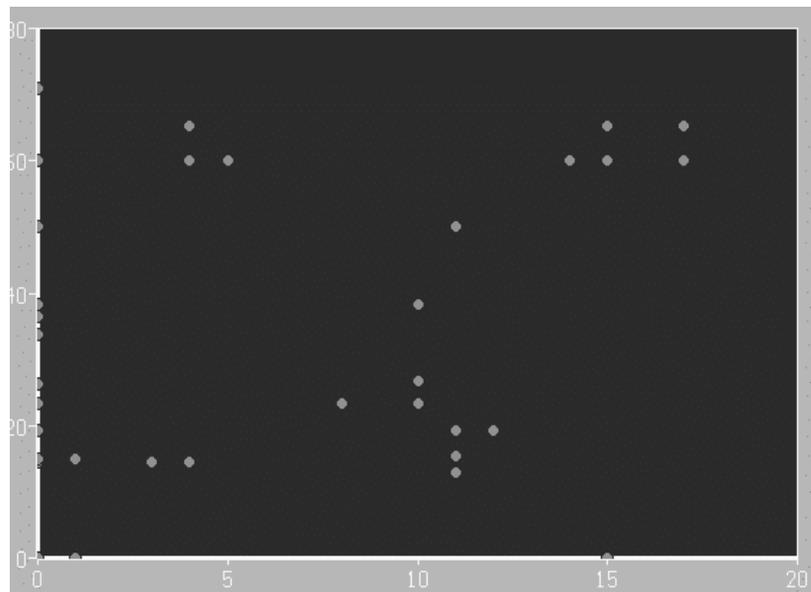


Figura 5: Gráfico do teste de Mantel correlacionando as distâncias genéticas e as distâncias geográficas dos 26 espécimes de *D. kempí* seqüenciados,  $r = 0.43214$  ( $p = 0.0002$ ).

### 3.6. Relações entre os haplótipos de *D. kempfi*

As análises para indicar o melhor modelo evolutivo ao qual se adaptam nossos dados foram feitas pelo MODELTEST. O programa avaliou 56 modelos evolutivos e escolheu, para as 26 amostras de *D. kempfi* seqüenciadas, o modelo K81uf + I + G (que é o modelo Kimura três parâmetros com taxa de transição/transversão diferente, freqüência desigual de bases, distribuição gama, G, que considera diferentes taxas de substituição para os diferentes sítios e proporção de sítios invariáveis, I); o mais semelhante que permite utilizar o programa MEGA é o modelo de Tamura-Nei, (T-N). Assim, de acordo com o mesmo, as relações filogenéticas entre os diferentes haplótipos de *D. kempfi*, foram analisadas utilizando-se os métodos de Neighbor-Joining (N-J, K2p e T-N), Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV). Nas análises foram considerados todos os sítios devido aos baixos valores de distância entre as seqüências.

Foram efetuadas todas as análises relacionadas acima, obtendo-se agrupamentos muitos similares entre as mesmas, salvo algumas variações nas topologias das árvores. Optou-se, então, por apresentar neste capítulo aqueles obtidos por Neighbor-Joining, estando os demais mostrados no Apêndice I.

Nesta e em todas as demais análises utilizou-se quatro grupos externos (vide Material e Métodos). Na Figura 6 nota-se que, de forma geral, todos os indivíduos da espécie *D. kempfi* formaram um único grupo (100 bootstrap) e que, por sua vez, os espécimes agruparam-se de acordo com suas localidades de origem. Deste modo, a topologia da árvore obtida mostra um único clado dentro do qual os exemplares (com exceção de um espécime) foram se agrupando, por localidade, na seqüência Taim↔Charqueada↔Tapes↔Tramandaí/Osório/Torres. Pode ser observado na Figura 6 que dois dos indivíduos de Taim (possuidores dos haplótipos TAI2 e TAI3) localizam-se como mais externos, seguidos pelos dois espécimes de Charqueadas (ambos com o haplótipo CHA1). O indivíduo de Tapes (que tem o haplótipo exclusivo TAP) encontra-se a seguir. Nesta e em todas as demais árvores (no Apêndice I) o terceiro indivíduo de Taim (TAI1) coloca-se entre Tapes e o clado que vem logo a seguir, formado por indivíduos de Tramandaí/Osório/Torres. Este clado é subdividido em dois grupos: um deles

contém seis indivíduos de Tramandaí (todos com o haplótipo TRA8) e outro formado por 12 indivíduos de Tramandaí (todos portadores do haplótipo TRA/TOR), mais um exemplar de Torres (também apresentando o haplótipo TRA/TOR) e rato de Osório (com o haplótipo OSO que corresponde a duas mudanças nucleotídicas com respeito ao haplótipo TRA/TOR).

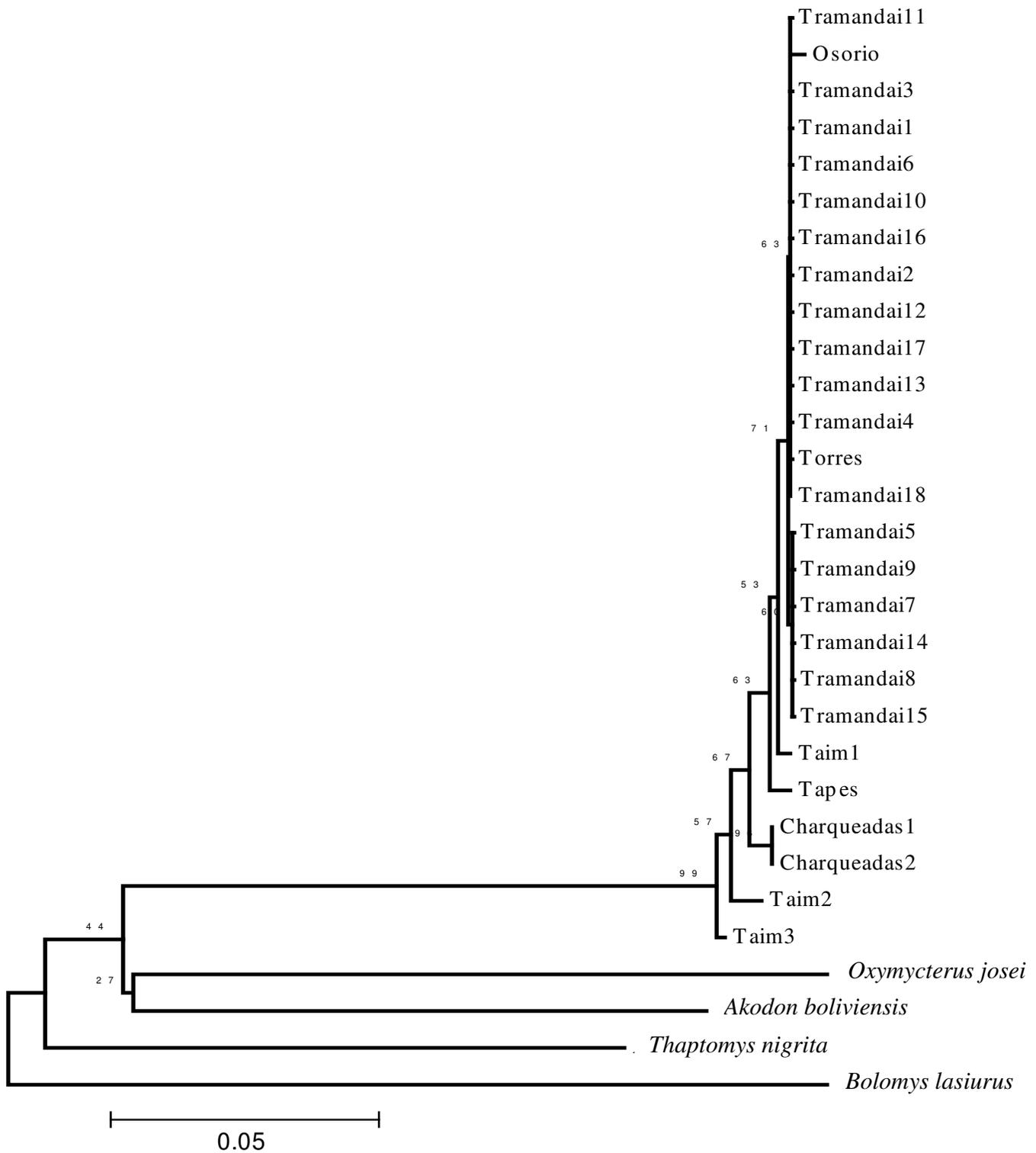


Figura 6: Árvore de Neighbor-Joining (N-J) obtida pelo método de Tamura-Nei gama 0,42 dos utilizando os 733 pb do citocromo *b* de 26 espécimes de *D. kempii*.

### 3.7. Tempos de divergência

Tomando como base três diferentes calibrações do relógio molecular (como descrito em Materiais e Métodos), foram estimados os tempos de divergência entre os oito haplótipos encontrados nos 26 indivíduos da amostra (Tabela 15). De acordo com estas calibrações, observou-se que estes haplótipos divergiram num tempo mínimo de cerca de 180 mil anos até 800 mil anos atrás.

**Tabela 15. Estimativas dos tempos de divergência encontrados em *D. kempfi* a partir de 26 espécimes investigados para uma região de 733 pb do gene citocromo *b*.**

Calibração	Taxa de 0,5%/ MA (Irwin <i>et al.</i> , 1991)	Taxa de 1,7%/MA (Reig, 1987)	Taxa de 2,3%/MA (Smith & Patton, 1993)
<i>D. kempfi</i>	0,8185 MA	0,2407 MA	0,1779 MA

MA = milhões de anos

Dentro da tribo Akodontini foram consideradas as distâncias que ocorrem dentro de cada gênero e, usando como calibração o registro fóssil, que indica 3,55 MA de separação entre gênero *Bolomys* do gênero *Akodon*, foi estimado que *Deltamys* divergiu dos demais gêneros da tribo há 3,35 MA.

