

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOLOGIA MOLECULAR

Filogenia e identificação de roedores Sigmodontinae através  
de marcadores moleculares: avaliação do código de barras  
de DNA.

Lívia Müller Barbosa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
da UFRGS como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre  
Março de 2012

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e teve como agentes financiadores o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

*Aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Thales, pela oportunidade, pelos quase sete anos de orientação, pela confiança e liberdade de conduzir meus trabalhos e por tornar o Laboratório de Citogenética e Evolução mais que um lugar de trabalho, mas um lugar onde amigos discutem idéias, colaboram entre si e produzem conhecimento.

Ao Pedro Estrela por me despertar a paixão por evolução de sigmodontíneos, pela ideia e incentivo de trabalhar DNA *barcoding* e pelos ensinamentos.

À Gislene Gonçalves por me ensinar desde como se extrai DNA até a rodar análises, pela paciência, pelas sempre excelentes sugestões, por manter a ordem no laboratório e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

À amiga e colega Dalila Welter por estar ao meu lado compartilhando todos os momentos desde a graduação.

Às amigas e colegas Ana Carolina Dal Berto, Darlise Lopes, Mayara Medeiros, Patrícia Langone, Samara Arsego e Tatiane Noviski pelos momentos felizes, as ótimas risadas, o apoio nas dificuldades e ajuda imensurável no laboratório.

Aos queridos colegas de laboratório, especialmente os amigos Jorge Bernardo-Silva e José Stolz, por tornarem nosso ambiente de trabalho tão prazeroso, divertido e produtivo.

Ao Luciano Silva e à Lúcia Nunes pelo excelente trabalho que é essencial para o funcionamento do laboratório.

Ao Elmo Cardoso pela competência do trabalho realizado no PPGBM.

À Morgana Eisinger, a guria mais especial que eu já conheci, pelas conversas, as discussões de ideias, a sinceridade e amizade incomparável.

Ao meu querido amigo, irmão de coração, Diulio Grings por estar ao meu lado mesmo quando eu estava deprimida, pelas conversas absolutamente sinceras, pelas muitas e muitas risadas e pela confiança depositada.

A minha avó Jandira pelo amor, pelos cuidados e por me incentivar a estudar desde pequena.

Aos meus amores Xuxa, Natasha, Kelly, Sebastian, Bartolomeu, Elvira e Anúbis por me darem muita alegria.

Aos meus pais, Ani e Fábio, pela educação, os princípios, o amor e o carinho que moldaram meu caráter e personalidade, pelo incentivo ao estudo e o suporte emocional e financeiro que permitiram eu obter esse título. Aos meus pais eu agradeço por toda a felicidade que tenho, os amo acima de tudo.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas e não mencionadas pelo apoio à realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3. INTRODUÇÃO.....	9
3.1 Roedores sigmodontíneos.....	9
3.2 <i>DNA barcoding</i> .....	10
4. OBJETIVOS.....	14
5. CAPÍTULO I: DNA barcoding of rodents reservoirs of zoonoses: distance and tree-based approaches highlight the taxonomic bottleneck.....	15
5.1 Abstract.....	16
5.2 Introduction.....	17
5.3 Material and Methods.....	20
5.4 Results.....	22
5.5 Discussion.....	25
5.6 Acknowledgments.....	31
5.7 Literature cited.....	32
Supplementary Material.....	49
6. CAPÍTULO II: Análise comparativa de marcadores moleculares para identificação e filogenia de roedores sigmodontíneos.....	55
6.1 Introdução.....	56
6.2 Material e Métodos.....	57
6.3 Resultados.....	69
6.4 Discussão.....	107
6.5 Referências bibliográficas.....	112
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115



## 1. RESUMO

Os roedores sigmodontíneos formam grupo diverso tanto em relação ao número de espécies quanto aos aspectos ecológicos e adaptativos, apresentando taxonomia complexa com muitos aspectos filogenéticos não resolvidos. O DNA *barcoding* é uma abordagem padronizada que visa à identificação de amostras em nível específico. Neste estudo sequências de dois marcadores moleculares mitocondriais, citocromo b (CYTB) e citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), e do nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) foram obtidos para 322 amostras de tecido e analisadas com sequências do Genbank por métodos probabilísticos e de distância genética para avaliar as relações filogenéticas entre os táxons e a utilidade do COI para discriminar espécies. Os diferentes métodos empregados para analisar os genes separadamente e concatenados foram congruentes de modo geral, recuperando os mesmos clados com altos valores de suporte. Utilizando-se o COI foi possível determinar em nível de espécie 12 amostras com identificações errôneas, 30 indeterminadas, 21 que estavam identificadas apenas em nível genérico e um novo táxon. As tribos descritas em estudos anteriores (Abrothrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini, Wiedomyini) foram recuperadas utilizando-se os três marcadores, todavia apresentaram baixo suporte na maioria das análises. As análises de distancia intra-específica indica que a maior parte das espécies possui o *barcoding-gap*, isto é, uma distancia intra-específica menor do que a inter-específica. Portanto, este estudo demonstra que a abordagem do DNA *barcoding* é útil para delimitar a grande maioria das espécies de roedores sigmodontíneos, mas sugere-se usar tal abordagem juntamente com procedimentos adicionais de sistemática e taxonomia em uma abordagem integrativa.