### 3.8. O status de *Deltamys* como gênero

As seqüências do citocromo *b* que observamos em *Deltamys* foram comparadas com as demais seqüências do mesmo gene observadas em outros gêneros da tribo Akodontini (depositadas no GenBank, números de acesso no apêndice II), gerando a árvore abaixo (método Neighbor-Joining, modelo Kimura dois parâmetros, Figura 7):

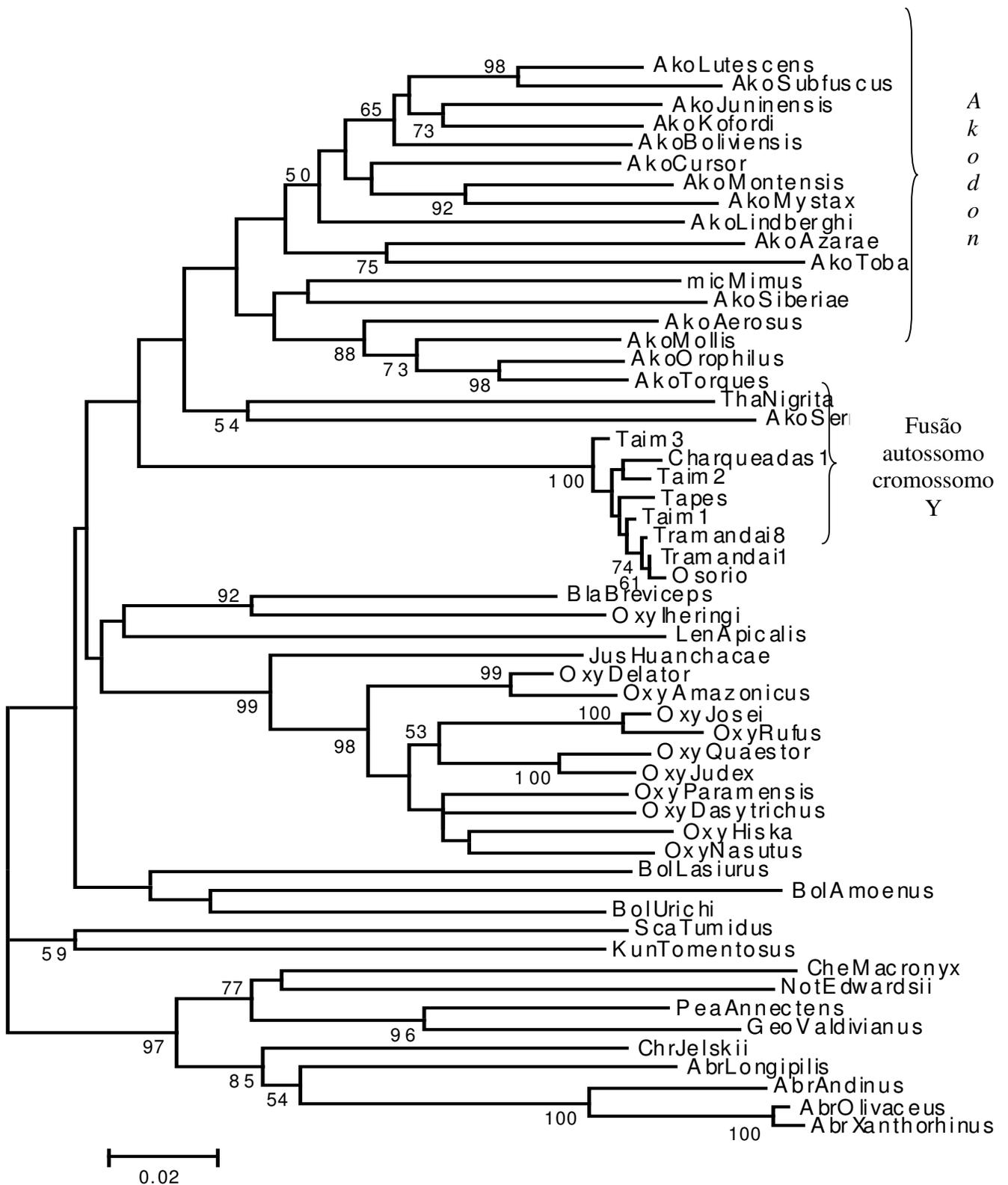


Figura 7: Árvore de Neighbor-Joining pelo método de Kimura dois parâmetros utilizando um exemplar de cada espécie da tribo Akodontini (nomes por extenso e número no GenBank ver apêndice II), que apresentam uma seqüência de 733 pb do citocromo b, e os oito haplótipos de *D. kempii*.

Na filogenia da tribo Akodontini acima, com referência ao gênero *Deltamys*, observou-se, em primeiro lugar, que todos os indivíduos constituíram um único grupo (100 bootstrap), com nenhum deles alocando-se dentro ou próximo ao gênero *Akodon*, ao qual previamente foram proposto pertencer (Ellerman, 1941; Cabrera, 1961; Massoia, 1964; Reig, 1981). Estes mesmos achados foram observados em outras análises feitas (MP e MV), não apresentadas.

## **4. Discussão**

## 4. Discussão

*Deltamys kempi* é um roedor de distribuição restrita e rara ocorrência tendo, até a década de 80, sido descrito apenas no delta do Rio da Prata e em algumas localidades argentinas adjacentes (Bianchini & Delupi, 1994). Há alguns anos atrás foi encontrado no Brasil (Sbalqueiro *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 1991), na Planície Costeira do Estado do Rio Grande do Sul. Nesta região habita um faixa de cerca de 400 km de extensão, de Torres ao Taim, aparentemente pela margem esquerda da Lagoa dos Patos, pois foi observado em Tapes, Charqueadas e Porto Alegre.

*D. kempi* caracteriza-se por ser portador de dois eventos cromossômicos que o tornam um modelo único entre os mamíferos: devido a ocorrência de uma fusão cêntrica entre o cromossomo Y e um autossomo (Y/A) apresenta um sistema cromossômico múltiplo de determinação do sexo do tipo ♀,38,X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂,37,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y; e, juntamente com este sistema de fusão, foram encontradas numa localidade da Argentina e em três do Brasil (Taim, Tramandaí e Tapes) quatro fusões autossômicas distintas e próprias de cada um destes locais.

A raridade deste modelo biológico motivou o presente estudo que visou, através das análises da seqüência do gene mitocondrial citocromo *b* de populações da Planície Costeira do Rio Grande do Sul desta espécie, investigar se ocorriam diferenças nestas seqüências entre os indivíduos procedentes de seis localidades desta região. Estávamos também interessados em verificar se os conjuntos de espécimes agrupados pelos cariótipos correspondiam aos mesmos conjuntos quando agrupados pelas seqüências de DNA mitocondrial, já que os rearranjos cromossômicos observados nesta espécie eram próprios de cada local. Tentamos estimar os tempos de divergência entre os haplótipos que foram encontrados e, também, esclarecer se *Deltamys* é um gênero pleno ou se é um subgênero de *Akodon*.

#### 4.1. Características da seqüência do gene citocromo *b* analisada em *D. kemp*

Em 26 espécimes de seis localidades da Planície Costeira foram seqüenciadas 733 pb do gene citocromo *b*, sendo o fragmento obtido analisado abordando diferentes aspectos. Uma primeira análise consistiu em calcular a diferente composição de bases nitrogenada no fragmento como um todo e nas diferentes posições dos códons, na busca de possíveis desvios. Encontramos que, quando não se leva em conta as diferentes posições dos códons, o conteúdo de G é significativamente menor do que o esperado, sendo que essa diminuição se produz na segunda posição mas, principalmente, na terceira posição dos códons. Estes resultados estão de acordo com os já publicados na literatura, como pode ser visto na Tabela 16.

**Tabela 16. Conteúdo de G no citocromo *b* de acordo com as diferentes posições do códon em diferentes táxons de roedores relatados na literatura.**

Autores	Táxon	Seqüência	Conteúdo de G	G: 1a posição	G: 2a posição	G: 3a posição
Salazar-Bravo et al., 2001	10 espécies do gênero <i>Calomys</i> (Sigmodontinae)	1140 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Montgelard et al., 2002	11 famílias da subordem Sciurognathi	1140 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Ducroz et al., 1998	gênero <i>Arvicanthis</i> (Muridae)	1140 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Barome et al., 1998	gênero <i>Acomys</i> (Sigmodontinae)	1141 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Martin et al., 2000	subfamílias Murinae, Arvicolinae e Gerbillinae (Muridae)	1143 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Smith & Patton, 1993	Akodontini, Sigmodontinae,	801 pb	Baixo	Normal	Baixo	Muito baixo
Corroy & Cook, 1999	Muridae	1143 pb	Baixo			Muito baixo

Os valores para a seqüência de 733 pb do citocromo *b* de *D. kemp* foram 13,3% (significativamente baixo) para o conteúdo em geral, 24,1% (desvio não significativo) para a primeira posição, 13,9% (significativamente baixo) para a segunda posição e 1,9% (significativamente baixo) para a terceira posição.

Observou-se que as outras três bases (T, C e A) apresentaram, tanto em *D. kempfi* como na literatura, uma distribuição homogênea. Na terceira posição do códon a diminuição de G foi acompanhada por um aumento de A (principalmente) e C. Barome *et al.* (1998), Ducroz *et al.* (1998), Martin *et al.* (2000), Salazar-Bravo *et al.* (2001) e Montgelard *et al.* (2002), investigando a seqüência do citocromo *b* de diferentes táxons de roedores, encontraram que a terceira posição era também rica em adenina seguida por citosina. Smith & Patton (1993), analisando o citocromo *b* de akodontinos, observaram o contrário: na terceira posição era mais abundante a citosina do que a adenina.

A seqüência de 733 pb que analisamos em *D. kempfi* apresentou 2,86 % de sítios variáveis e 1,77% dos sítios foram informativos para parcimônia. Da comparação dos nossos dados com os da Tabela 17 fica claro que, no geral, esta variação é baixa.

**Tabela 17. Quantidade de sítios variáveis (SV) e sítios informativos para parcimônia (SIP) no gene citocromo *b* de diferentes táxons de roedores descritos na literatura. Entre parêntesis os percentagens.**

Autores	Táxon	Tamanho da Seqüência	SV (%)	SIP(%)
Smith & Patton, 1993	Akodontini	801 pb	379 (47,32)	343 (42,82)
Smith & Patton, 1999	Sigmodontinae	1140 pb	615 (53,95)	556 (48,77)
Salazar-Bravo <i>et al.</i> , 2001	<i>Calomys</i>	1140 pb		401 (35,18)
Barome <i>et al.</i> , 1998	<i>Acomys</i>	1140 pb	425 (37,28)	343 (30,08)
Martin <i>et al.</i> , 2000	Murinae, Arvicolinae e Gerbillinae	1140 pb	512 (44,91)	416 (36,49)
Catanesi <i>et al.</i> , 2002	<i>Graomys griseoflavus</i>	379 pb	48 (12,66)	
Conrad <i>et al.</i> , 1997	<i>Pedetes capensis (Rodentia)</i>	714 pb		284 (39,79)
Sullivan <i>et al.</i> , 1995	<i>Peromyscus, Onychomys e Neotoma</i>	350 pb	96 (27,4)	61 (17,4)
Hoffmann <i>et al.</i> , 2002	<i>Oxymycterus</i> (Sigmodontinae)	1137 pb	392 (34,5)	292 (25,7)
Demastes <i>et al.</i> , 2002	<i>Cratogeomys e Pappogeomys</i>	1133 pb		364 (32,1)
Michaux <i>et al.</i> , 2002	<i>Apodemus</i>	971 pb	298 37 %	215 (26)
Smith & Patton, 1991	Akodontini	401 pb	161 (41)	120 (29,9)
Neste trabalho	<i>D. kempfi</i>	733 pb	21 (2,9)	12 (1,6)

Encontramos que grande parte da variação (21 sítios variáveis em 733 pb) ocorreu na terceira (76,2 %) e primeira (19 %) posições do códon; a segunda posição do códon mostrou-se a mais conservada, com apenas 4,8 % dos sítios variáveis localizados nesta posição. Estes dados estão de acordo com os relatados na literatura, como pode ser visto na Tabela 18.

**Tabela 18. Número de sítios variáveis e freqüência em cada posição dos códons em diferentes táxons de roedores relatados na literatura.**

Autor	Taxon	N	Citocromo <i>b</i>	Sítios variáveis	Primeira posição	Segunda posição	Terceira posição
Barome <i>et al.</i> , 1998	<i>Acomys</i>	19	1141 pb	425	92 21,7 %	29 6,8 %	304 71,5 %
Martin <i>et al.</i> , 1999	Murinae, Arvicolinae e Gerbillinae	15	1144 1143	512	123 24 %	39 8 %	350 68 %
Catanesi <i>et al.</i> , 2002	<i>Graomys griseoflavus</i>	19	379	48	9 18,75%	3 6,25%	36 75%
Hoffmann <i>et al.</i> , 2002	<i>Oxymycteru s</i>	20	1137	392	62 15,8%	29 7,4%	301 76,8%
Conrad <i>et al.</i> , 1997	<i>Pedetes capensis</i>	8	714	284	62 21,8 %	23 8,1 %	199 70,1 %
Smith & Patton, 1991	Akodontini	20	401	161	37 23 %	10 6,2 %	114 70,8 %

N = número de indivíduos analisados

Os 26 indivíduos pesquisados neste trabalho apresentaram 16 transições e cinco transversões, isto produziu uma taxa de transições/transversões (Ts/Tv) de 3,2. Na literatura (Tabela 19) encontraram-se valores de Ts/Tv maiores e menores .que o nosso. Observou-se, no gráfico bidimensional, que nossa seqüência não se encontrou na região de saturação das transições, principalmente na terceira posição do códon que é o local onde majoritariamente ocorrem.

**Tabela 19. Número de transições (Ts) e transversões (Tv) em diferentes táxons de roedores relatados na literatura.**

Autor	Taxon	N	Citocromo <i>b</i>	Ts	Tv	Ts/Tv	Nível
Ducroz <i>et al.</i> , 1998	<i>Arvicanthis</i>	20	1140			1:7 a 1:20	Intra-específico
Michaux <i>et al.</i> , 2002	<i>Apodemus</i>	24	971			1,79	Intra-genérico
Smith & Patton, 1991	<i>Akodon</i>	12	401	39,65	5,15	7,7	Dentro do gênero <i>Akodon</i>
				*	*	*	Entre os subgêneros <i>Akodon</i> e <i>Microxus</i>
				39,44	4,93	8	Entre <i>Akodon</i> e <i>Microxus</i> versus <i>Bolomys</i> (gênero)
				*	*	*	<i>Chroeomys</i> (gênero) versus <i>Akodon</i> , <i>Microxus</i> e <i>Bolomys</i>
				41,71	10,56	3,95	<i>Mus</i> versus <i>Akodontini</i>
				45,25	30,37	1,49	
				*	*	*	
				53,31	41,65	1,28	
				*	*	*	
Catanesi <i>et al.</i> , 2002	<i>Graomys griseoflavus</i>	19	379	40	8	5	Intra-específico

\* média, N = número de indivíduos analisados.

A tradução da seqüência que obtivemos em *Deltamys* gerou, como resultado, um fragmento de 244 aminoácidos, apresentando quatro diferenças na seqüência. Já o gênero *Akodon* apresentou no mesmo fragmento 27 diferenças na seqüência de aminoácidos (17 espécies comparadas); *Bolomys* mostrou 13 (três espécies comparadas) e *Oxymycterus* apresentou 10 aminoácidos diferentes na comparação entre dez espécies. Isto mostra que o nível de variação na seqüência de aminoácidos é muito baixa no gênero *Deltamys*, mesmo quando se comparam com outros valores intra-específicos.

#### 4.2. Os haplótipos de *D. kempfi*

Na tentativa de responder nosso primeiro objetivo – ocorrência ou não de variabilidade na seqüência do citocromo *b* de *D. kempfi* entre as seis localidades investigadas - a resposta foi afirmativa, já que foram encontrados oito haplótipos, dos quais só um deles ocorreu em mais de um local (haplótipo TRA/TOR, presente em Tramandaí em alta freqüência, cerca de 67 %, e no único indivíduo estudado em Torres).

Com referência ao objetivo - verificar se os conjuntos de espécimes agrupados pelos cariótipos correspondem aos mesmos conjuntos quando agrupados pelas seqüências de DNA mitocondrial, já que os rearranjos cromossômicos observados nesta espécie são próprios de cada local – parece não ser este o fato, pois observou-se, especificamente em Tramandai onde ocorreram dois haplótipos, que estes estão distribuídos em todos os cariótipos; homo e heterozigotos t(9;15). Não se pode eliminar o fato, no entanto, que com nossa amostra tanto os cariótipos como os haplótipos são locais/restritos. Teoricamente, com referência aos cariótipos é provável que atuem como barreiras reprodutivas, por incompatibilidades meióticas originadas pela ocorrência simultânea de vários trivalentes. Fica por esclarecer, no entanto, se a prevalência preferencial por local também observada nos haplótipos é decorrente das possíveis barreiras cromossômicas ou é apenas uma coincidência da história biogeográfica.

As distâncias genéticas foram calculadas por dois modelos distintos: pelo modelo de Kimura dois parâmetros (K2p), como comumente aparece na bibliografia, e de acordo com os resultados da análise que fizemos com o programa Modeltest que indicou aos nossos dados o emprego do modelo Tamura-Nei com correção gama (T-N + G). No entanto, a diferença entre os valores obtidos pelos dois modelos, não foi muito grande.

O conjunto de 26 espécimes gerou uma distância genética de cerca 0,5% (K2p, (T-N + G)). Se este valor representar a distância genética dentro de toda espécie *Deltamys* podemos observar que é um valor muito baixo, superando apenas aos akodontinos a *Oxymycterus josei* e *O. judex* (variabilidade intra-específica igual a zero), como pode ser visto na tabela 4.5.

Comparando os diferentes haplótipos, a menor distância genética foi observada entre os dois haplótipos de Tramandaí (0,14 %) produto de uma transição na terceira posição do códon (posição 228), que gerou uma mudança informativa para a parcimônia, mas não mudou o aminoácido. A maior distância genética, quase 2 %, foi entre os haplótipos TAI2 (de Taim) e OSO (Osório) que diferenciam-se em 14 mudanças (nove transições na terceira posição do códon que não geraram modificações na seqüência de aminoácidos: 123, 228, 300, 339, 408, 531, 552, 582 e 618; duas transições na primeira posição do códon, das quais uma gerou uma mudança de aminoácido: 256 e 295; duas transversões na terceira posição, das quais uma gerou uma mudança de aminoácido: 675 e 732; e uma transversão na primeira posição do códon que não mudou o aminoácido: 643).

Na localidade de Tramandaí, N=16, ocorreram dois haplótipos com distância genética de 0,07 %; embora seja um valor muito baixo não ultrapassou a amplitude de valores relatadas por Smith & Patton (1991; 1993; 1999), Tabela 20, em outros sigmodontinos. No caso da localidade de Taim observou-se uma distância genética de 1,14 %, que encontra-se dentro dos valores já descritos (Smith e Patton, 1991; 1993 e 1999), mas muito perto do limite superior destes valores. Mostra-se com clareza a diferença entre os valores obtidos dentro de Tramandaí e de Taim.

Considerando cada local de coleta, a menor distância genética foi entre Tramandaí e Torres (0,05 %). Isto deve-se, principalmente, a que um dos dois haplótipos de Tramandaí é o mesmo haplótipo encontrado no único indivíduo da localidade de Torres. A maior distância genética foi entre Taim e Tapes (1,52 %) embora a localidade mais próxima de Taim seja Tapes.

Foi testada (teste de Mantel) a hipótese de que as distâncias genéticas estivessem correlacionadas com as distâncias geográficas tendo sido encontrada uma baixa correlação entre estes dois fatores

**Tabela 20: distâncias genéticas em diferentes táxons de roedores relatados na literatura.**

Autor	Táxon	N	Citocrom o b	Modelo de analise	Distância genética	Nível
Martin <i>et al.</i> , 2000)	Murinae, Arvicolinae e Gerbillinae	15	1144 pb a 1143 pb	K2p	6 a 15 %	Intra-genérico
Lara <i>et al.</i> , 1996	Caviomorfos				15,5 a 20,3 %	Entre-gêneros
Smith <i>et al.</i> , 2001	Complexo <i>Abrothrix olivaceus/xanthorhinus</i>	21	1140 pb	K2p	2 %	Dentro do complexo <i>Abrothrix olivaceus/Xanthorhinus</i>
Geise <i>et al.</i> , 2001	<i>Akodon montensis</i> e <i>A. cursor</i>	56	801 pb	K2p	De zero a cinco %	Dentro de <i>A. cursor</i>
					0,2 a 6,5	Dentro de <i>A. montensis</i>
Catanesi <i>et al.</i> , 2002		19	379 pb	K2p	2,1 %	Dentro do clado 2n = 42-41
					2,7%	Dentro do clado 2n = 38-34
					11,4 %	Entre o clado de 2n = 42-41 e o 2n = 38-34
Hoffmann <i>et a.</i> , 2002	<i>Oxymycterus</i>	16	1137 pb	K2p	Zero a 1,3 %	<i>O. josei</i> e <i>O. judex</i> e <i>O. dasytrichus</i>
Ducroz <i>et al.</i> , 1997	<i>Arvicanthis</i>	20	1140 pb	K2p	1,2 %	<i>A. niloticus</i>
					1,3 %	<i>Arvicanthis sp.</i>
Smith & Patton, 1991	Akodontini	12	401 pb	K2p	< 1 %	Dentro de populações locais
					< 8 %	Intraespecifico
					De 3 a 21 %	Interespecifico
Smith & Patton, 1993	Akodontini	107	801 pb	K2p	1,7 %	Intrapopulacional
					9,4 %	Interpopulacional
					5 a 10 %	<i>A. aereosus</i> , <i>A. mollis</i> , <i>A. orophilus</i> e <i>chroecomys jelskii</i>
Smith & Patton, 1999	Sigmodontina e	93	759 pb a 1140 pb	K2p	0,5 %	Intrapopulacional
					de zero a 1,6	
					3,7 %	Interpopulacional
					0,4 a 9,7 %	
					17,3 %	Dentro de <i>Akodon</i>
Neste trabalho	<i>D. kempfi</i>	26	733 pb	K2p	0,52 %	Planície Costeira

### **4.3. *D. kemp* na Planície Costeira**

No Rio Grande do Sul existem quatro grandes domínios morfoestruturais, reconhecidos a partir das características geológicas e estruturais das rochas e modelados da superfície. Ao norte, encontra-se o Planalto Meridional, formado por extenso platô de rochas basálticas e riodacíticas, com altitudes de até 1.378 metros. Coberto de campos e matas mistas com araucárias, esse platô foi recortado pela erosão no bordo sul, originando uma escarpa íngreme, denominada Serra Geral. As terras baixas, com altitudes entre zero e 200 metros, situadas no entorno da fralda do platô, apresentam relevo de coxilhas suaves e planícies fluviais que constituem a Depressão Periférica. Esse domínio estende-se num estreito corredor em direção ao oeste, até a fronteira com Uruguai, conectando-se com o Pampa Argentino. Coberta de matas e campos, a Depressão Periférica é formada por rochas sedimentares paleozóicas e mesozóicas da Bacia do Paraná, que são mais antigas do que as rochas do platô. Morros com forma tubulares (mesas) e cônicas, de diversas altitudes, sobressaem-se das terras baixas mais desgastadas e testemunham as posições anteriores da linha de escarpa, que ainda recua devido aos incessantes processos erosivos atuantes nas terras altas. Na porção sudeste do estado, evidencia-se o domínio do Escudo Sul-Rio-Grandense. Trata-se de um planalto formado por rochas ígneas, metamórficas e sedimentares de idades que vão do Arqueano (2.200 MA, a mais antiga do estado) ao Câmbrio (500 MA.). As formas de relevo, que variam desde coxilhas, morros, pontões e cristas até chapadas, são cobertas de savanas e matas e possuem altitude de até 599 metros. Na costa leste do estado, situa-se o domínio da Província Costeira, formada por um conjunto de pequenas lagoas isoladas encravadas em depósitos arenosos, de idade quaternária, vegetados por matas de restinga, juncais e gramíneas.

A morfologia atual da borda da Província Costeira no Rio Grande do Sul foi modelada por sucessivos eventos de subida e descida do nível do mar ocorrida desde 500 mil anos atrás. Nesta época o clima era muito frio e seco, devido a que uma glaciação que afetava todo o planeta. Durante o período glacial o nível do mar sofreu um rebaixamento. No Rio Grande do Sul, a linha de costa do Oceano

Atlântico movimentou-se mais de 100 quilômetros para leste da atual, deixando exposta grande parte da plataforma continental.