## 2. ABSTRACT

Sigmodontine rodents comprise a speciose and diverse group in ecological and adaptive aspects presenting complex taxonomy with many aspects unresolved. DNA barcoding is standardized approach which aims to identify samples in specific level. In this study sequences of two mitochondrial markers, cytochrome b (CYTB) and cytochrome c oxidase subunit I (COI), and nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) were obtained for 322 tissue samples and analyzed with Genbank sequences by probabilistic and genetic distance methods to assess phylogenetic relationships between taxa and COI utility to discriminate species. The different methods used to analyze gene separately and concatenated agree in general, recovering the same species with high support values. Species were identified to 12 samples misidentified, 30 which species were undetermined, 21 which were identified only in genus level and one new species. Tribes described in preview studies were recovered, however showed low support in most analyses. DNA barcoding approach is useful to distinguish between species, but should be used cautiously with additional procedures in a systematic and taxonomic in an integrative approach.

### 3. INTRODUÇÃO GERAL

#### 3.1 Roedores sigmodontíneos

Os roedores da subfamília Sigmodontinae, pertencentes à família Cricetidae (Steppan *et al.*, 2004), são fundamentalmente neotropicais com apenas algumas espécies ocorrendo na América do Norte. Possui ocorrência desde a Terra do Fogo até o sudeste dos Estados Unidos.

Este grupo surgiu na região Neártica entre 12.3 e 13.1 milhões de anos atrás. Após um período de tempo relativamente longo uma única linhagem de sigmodontíneos colonizou a América do Sul e devido à rápida ocupação de ampla extensão geográfica, fragmentação e adaptação, sofreu radiação adaptativa (Steppan *et al.*, 2004) que originou grande diversidade de linhagens. Algumas linhagens sofreram extinções de espécies, desaparecendo ou restando apenas um gênero atual, e outras permanecem diversas até os dias atuais (Smith & Patton, 1999). Espécies com diferentes hábitos – cursorial, semi-fossorial, semi-aquático, escansorial, arborícola – e adaptações ecológicas permitiram a ocupação dos mais variados ambientes, desde florestas, savanas, pântanos até ambientes semi-áridos; normalmente são os pequenos mamíferos mais abundantes onde ocorrem (Eisenberg, 1999). Sua diversidade também é notável: em 2005 haviam 377 espécies descritas (Wilson & Reeder, 2005) e novas espécies são frequentemente descobertas (por exemplo, Emmons & Patton, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005; Pardiñas *et al.*, 2005; Percequillo *et al.*, 2005; 2008; 2011; Costa *et al.*, 2007; Bonvicino *et al.*, 2010; Pardiñas & Teta, 2011; Rocha *et al.*, 2011).

A taxonomia de Sigmodontinae é complexa. Os gêneros são tradicionalmente classificados em nove tribos: Abrothrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini, Wiedomyini e alguns gêneros ainda não foram claramente atribuídos a uma determinada tribo sendo classificados como *incertae sedis*. As questões não resolvidas na taxonomia deste grupo de roedores envolvem o limite entre espécies, as relações filogenéticas entre os táxons e os limites e composição dos táxons elevados.

Estudos com marcadores moleculares abordando as relações filogenéticas começaram na década de 1990 (Steppan, 1995; Engel *et al.*, 1998; Smith & Patton, 1999; D'Elía, 2003; D'Elía *et al.*, 2003). Inicialmente foram utilizadas sequências do gene mitocondrial *Citocromo b* (CYTB), as quais são as mais comumente empregadas como fonte de evidência em filogenia molecular de mamíferos, e subsequentemente o éxon 1 do gene nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) (D'Elía, 2003; Weksler, 2003; D'Elía *et al.*, 2006).

Adicionalmente a questão sistemática, os roedores sigmodontíneos são foco de estudos ecológicos tendo importante papel como dispersores de sementes (Brum *et al.*, 2010). Além disso, possuem alta relevância em relação à saúde pública por serem reservatórios e transmissores de zoonoses, como a febre hemorrágica viral (Videla *et al.*, 1989; Mills *et al.*, 1991; 1992; 1994; Salazar-Bravo *et al.*, 2002) e a síndrome pulmonar de Hantavírus (Williams *et al.*, 1997; Yahnke *et al.*, 2001; Levis *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2005).