Há cerca de 400 mil anos, essa paisagem foi substancialmente alterada. As temperaturas elevaram-se e deram lugar a condições climáticas mais amenas, que provocaram o descongelamento das geleiras existentes nas zonas polares e nas regiões montanhosas. Isto aumentou a quantidade de água disponível no planeta, causando a elevação do nível dos oceanos. No Rio Grande do Sul, o mar inundou grande parte, deixando emersas somente as terras altas que tornaram-se ilhas eventualmente conectadas ao continente por restingas arenosas.

Outros três grandes ciclos de descida e subida relativas do nível do mar aconteceram. A morfologia atual das costas do Rio Grande do Sul foi originada durante essas transgressões oceânicas. A Segunda Transgressão Oceânica ocorreu há 325 mil anos, mas a área ocupada pelo mar foi consideravelmente menor do que a da transgressão anterior.

A Terceira foi há 120 mil anos onde houve formação das barreiras e das restingas que fecharam a Laguna dos Patos e transformaram o Guaíba num lago sem conexão com o oceano Atlântico. Nessa mesma época, a Lagoa Mirim foi fechada devido ao desenvolvimento da barreira arenosa da costa sul-riograndense. A Última Grande Transgressão ocorreu há cinco mil anos. A Laguna dos Patos formou um conjunto de pequenas lagoas isoladas e na região sul da costa do estado, originaram-se a Lagoa Mangueira e o Banhado do Taim. Desde então, a região costeira do Rio Grande do Sul apresenta a fisiografia atual (Menegat *et al.*, 1999).

A flora da Província Costeira possui uma origem e diversidade muito peculiares e engloba espécies provindas desde as distantes regiões da Amazônia, ao norte, do Chaco, a noroeste, do Pampa e Patagônia, ao sul e da Mata Atlântica, a nordeste. Os diversos processos geológicos e geomorfológicos, que originaram compartimentações regionais do relevo, acompanhados das grandes mudanças de paleoclima do quaternário, época de expansão das angiospermas atuais, foram os fatores determinantes que explicam o ecótono nesta região. Pelo menos quatro rotas migratórias de plantas superiores estabeleceram-se ou colonizando terrenos anteriormente desnudos, ou

sucedendo as floras estabelecidas em condições climáticas e geomorfológicas diferentes.

Há 400 mil anos atrás o clima era muito frio e as condições de colonização dos terrenos pelos vegetais eram bastante difíceis. Assim, as primeiras formações que ocuparam os topos dos morros foram os campos secos. Essas formações deslocaram-se pela rota migratória meridional, com elementos austrais-antárticos de parentesco andino, e pela rota migratória oeste, com elementos chaco-pampeanos.

Os campos foram, há 325 mil anos, invadidos por espécies arborescentes dando origem a uma fisionomia de savana com dominância de butiás, provindas pela rota migratória oeste, que atualmente acompanham os campos secos, as encostas dos morros e as pequenas coxilhas, dominaram o cenário. Apenas nos topos dos morros mais altos permaneceu a fisionomia de estepe, estabelecida anteriormente.

A terceira transgressão marinha propiciou a formação da Laguna dos Patos e do Lago Guaíba. As terras baixas, construídas por cordões arenosos de origem lacustre tornaram-se mais extensas. Nos terraços lacustres, desenvolvidos atrás desses cordões, formaram-se banhados que foram conquistados por espécies vegetais mais adaptadas à água, como os maricás, os quais, associados a um estrato herbáceo, assumiram a fisionomia de uma savana úmida.

As florestas nesta região originaram-se a partir de duas rotas migratórias seguidas pelas angiospermas arbóreas, desde os últimos cinco mil anos: uma proveniente das florestas, junto às margens e abrangências dos rios Paraná e Uruguai, e outra proveniente do litoral, a partir da Mata Atlântica. Na primeira rota a expansão desse tipo de floresta ocorreu através dos vales dos rios e efluentes da escarpa da Serra Geral.

Várias espécies encontram no Rio Grande do Sul seus limites de distribuição meridional ou setentrional, *Deltamys* representa uma destas, já que o limite norte da sua distribuição encontra-se neste estado.

Na tentativa de reconstrução da história da ocupação da Planície Costeira por *D. kempfi*, dois cenários devem ser levados em conta:

1. Na literatura são propostas quatro possíveis rotas migratórias florísticas (possivelmente acompanhadas pela fauna) de ocupação da Planície Costeira, duas delas capazes de explicar a origem de *Deltamys* nesta região, já que é uma espécie de distribuição patagônica (Menegat et al., 1999):
  - Rota Meridional, originada nos Andes do Sul, contendo elementos austrais antárticos.
  - Rota Oeste, originada nos Andes Centrais, com elementos chaco-pampeanos.
2. Reig (1984), a partir da análise da área de maior sobreposição de distribuição geográfica das espécies da tribo Akodontini, propõe ser o sul do Andes Centrais e o norte dos Andes Meridionais a área de diferenciação original dos akodontinos.

A análise feita por Neighbor-Joining utilizando o modelo de Tamura-Nei, gerou um árvore cuja topologia mostrou um único clado dentro do qual os exemplares (com exceção de um espécime) foram se agrupando por localidade na seqüência Taim↔Charqueadas↔Tapes↔Tramandai/Osório/Torres. As demais análises foram concordantes com estes dados. Podemos observar que o agrupamento segue um padrão geográfico e que a população mais ancestral pode ser ou não Taim.

O tempo de diversificação dos haplótipos na planície costeira foi calculado como sendo entre 180 mil anos até 800 mil anos atrás. Tendo em conta a idade da região, pode-se descartar o valor gerado pela taxa de 0,5 %/ MA (Irwin *et al.*, 1991) mas os outros dois valores (241 mil anos segundo a calibração de Reig, 1987, e 178 mil anos segundo a calibração de Smith & Patton, 1993) concordaram com os dados geológicos.

Ao atingir esta região (entre 240 – 180 mil anos atrás) *D. kemp* ocupou a Planície Costeira por dois possíveis caminhos:

- a. se pela Depressão Periférica (vales dos rios Jacui, etc) a seqüência seria do tipo Charqueadas→Tapes→ Taim e Charqueadas→Tramandai/Osório/Torres.

- b. Se pela rota costeira (margem esquerda da Lagoa dos Patos) a seqüência seria do tipo Taim↔Tapes↔Charqueadas↔Tramandai/Osório/Torres.

Como não se dispõe de seqüências de citocromo *b* de *D. kempi* mais antigas (populações da Argentina e do Uruguai) para serem comparadas, não foi possível estabelecer qual destas duas rotas (ou suas variantes) seria a mais provável. Até o momento, a única indicação disponível é que dois haplótipos de Taim (TAI 2 e 3) seriam os mais antigos da Planície Costeira.

Um dos haplótipos de Taim (TAI1), no entanto, é diferente o suficiente para alocá-lo fora desta localidade (na verdade este ficou entre Tapes e o clado formado por indivíduos de Tramandai/Osório/Torres). Esta situação pode ou não estar refletindo uma alta diversidade dentro de Taim ou ser produto de um erro técnico (que vai desde a anotação no Caderno de Campo até uma troca no laboratório). Por outro lado, de acordo com o Dr. L. F. B. Oliveira (responsável pela identificação dos exemplares) akodontinos, no geral, são muito similares quando jovens. Especialmente nesta coleta no Taim foram capturadas muitas espécies desta tribo.

### **4.3. O status de *Deltamys* como gênero**

As seqüências do citocromo *b* que observamos em *Deltamys* foram comparadas com as demais seqüências do mesmo gene observadas em outros gêneros da tribo Akodontini (depositadas no GenBank), gerando uma árvore na qual observou-se que os 8 haplótipos de nossa amostra constituíram um único grupo (100 bootstrap) com nenhum deles alocando-se dentro ou próximo ao gênero *Akodon*, ao qual *Deltamys* previamente foi proposto pertencer (Ellerman, 1941; Cabrera, 1961; Massoia, 1964; Reig, 1981). Este achado, mais o fato de *Deltamys* ser o único gênero da tribo a possuir um sistema de determinação do sexo do tipo ♀,38,X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂,37,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y e a ausência em *Deltamys* do pequeno metacêntrico marcador do gênero *Akodon*, indica ser o mesmo um gênero pleno dentro tribo Akodontini.

Esta proposta é reforçada sob o ponto de vista molecular, pois a topografia da árvore gerada intercala *Thaptomys nigrita* (que provavelmente representa outro gênero, Smith & Patton, 1999) e *Akodon serrensis* (recentemente proposto também como outro gênero, Pereira & Geise, 2003), entre o gênero *Akodon* e os haplótipos de *Deltamys*. Isto mostra que *Deltamys* pode ser considerado como um gênero pleno com base em dados moleculares, sendo este o seu primeiro registro molecular.

Bianchini e Delupi (1994) fizeram um profundo estudo morfológico de *Deltamys*, concluindo que este representa um gênero pleno que não mostra uma relação filogenética próxima com o gênero *Akodon*. Salientam que *Deltamys* compartilha com os gêneros *Thaptomys*, *Chelemys*, *Notiomys*, *Lenoxus*, *Geoxus* ou *Blarinomys* hábitos tróficos, especialidades ecológicas e endemismo, também apresentando convergências morfológicas com *Oxymycterus*. Em nossa filogenia *Deltamys* apresentou-se relacionado com o clado formado pelos gêneros *Akodon* e *Thaptomys*, compartilhando com os mesmos um ancestral comum.

# **5. RESUMO E CONCLUSÕES**

## 5. Resumo e Conclusões

*Deltamys kemp* é um roedor sigmodontino sul-americano pertencente à tribo Akodontini desta subfamília. É de distribuição restrita, tendo sido relatado apenas no delta do Rio da Prata (e em algumas localidades argentinas adjacentes), em Montevideu no Uruguai e na Planície Costeira do estado do Rio Grande do Sul. Nesta região habita uma faixa de cerca de 400 km de extensão, de Torres ao Taim, aparentemente ao longo da margem esquerda da Lagoa dos Patos.

*D. kemp* caracteriza-se por ser portador de dois eventos cromossômicos que o tornam um modelo único entre os mamíferos: é possuidor de um sistema cromossômico múltiplo de determinação do sexo do tipo ♀,38,X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂,37,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y; e, em várias localidades, apresenta fusões cêntricas autossômicas distintas e próprias de cada um destes locais.

A raridade deste modelo biológico motivou o presente estudo que visou, através das análises da seqüência do gene mitocondrial citocromo *b* de populações da Planície Costeira do Rio Grande do Sul desta espécie, investigar se ocorriam diferenças entre os indivíduos procedentes de distintas localidades desta região. Foi, também, verificado se os conjuntos de espécimes agrupados pelos cariótipos correspondiam aos mesmos conjuntos quando agrupados pelas seqüências de DNA mitocondrial, já que os rearranjos cromossômicos observados nesta espécie são próprios de cada local. Foram estimados os tempos de divergência entre os haplótipos encontrados e, também, feitas tentativas de esclarecimento sobre se *Deltamys* é um gênero pleno ou um subgênero de *Akodon*.

Foi seqüenciado um fragmento de 733 pb de 26 espécimes (13 deles com o cariótipo determinado) coletados em 6 localidades da Planície Costeira: Torres (1), Osório (1), Tramandaí (18), Charqueadas (2), Tapas (1) e Taim (3). Em relação a este fragmento, 712 pb resultaram ocorrer em sítios conservados, 21 em sítios variáveis e 12 foram informativos para a análise de parcimônia. Dos nucleotídeos variáveis 19% apresentaram-se na primeira posição do códon, 4,8 % na segunda posição e 76,2 %. Quanto à composição de bases encontrou-se que o conteúdo de guanina é significativamente menor do que o esperado, sendo que

essa diminuição ocorrem na segunda posição mas, principalmente, na terceira posição do códon.

Na amostra ocorreram oito diferentes haplótipos que mostraram uma distribuição exclusiva por localidade, já que aqueles encontrados num dado local de coleta, em geral, não ocorreram nos outros locais. Torres foi a exceção já que haplótipo do único espécime investigado nesta localidade também foi encontrado em Tramandaí.

As indicações que se obteve é que os conjuntos de espécimes agrupados pelos cariótipos não correspondiam aos mesmos conjuntos quando agrupados pelas seqüências de DNA mitocondrial. No entanto, em nossa amostra tanto os cariótipos como os haplótipos mostraram-se locais/restritos.

A distância genética média entre os indivíduos da amostra (Kimura dois parâmetros) foi de, aproximadamente, 0,5%, a mesma obtida quando se utilizou o modelo de Tamura-Nei. Foi testada (teste de Mantel) a hipótese de que as distâncias genéticas estivessem correlacionadas com as distâncias geográficas, tendo sido encontrada uma baixa correlação entre estes dois fatores.

As relações filogenéticas entre os diferentes haplótipos de *D. kempfi*, foram investigadas pelos métodos de Neighbor-joining (Kimura-dois-parâmetros e Tamura-Nei), Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, todos mostrando árvores que continham agrupamentos muitos similares, cujas características principais foram:

1. De forma geral, observou-se que todos os indivíduos da espécie *D. kempfi* formaram um único grupo (valor de 100% de bootstrap) e, por sua vez, os espécimes agruparam-se de acordo com suas localidades de origem.
2. A topologia da árvore obtida mostra um único clado dentro do qual as seqüências dos exemplares (com exceção de um espécime) foram se agrupando, por localidade, na sucessão Taim↔Charqueada↔Tapes↔Tramandai/Osório/Torres.
3. As seqüências de dois espécimes do Taim (haplótipos TAI2 e TAI3) localizam-se como os ramos mais externos, seguidos pelos dois espécimes de Charqueadas (haplótipo CHA1). O ramo relativo ao indivíduo de Tapes (haplótipo TAP) encontra-se a seguir. Em todas as árvores (Apêndice I) a

sequencia do terceiro indivíduo do Taim (TAI1) coloca-se entre a de Tapes e o clado que vem logo a seguir, formado por as seqüências dos indivíduos de Tramandai/Osório/Torres. Este clado é subdividido em dois grupos: um com seis indivíduos de Tramandaí (haplótipo TRA8) e outro com seqüências de 12 indivíduos de Tramandaí mais a de um exemplar de Torres (haplótipo TRA/TOR) e o exemplar de (o do) Osório (haplótipo OSO).

Foram discutidos os possíveis cenários relativos à ocupação da Planície Costeira por *D. kempi*, na tentativa da reconstrução da história biogeográfica desta espécie nesta região.

Tomando como base diferentes calibrações do relógio molecular, estimou-se que o tempo de divergência entre os oito haplótipos encontrados nos 26 indivíduos da amostra foi de cerca de 180 mil anos até 800 mil anos atrás (este último não tendo sido levado em conta, por ser incompatível com a história geológica da Planície Costeira). Pelo mesmo método estimamos, também, que *Deltamys* divergiu dos demais gêneros da tribo Akodontini há cerca de 3,35 MA.

As seqüências do citocromo b que observamos em *Deltamys* foram comparadas com as demais seqüências do mesmo gene observadas em outros gêneros da tribo Akodontini (depositadas no GenBank), gerando uma árvore na qual observou-se que os 8 haplótipos de nossa amostra constituíram um único grupo (100% de valor de bootstrap) com nenhum deles alocando-se dentro ou próximo ao gênero *Akodon*, ao qual *Deltamys* previamente foi proposto pertencer. Este achado, mais o fato de *Deltamys* ser o único gênero da tribo a possuir um sistema de determinação do sexo do tipo ♀,38,X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂,37,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y e a ausência em *Deltamys* do pequeno metacêntrico marcador do gênero *Akodon*, indica ser o mesmo um gênero pleno dentro da tribo Akodontini.

# **6. SUMMARY AND CONCLUSIONS**

## 6. Summary and Conclusions

*Deltamys kemp* is a South American sigmodontine rodent which belongs to the Akodontini tribe of this subfamily. It is of restricted distribution, having been reported in the delta of Rio de la Plata (and in some adjacent Argentinean locations), at Montevideo in Uruguay, and in the Coastal Plain of the state of Rio Grande do Sul. In this region it occupies a land of about 400 km of extension, from Taim to Torres, apparently through the left margin of the Lagoa dos Patos.

*D. kemp* is characterized by carrying two rare chromosomal events which distinguish it as an unique model among mammals: it has a multiple chromosomal system of sex determination of the type  $2n=38, X_1X_1X_2X_2/\sigma, 37, X_1X_2Y$ ; and, in several places, it shows different autosome centric fusions that are characteristic of each one of these localities.

The rarity of this biological model motivated the present study, that has as its aim the analyses of the cytochrome *b* mitochondrial gene sequence in populations of the Coastal Plain of Rio Grande do Sul of this species, to investigate if differences occur among individuals from different localities of the area. It was also investigated if the groups of specimens joined by their karyotypes corresponded to the same cluster's originated by the mitochondrial DNA sequences, in view of the fact that the chromosomal rearrangements observed in this species are specific to each place. The divergence times between the haplotypes were also estimated, and an attempt was made to verify if *Deltamys* is an *Akodon* subgenus or a full genus.

A fragment of 733 bp was sequenced from 26 specimens (13 of them with their karyotype's determined) trapped at 6 localities of the Coastal Plain: Torres (1), Osório (1), Tramandaí (18), Charqueadas (2), Tapes (1), and Taim (3). In relation to this fragment, 712 bp occurred at conserved sites, 21 at variable sites, and 12 were informative for the parsimonious analysis. Of the variable nucleotides, 19% were at the first codon position, 4.8% at second position, and 76.2% at the third position. As for the bases composition, the guanine content was significantly smaller than the expected, being this deficiency at the second position but, mainly, at the third codon position.

Eight different haplotypes occurred in the sample which showed a distinct locality distribution, since generally those found at a given site were not seen at the other sites. Torres was an exception, since the haplotype of the single specimen investigated from this locality was found in Tramandaí also.

What was observed is that sets grouped by karyotype did not correspond to those grouped by the mitochondrial DNA sequences. But both karyotypes and haplotypes were restricted to specific places.

The average genetic distance among the individuals of the sample (Kimura two parameters) was 0.5%, the same obtained when the Tamura-Nei model was used. The hypothesis that the genetic distances were correlated with the geographical distances was tested (Mantel test), and a low correlation between these two factors was obtained.

The phylogenetic relationships among *D. kempí*'s different haplotypes were investigated by the Neighbor-joining (Kimura-two-parameters and Tamura-Nei), Maximum Parsimony, and Maximum-likelihood methods, all generating very similar trees, whose main characteristics were:

1. As a general rule, all *D. kempí* individuals clustered in a single group (with 100% of bootstrap value) while, the specimens grouped according to their localities of origin.
2. The tree's topology displayed a single clade, inside of which the sequences of the individuals (with one exceptions) grouped by locality in the sequence Taim↔Charqueadas↔Tapes↔Tramandaí/Osório/Torres.
3. The sequences of two specimens from Taim (TAI2 and TAI3 haplotypes) are placed as the most external ones, followed by those of the two specimens from Charqueadas (CHA1 haplotype). The branch from the Tapes (TAP haplotype) was observed next. In all the trees (Appendix I) the third individual from Taim (TAI1) was placed between that of Tapes and the clade that comes next, formed by individuals from Tramandaí/Osório/Torres. This clade is subdivided in two groups: one composed by the six sequences of individuals from Tramandaí (TRA8 haplotype) and another with those of 12 individuals from Tramandaí plus

that from one specimen from Torres (TRA/TOR haplotype) and of the specimen from Osório (OSO haplotype).

The possible scenarios in which occurred related to the occupation of the Coastal Plain by *D. kempi* were discussed, attempting to reconstruct the biogeographic history of this species in this area.

Based on different calibrations of the molecular clock, the divergence time between the eight haplotypes observed in the 26 individuals of the sample was calculated as being between 180 thousand up to 800 thousand years ago (this last estimate was not considered because it is incompatible with the Coastal Plain's geological history). By the same method we estimated also that *Deltamys* diverged from the other genera of the Akodontini tribe at about 3.35 MY ago.

The cytochrome b sequences we detected in *Deltamys* were compared with those of the same gene observed in other genera of the Akodontini tribe deposited in GenBank, generating a phylogenetic tree in which the eight haplotypes of our sample formed a single group (with 100% of bootstrap value), none of them being allocated inside or near the *Akodon* genus cluster, to which *Deltamys* was previously proposed to belong. This finding, plus the fact that *Deltamys* is the only genus of the tribe to possess a sex determination system of the  $X_1X_1X_2X_2/\text{♂}, 37, X_1X_2Y$  type, and the absence in *Deltamys* of the small metacentric marker of the *Akodon* genus, indicates it to be a full genus of the Akodontini tribe.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Adkins, R. Walton, A. & Honeycutt, R. 2003. Higher-level of rodents and divergence time estimates based on two congruent nuclear genes. *Mol. Phyl. Evol.* 26:409-420.
- Avice, J C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species.* Harvard Univ. Press., London. 1-447.
- Bandelt,H.; Forster P. and Röhl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1):37–48.
- Barome, P.; Monnerot, M. & Gautun, J. 1998. Intrageneric phylogeny of *Acomys* (Rodentia, Muridae) using mitochondrial gene cytochrome *b*. *Mol. Phyl. Evol.* 9 (3): 560-566.
- Baskin, J. A. 1978. *Bensnomys*, *Calomys*, and the origin of the phyllotine group of neotropical cricetines (Rodentia, Cricetidae). *J. Mamm.* 59: 125-135.
- Beintema, J. 1985. Amino Acid sequence data and evolutionary relationship among hystricognaths and other rodents. In "Evolutionary relationships among Rodents: A multidisciplinary analysis" (Luckett, W. & Hartenberger, J., Edits). Plenum, New York. 549-565.
- Bianchi, N. O.; Reig, O. A.; Molina, O. J. & Dulout, F. N. 1971. Cytogenetic of the South American akodont rodents (Cricetidae). I A progress-report of Argentinian and Venezuelan forms. *Evol.* 25: 724-736.
- Bianchini, J. & Delupi, L. 1994. Consideraciones sobre el estado sistemático de *Deltamys kemp*i Thomas, 1917 (Cricetidae: Sigmodontinae. *Physis.* C49 (116-117): 27-35.
- Bibb, M.; Van Etten, R.; Wright, C.; Walberg, M. & Clayton, D. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 26: 167-180.

- Bonvicino, C.; Otazu, I & Weksler, M. 1998. *Oryzomys lamia* Thomas, 1901 (Rodentia: Cricetidae): karyotype, geographic distribution and conservation status. *Mamm.* 62: 253-258.
- Bugge, J. 1985. Systematic value of the carotid arterial pattern in rodents. In: W. P. Luckett and J.-L. Hartenberger, Editors, *Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis*, Plenum, New York. 381–402.
- Cabrera, A. 1961. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat.* 4: 309-732.
- Carleton, M. D. 1984. Introduction to rodents. In "Orders and Families of Recent Mammals of the World" (Anderson, S. & J. K. Jones, Jr. Edits) John Wiley and Sons, New York, 255- 265.
- Castro, E.; Mattevi, M.; Maluf, S. & Oliveira, L. 1991. Distinct centric fusions in different populations of *Deltamys kempi* (Rodentia: Cricetidae) from South America. *Cytobios* 68: 153-159.
- Catanesi, C.; Vidal-Rioja, L.; Crisci, J. & Zambelle. 2002. Phylogenetic relationship among Robertsonian karyomorphs of *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Muridae) by mitochondrial cytochrome *b* DNA sequencing. *Hereditas.* 136: 130-136.
- Catzefflis, F.; Hänni, C.; Sourrouille, P. & Douzery. 1995. Molecular systematics of Hystricognath rodents: the contribution of sciurognath mitochondrial 12S rRNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 4: 357-360.
- Corroy, C. & Cook, J. 1999. MtDNA evidence for repeated pulses of especiation witjin Avicoline and Murid Rodents. *J. Mamm. Evol.* 6(3):211-245.
- da Silva M.N.F. & Patton, J.L. 1993. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). *Mol. Phylo. Evol.* 2:243-255.

- da Silva, M. N. & Patton, J. L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Mol. Ecol.* 7: 475-486.
- Demastes, J.; Spradling, T.; Hafner, M.; Hafner, D. & Reed, D. 2002. Systematics and phylogeography of Pocket Gophers in the genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Mol. Phyl. Evol.* 22(1): 144-154.
- Ducroz, F.; Volobouev, V. & Granjon, L. 1998. A molecular perspective on the systematics and evolution of the genus *Arvicanthis* (Rodentia, Muridae): inferences from complete cytochrome *b* gene sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 10(1): 104-117.
- Eisenberg, J. & Redford, K. 1999. Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics. Vol 3. Ecuador, Peru, Bolivia and Brazil. University of Chicago Press, Chicago
- Ellerman, J. 1941. The families and genera of living rodents. *Brit. Mus. (Nat. Hist.)* 11: 1-690.
- Excoffier L., Smouse P. E. & Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet.* 131: 479-491.
- Fronza, M.; Wainberg, R. & Cataleo, G. 1981. Multiple sex chromosomes in *Deltamys Kempti* (Rodentia: Cricetidae): Preliminary steps towards the establishment of the XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>/XX system. *Caryologia* 34: 457-466.
- Frye, M. & Hedges, S. 1995. Monophyly of the order Rodentia inferred from mitochondrial DNA sequences of the genes for 12S rRNA, 16S rRNA, and tRNA-Valine. *Mol. Biol. Evol.* 12: 168-176.
- Gardner, A. L. & Patton, J. L. 1976. Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetine complex, Occasional Papers, Mus. Zool., Louisiana State University 49: 1-48.

- Geise, L.; Smith, M. & Patton, J. 2001. Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) in southeastern south America: mitochondrial DNA sequence analysis. *J. Mamm.* 82(1): 92-101.
- George, W. 1985. Reproductive and chromosomal characters of ctenodactylids as a key to their evolutionary relationships. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Luckett, W. & Hartenberger, J. Edits) Plenum, New York. 453–474.
- González, E. M. & Massoia, E. 1995. Revalidación del género *Deltamys* Thomas, 1917, con la descripción de una nueva subespecie de Uruguay y sur de Brasil (Mammalia: Rodentia: Cricetidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo.* 12: 1-8.
- Gyldenstolpe, N. 1932. A mammal of neotropical sigmodont rodents. *Kungl. Sv. Vetensk. Handl.* 11: 1-164.
- Hadrys, H.; Balick, M.; & Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1:55-63.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hershkovitz, P. 1966. Mice, land bridges and Latin American faunal interchange. In: R. L. Wenzel and V. J. Tipton (eds). *Ectoparasites of Panama: Field Mus. Nat. Hist. Chicago.* 725-751.
- Hershkovitz, P. 1972. The recent mammals of the Neotropical Region: a zoogeographic and ecological review. In "Evolution, Mammals and southern continents". (Keast, A., Erk, F. & Glass, B. edits.) Albany: State Univ. New York Press. 311-431.
- Hershkovitz, P. 1990. The Brazilian rodent *Thalpomys* (Sigmodontinae, Cricetidae) with a description of a new species. *J. Nat. Hist.* 24: 763-783.

- Hickman R. L. 1998. Zoología Principios Integrales. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Tercera Reimpresión. 322-453.
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA. 1993. Generation of VNTRs and heteroplasmy by sequence turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. *J. Mol. Evol.* 37:190-197.
- Hoffmann, F.; Lessa, E & Smith, M. 2002. Systematics of *Oxymycterus* with description of a new species from Uruguay. *J. Mamm.* 83(2): 408-420.
- Huchon D. & Douzery E. 2001. From the old world to the new world: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Mol. Phyl. Evol.* 20: 238-251.
- Huchon, D.; Catzeflis, F. & Douzery, E. 1999. Molecular evolution of the nuclear von Willebrand factor gene in mammals and the phylogeny of rodents. *Mol. Biol. Evol.* 16 (5): 577- 589.
- Huchon, D.; Catzeflis, F. & Douzery, E., 2000. Variance of molecular datings, evolution of rodents and the phylogenetic affinities between Ctenodactylidae and Hystricognathi. *Proc. R. Soc. Lond.* 267: 393-402.
- Huchon, D.; Madsen, O.; Sibbald, M.; Ament, K.; Stanhope, M.; Catzeflis, F.; Jong, W e Douzery, E. 2002. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Mol. Biol. Evol.* 19 (7): 1053-1065.
- Irwin, D. Kocher, T. & Wilson A. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Mol. Ecol.* 32:128-144.
- Jaeger, J. 1988. Rodent phylogeny: New data and old problems. In: M. J. Benton, Editor, *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods*, Clarendon, Oxford. 177–199.

- Kravetz, F. O. 1973. Estudio de régimen alimentario, períodos de actividad y otros rasgos ecológicos en una población de raton hocicudo (*Oxymycterus rufus platensis*) de Punta Lara. Acta Zoológica Lilloana 29: 201-212.
- Kumar, S; Tamura, K. & Nei, M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Kumar, S; Tamura, K; Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Bioinformatics.
- Lahiri D. K. & Nurnberger J. I. 1991. A rapid non-enzimatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res, 19:5444.
- Lara, M.; Patton, J. & da Silva, M. 1996. The simultaneous diversification of South American Echimyid Rodents (Hystricognathi) Based on complete cytochrome *b* sequences. Mol. Phyl. Evol. 5: 403-413.
- Lavocat, R. & Parent, J. 1985. Phylogenetic analysis of middle ear features in fossil and living rodents. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Luckett, W. P. & Hartenberger, J. L. Edits) Plenum, New York. 333–354.
- Li Chuan-Kuei, Wilson R., Dawson M. & Krishtalka L. 1987. The origin of Rodents and Lagomorphs. Curr. Mamm. 1.
- Lobato, L.; Cantos, G.; Araujo, B.; Bianchi, N. O.; & Merani, S. 1981. Cytogenetic of the South American akodont rodents (Cricetidae). X. *Akodon mollis*: a specie with XY females and B chromosomes. Genet. 57: 199-205.
- Luckett, W. 1985. Superordinal and intraordinal affinities of rodents: Developmental evidence from the dentition and placentation. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Luckett, W. P. & Hartenberger, J. L. Edits) Plenum, New York. 227–278.

- Luckett, W. & Hartenberger, J. 1985. Evolutionary relationships among rodents: Comments and conclusions. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Luckett, W. P. & Hartenberger, J. L. Edits) Plenum, New York. 227–278.
- Marshall L. G. & Pascual R. 1977. Nuevos marsupiales Caenolestidae del piso Notohipidense (SW de Santa Cruz, Patagonia) de ameghino. Sus aportaciones a la cronología y evolución de las comunidades de mamíferos sudamericanos. Publ. Mus. Munic. C. Nat. Mar del Plata Lorenzo Scaglia 2: 91-122.
- Marshall, L. G.; Butler, R. F.; Drake R. E.; Curtis G. H. & Tedford R. H. 1979. Calibration of the great American interchange. *Scie.* 204: 272-279.
- Martin, Y.; Gerlach, G; Schötterer & Meyer, A. 2000. Molecular phylogeny of European Murid Rodents based on complete cytochrome *b* sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 16(1): 37-47.
- Massoia, E. & B. Lartigau. 1995. Mamíferos (Rodentia, Lagomorpha y Marsupicarnivora) cazados por *Tyto alba* en el Río Limay, Departamento Pilcaniyeu, provincia de Río Negro. *Boletín Científico, APRONA*, 27:15-18.
- Massoia, E. 1964. Sistemática, distribución geográfica y rasgos etoecológicos de *Akodon (Deltamys) kempii* (Rodentia: Cricetidae). *Physis* 24: 299-305.
- Matthee, C. & Robinson, T. 1997. Molecular phylogeny of the Springhare, *Pedetes capensis*, based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14(1): 20-29.
- McDonald D. 1999. *The Encyclopedia of Mammals*. Andromeda Oxford Limited. 1<sup>a</sup> Edition. 21-86.
- Medrano J.F., Aasen E. & Sharrow L. 1990. DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43.

- Meléndez B. 1990. Paleontología. Tomo 3. Volumen 1. Editorial Paraninfo S. A. 1-451.
- Menegat, R.; Porto, M.; Carro, C. & Fernandes, L. 1999. Atlas de Porto Alegre. 2ª edição. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Brasil. 228.
- Meserve, P. L. & Glanz, W. 1978. Geographical ecology of small mammals in the northern Chilean arid border. *J. Biogeo.* 5: 135-148.
- Meserve, P. L. 1981. Trophic relationships among small mammals in a Chilean semiarid thron scrub community. *J. Mamm.* 62: 304-314.
- Michaux, J. Reyes, A. & Catzefflis, F. 2001. Evolutionary history of the most speciose mammals: molecular phylogeny of muroid rodents. *Mol. Biol. Evol.* 18 (11): 2017-2031.
- Michaux. J.; Chevret, P.; Filippucci, M. & Macholan, M. 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvamus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA. *Mol. Phyl. Evol.* 23: 123-136.
- Montgelard, C. Bentz, S. Tirard, C., Verneau, O. & Catzefflis, M. 2002. Molecular systematics of sciurognathi (Rodentia): The mitochondrial cytochrome *b* and 12 S rRNA genes support the anomaluroidea (Pedetidae and Anomaluridae). *Mol. Phyl. Evol.* 22(2): 220-233.
- Moritz C. 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Tr. Ecol. Evol.* 9:373-375.
- Musser, G. & Carleton, M. 1984. Muroid rodents. *In* Anderson and Jones (1984). 289-379.
- Musser, G. G. & Carleton, M. D. 1993. Family Muridae. *In*: Wilson D. E. & Reeder D. M. (Editors). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 2<sup>nd</sup> edition. Smithsonian Institution Press, Washington, DC 501-756.

Musser, G. G.; Carleton, M. D.; Brothers, E. M. & Gardner, A. L. 1998. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae): diagnoses and distributions of species formerly assigned to *Oryzomys "capito"*. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 236: 1-376.

Myers, P. 1999  
(<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/chordata/mammalia/rodentia.html>). acesso em: 13/09/2002.

Nedbal M.; Honeycutt R. & Schlitter D. 1996. Higher-level systematics of rodents (Mammalia, Rodentia): Evidence from the mitochondrial 12 S rRNA gene. J. Mamm. Evol. 3: 201-237.

Patterson, B. & Pascual, R. 1972. The fossil mammal fauna of South America. In "Evolution, mammals and southern continents" (Keast, A. Erk, F. C. & Glass, B. edits) Albany: New York State University Press. 90-128.

Patterson, B. D. 1992. A new genus and species of long-clawed mouse (Rodentia : Muridae) from temperate rainforest of Chile. Zool. J. Linn. Soc. 106: 127-145.

Patton J.; da Silva; M. & Malcolm, J. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. Evol. 48:1314-1323.

Patton, J. L. & Silva, M. N. F. 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: 319-337.

Patton, J. L.; da Silva, M. N. & Malcon, J. R. 2000. Mammals of the Rio Juruá: Evolutionary and ecological diversification in the Western Amazon. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 244: 1-306.

- Patton, J. L.; Myers, P & Smith, F. M. 1989. Electromorphic variation in selected South American Akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae), with comments on systematic implications. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 54: 347-359.
- Pearson, O. P. 1983. Characteristics of mammalian faunas from forests in Patagonia, southern Argentina. *J. Mamm.* 64: 476-492.
- Pearson, O. P. 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *J. Zool. (London)* 202: 225-237.
- Pereira, L. & Geise, L. 2003. Phylogenetic relationship among some species of the genus *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) using mitochondrial DNA sequence analysis (cytochrome *b*). II congresso brasileiro de mastozoologia. Livro de resumos. RO-06. 238-239.
- Reig, O. A. 1975. Diversidad, historia evolutiva y dispersión de los roedores cricétidos sudamericanos. *Acta Cient. Venez.* 26 suppl. 1: 7.
- Reig, O. A. 1978. Roedores cricétidos del plioceno superior de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Publ. Mus. Munic. C. Nat. Mar del Plata "Lorenzo Scaglia"* 2: 164-190.
- Reig, O. A. 1980. A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. *J. Zool.* 192: 257-281.
- Reig, O. A. 1981. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur. *Mus. Cs. Nat. "Lorenzo Scaglia" MdP.* 1-162.
- Reig, O. A. 1984. Geographic distribution and evolutionary history of South American Muroids (Cricetidae: Sigmodontinae). *Braz J. Genet.* 7: 333-365.
- Reig, O. A. 1987. An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Field: Zool.* 39: 347-399.

- Rohlf, J. 1993. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. Setauket, New York 11733.
- Ruedas, L. & Kirsch, J. 1997. Systematics of *Maxomys sody*; 1936 (Rodentia; Muridae; Murinae): DNA/BNA hybridization studies of some Borneo-Javan species and allied sundaic and Australo-Papuan genera. Biol. J. Linnean Soc. 61: 385-408.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Scie. 239:487-491.
- Salazar-Bravo, J.; Dragoo, J.; Tinnin, D. & Yates, T. 2001. Phylogeny and evolution of the neotropical Rodent genus *Calomys*: inferences from mitochondrial DNA sequence data. Mol. Ohyl. Evol. 20(2): 173-184.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York . 7.5-7.8.
- Savage, J. M. 1974. The isthmian link and the evolution of Neotropical mammals. Contr. in Sci., Nat Hist. Mus. Los Angeles Country 260: 1-51.
- Sbalqueiro, I. J.; Mattevi, M. S.; Oliveira, L. F. B. 1984. An  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  mechanism of sex determination in a South American rodent, *Deltamys Kempfi* (Rodentia: Cricetidae). Cytogenetics and Cell Genetics 38: 50-55.
- Simpson G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 85: 1-350.
- Simpson, G. G. 1950. History of the fauna of Latin America. Am. Scientist 38 (3): 361-389.
- Smith, M. & Patton, J. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of south american akodontine rodents (Muridae, Sigmodontinae). Mol. Biol. Evol. 8:149-177.

- Smith, M. & Patton, J. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol. J. Linn. Soc.* 50: 149-177.
- Smith, M. & Patton, J. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in south America: evidence from cytochrome *b*. *Mamm. Evol.* 6: 89-128.
- Smith, M.; Kelt, D. & Patton, J. 2001. Testing models of diversification in mice in the *Abrothrix olivaceus/xanthorhinus* complex in Chile and Argentina. *Mol. Ecol.* 10: 397-405.
- Steppan, S. 1995. Revision of the Tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae) with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. *Fiel: Zool, New Series* 80: 1-112.
- Strauss, E. 1999. Can mitochondrial DNA clocks keep time? *Scie.* 283:1435-1438.
- Sullivan, J.; Holsinger, K. & Simon, C. 1995. Among-site rate variation and phylogenetic analysis of 12S rRNA in Sigmodontine Rodents. *Mol. Biol. Evol.* 12(6): 988-1001.
- Swofford F. L. 1993. Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP) Version 3.1.1. University of Illinois, Champaign, 1-257.
- Tate, G. H. H. 1932. The taxonomic history of the south and Central American rodent genera: *Thalpomys*, *Deltamys*, *Thaptomys*, *Hypsimys*, *Bolomys*, *Chroeomys*, *Abrothrix*, *Scotinomys*. *Akodon*. (*Chalcomys* and *Akodon*), *Microxus*, *Podomus*, *Lenoxus*, *Oxymycterus*, *Notiomys* and *Blarinomys*. *Am. Mus. Nov.* 582: 1-32.
- Thomas, O. 1917. On small mammals from the Delta del Paraná. *Ann. Mag. Nat. Hist. London.* 20: 95-100.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.

- Thorpe RS, McGregor DP, Cumming AM and Jordam WC. 1994. DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, Cytochrome B, Cytochrome oxidase, 12S rRNA sequence, and nuclear RAPD analysis. *Evol.* 48:230-240.
- Tullberg, T. 1899. Ueber das system der nagetiere; eine phylogenetische studie. *Nova acta regiae societatis scientiarum upsalensis* 18: 1-514.
- Van der Hammen, T. 1961. Late Cretaceous and Tertiary stratigraphy and tectogenesis of the colombian andes. *Geol. Mijnbouw* 40: 181-188.
- Vorontzov, N. N. 1959. Sistema Khomiakov (Cricetidae) mirovoi fauny i ikh filogeneticheskie sviazi. *Biull. Mosk. Obsh. Isp. Prir. (bio.)* 44: 134-137.
- Voss, R. S. & Carleton, M. D. 1993. A new genus for *Hesperomys molitor* wing and *Holochilus magnus* Hershkovitz (Mammalia, Muridae) with an analysis of its phylogenetic relationships. *Amer. Mus. Nov.* 3085: 1-39.
- Voss, R. S. & Linzey, A. V. 1981. Comparative gross morphology of male accessory glands among Neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with comments on systematic implications. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan* 159: 1-41.
- Weksler, M.; Geise, L. & Cerqueira, R. 1999. A new species of *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from southern Brazil, with comments on the classifications of the *O. capito* species group. *Zool. J. Linn. Soc.* 125: 445-462.
- Wilson, D. & Reeder, D. 1993. *Mammal Species of the World - A Taxonomic and Geographic Reference*. 2nd Edition. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Wood, A. 1965. Grades and clades among rodents. *Evol.* 19:115-130.

- Wood, A. 1975. The problem of hystricognathous rodents. *Pap. Paleo.* 12: 75-80.
- Wood, A. 1985. The relationships, origin and dispersal of the hystricognathous rodents. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Lockett, W. P. & Hartenberger, J. L. Edits) Plenum, New York. 475–513.
- Wood, C. A. 1976. What is a hystricomorph-hystricognath rodent? AIBS 27 th ann. Meeting, New Orleans.
- Woods C. & Hermanson, J. 1985. Myology of hystricognath rodents: An analysis of form, function, and phylogeny. In "Evolutionary Relationships among Rodents: A Multidisciplinary Analysis" (Lockett, W. P. & Hartenberger, J. L. Edits) Plenum, New York. 515–548.
- Wyss, A.; Flynn, J.; Norell, M.; Swisher, C.; Charrier, R.; Novacek, M. & McKenna, M. 1993. South America's earliest rodent and recognition of a new interval of mammalian evolution. *Nature* 365: 434–437.

# **Apêndice I.**

## Apêndice I.

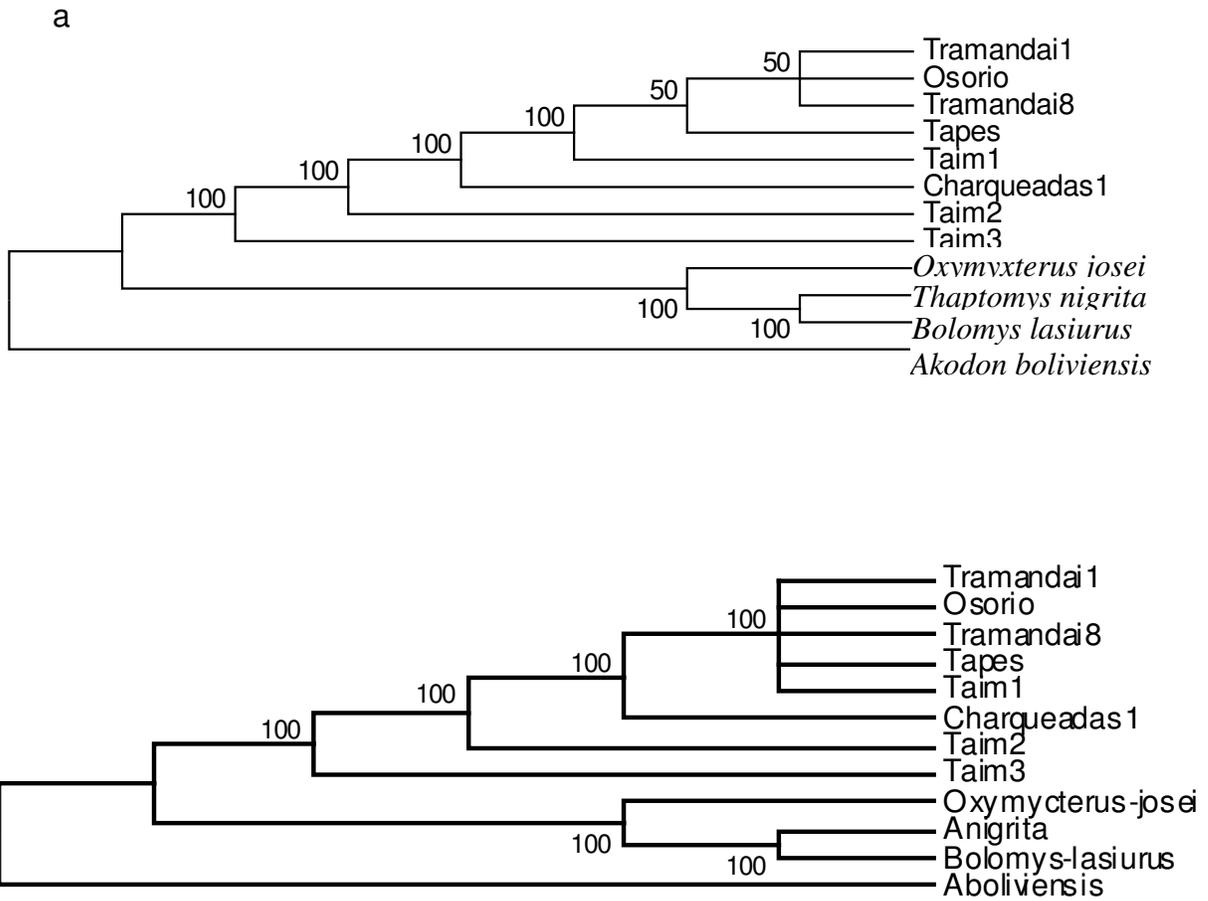


Figura I.1a: Árvore de 50% de consenso. b. Árvore de estrito consenso de  
 b Máxima Parcimônia dos oito haplótipos dos 733 pb do citocromo *b* de *D. kemp*. CI = 0,778125; RI = 0,663507; RCI = 0,516291

*Oxymyxterus iosei*  
*Thaptomys nigrita*  
*Bolomys lasiurus*  
*Akodon boliviensis*

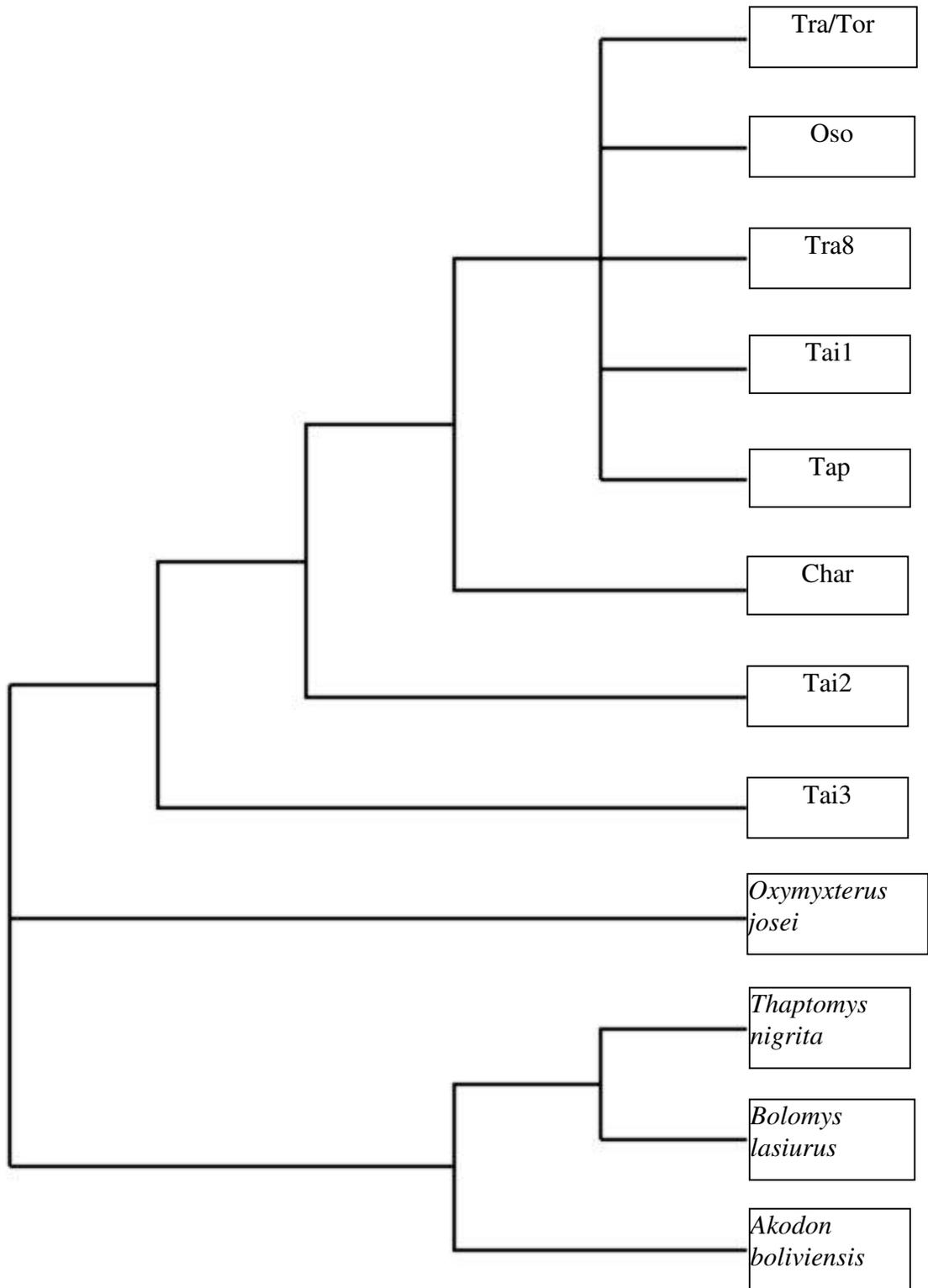


Figura I.2.: Arvore de Máxima Verossimilhança consenso escrito dos oito haplótipos dos 733 pb do citocromo *b* de *D. kempii*.

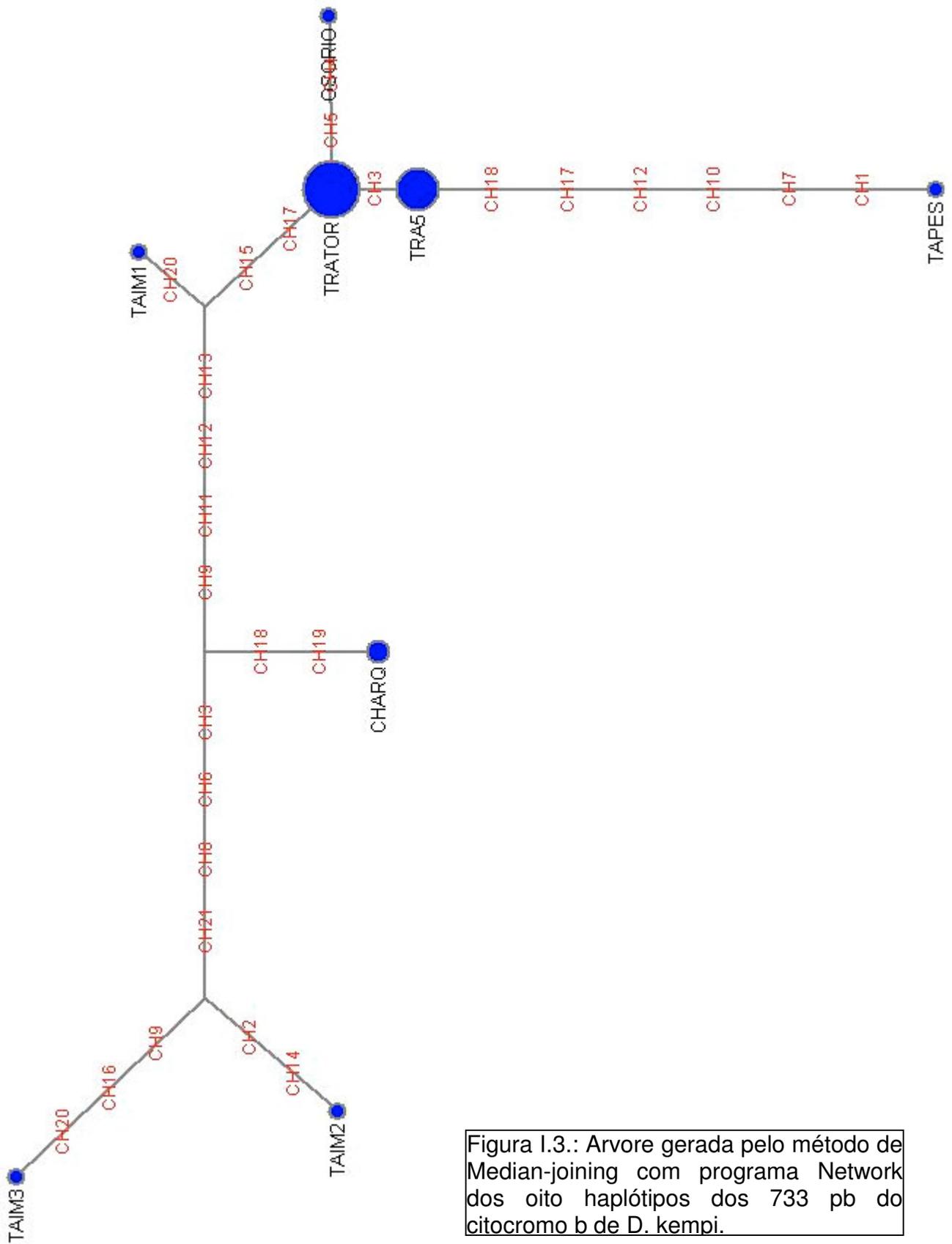


Figura I.3.: Arvore gerada pelo método de Median-joining com programa Network dos oito haplótipos dos 733 pb do citocromo b de *D. kemp*.

# **Apêndice II.**

Abreviatura	Nome científico	Número de acesso no Genbank
AkoAerosus	<i>Akodon aerosus</i>	M35703
AkoAzarae	<i>Akodon azarae</i>	U03529
AkoBoliviensis	<i>Akodon boliviensis</i>	M35691
AkoCursor	<i>Akodon cursor</i>	AF184049
ChrJelskii	<i>Chroeomys jelskii</i>	M35714
AkoJuninensis	<i>Akodon juninensis</i>	M35698
AkoKofordi	<i>Akodon kofordi</i>	M35697
AkoLindberghi	<i>Akodon lindberghi</i>	AF184057
AbrLongipilis	<i>Abrothrix longipilis</i>	U03530
AkoLutescens	<i>Akodon lutescens</i>	M35693
micMimus	<i>Microxus mimus</i>	M35710
AkoMollis	<i>Akodon mollis</i>	U03546
AkoMontensis	<i>Akodon montensis</i>	AF184055
AkoMystax	<i>Akodon mystax</i>	AF184054
ThaNigrita	<i>Thaptomys nigrita</i>	AF108666
AbrOlivaceus	<i>Abrothrix olivaceus</i>	AF027321
AkoOrophilus	<i>Akodon orophilus</i>	M35699
AkoSerrensis	<i>Akodon serrensis</i>	AF184058
AkoSiberiae	<i>Akodon siberiae</i>	U03548
AkoSubfuscus	<i>Akodon subfuscus</i>	M35695
AkoToba	<i>Akodon toba</i>	U03527
AkoTorques	<i>Akodon torques</i>	M35700
BolAmoenus	<i>Bolomys amoenus</i>	AF159283
BolUrichi	<i>Bolomys urichi</i>	U03549
BolLasiurus	<i>Bolomys lasiurus</i>	U03528
LenApicalis	<i>Lenoxus apicalis</i>	U03541
BlaBreviceps	<i>Blarinomys breviceps</i>	AF108668
JusHuanchacae	<i>Juscelinomys huanchacae</i>	AF133667
AbrAndinus	<i>Abrothrix andinus</i>	AF108671
AbrXanthorhinus	<i>Abrothrix xanthorhinus</i>	AF297902

CheMacronyx	<i>Chelemys macronyx</i>	U03533
NotEdwardsii	<i>Notiomys edwardsii</i>	U03537
PeaAnnectens	<i>Pearsonomys annectens</i>	AF108672
GeoValdivianus	<i>Geoxus valdivianus</i>	U03531
OxyJosei	<i>Oxymycterus josei</i>	AF175289
OxyIheringi	<i>Oxymycterus iheringi</i>	AF108667
OxyParamensis	<i>Oxymycterus paramensis</i>	U03536
OxyHiska	<i>Oxymycterus hiska</i>	U03542
OxyDelator	<i>Oxymycterus delator</i>	U03525
OxyAmazonicus	<i>Oxymycterus amazonicus</i>	AF454765
OxyDasytrichus	<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	AF454769
OxyQuaestor	<i>Oxymycterus quaestor</i>	AF454772
OxyJudex	<i>Oxymycterus judex</i>	AF454773
OxyRufus	<i>Oxymycterus rufus</i>	AF454775
OxyNasutus	<i>Oxymycterus nasutus</i>	AF175286
ScaTumidus	<i>Scapteromys tumidus</i>	AF108669
KunTomentosus	<i>Kunsia tomentosus</i>	AF108670

---