### **3.2 Código de barras de DNA (*DNA barcoding*)**

Nas últimas décadas os avanços tecnológicos proporcionaram novas ferramentas aos sistematistas, refinando a avaliação da biodiversidade do planeta. Entretanto, a facilidade com a qual as novas espécies são descritas para a ciência não se reflete na forma que os espécimes são identificados (Goldstein & DeSalle, 2011). Em outras palavras, o número de profissionais especializados na área de sistemática e taxonomia não é suficiente em relação à magnitude da biodiversidade, assim espécies são extintas antes mesmo de serem conhecidas pela ciência (Barnosky *et al.*, 2011). Nesse contexto, cunhou-se o termo “impedimento taxonômico” para se referir a falta de taxonomistas e estruturas para se estudar taxonomia, o que restringe o conhecimento da biodiversidade.

Em 2003, Paul Hebert (University of Guelph, Canadá) propôs a identificação de espécies através do sequenciamento de uma pequena região de um gene mitocondrial, caracterizado como *DNA barcoding* (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004a; Hebert *et al.*, 2004b). O *DNA barcoding* é uma ferramenta de identificação que utiliza um curto segmento padronizado de nucleotídeos para determinar a espécie de uma amostra desconhecida. Entretanto, destaca-se que o foco do *DNA barcoding* é discriminar espécies e

não estabelecer as suas relações (Hajibabaei *et al.*, 2007). Tal abordagem propôs uma forma inovadora e eficaz para rápida identificação em nível específico para uso tanto de especialistas quanto não-especialistas. Para tanto, foi selecionado o gene da subunidade I da citocromo c oxidase como *barcode* para animais. Já para plantas este gene evoluiu muito lentamente, impossibilitando o uso para a mesma finalidade. Sendo assim, duas regiões de genes cloroplastidiais, *matK* e *rbcL*, foram escolhidas ([www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding](http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding)).

O citocromo c oxidase (COI) é uma grande proteína transmembrana, altamente conservada entre as espécies, que desempenha a fosforilação oxidativa para o metabolismo (Waugh, 2007). A proteína compreende muitas subunidades de origem nuclear e três subunidades sintetizadas na mitocôndria, as quais são denominadas subunidades I, II e III. O *barcode* de animais inclui o fragmento de 648 pares de bases da região 5' do gene, um fragmento onde são raras inserções e deleções (Blaxter, 2004) e oferece as vantagens do DNA mitocondrial: taxa de mutação diferente entre as espécies, ausência de recombinação gênica, herança predominantemente materna e baixo polimorfismo ancestral. O COI já se mostrou eficaz para a identificação de vários grupos animais (Hebert *et al.*, 2003a; 2003b; 2004a; 2004b; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.* 2006; Smith *et al.* 2006; Witt *et al.*, 2006; Ekrem *et al.*, 2007; Borisenko *et al.* 2008; Lefort *et al.*, 2011; Sutou *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012).

Adicionalmente, outra vantagem é a pequena quantidade de tecido animal, suficiente para obter a sequência de COI, pois em uma única célula existe um alto número de mitocôndrias. Tal característica elimina em vários casos a necessidade de eutanásia do animal estudado; no caso de ratos é possível coletar apenas uma amostra pequena de tecido da orelha. Além disso, permite o estudo através de vestígios como fezes, pelos, sangue e fósseis recentes.

A utilização de dados moleculares, especialmente sequências de DNA para discriminar espécies, não é uma idéia inédita. A inovação do DNA *barcoding* está na padronização da região gênica, uma análise trivial para identificação e a criação de um banco de dados *online* disponibilizando sequências identificadas por taxonomistas e com uma ligação explícita ao espécime (*voucher*) depositado em uma coleção que permite, em caso de dúvida na identificação, retornar a ele.

A análise das amostras sob consulta é realizada por método de construção de árvore e de distância. A matriz de sequências de DNA é submetida à análise pelo método de *neighbor-joining* (NJ) que resulta em uma árvore, cujos agrupamentos onde existe monofilia recíproca – ou muitas vezes a simples adjacência entre ramos – são utilizados como critério de reconhecimento de espécies. As vantagens de utilizar NJ são: a rapidez na computação dos dados, a necessidade de um processador simples e o resultado definitivo, ou seja, sempre é gerada uma única árvore independentemente da ambiguidade dos dados. Além disso, é feita a avaliação das distâncias genéticas dentro e entre espécies como indicativo de diferenciação entre elas. A premissa do método de distância é a existência do denominado “*barcoding gap*”, onde a distribuição de todas as distâncias par a par co-específicas não se sobrepõe com a distribuição de todas as distâncias par a par hetero-específicas. Em outras palavras, a maior distância genética entre um par de espécimes de uma espécie será inferior a menor distância genética entre um par de espécimes de diferentes espécies, ainda que irmãos. O modelo de substituição de nucleotídeos estabelecido para quantificar a divergência entre indivíduos é a de Kimura 2-parâmetros, pois é o modelo mais efetivo quando as distâncias são baixas, sendo o caso do COI (Nei & Kumar, 2000; Hebert *et al.*, 2003a).

O sucesso na identificação das amostras sob investigação depende fundamentalmente de uma biblioteca de sequências arquivadas com identificação confiável, uma metodologia padronizada de comparação de sequências, um critério justificável e generalizável para a delimitação das espécies e um critério diagnóstico espécie-específico que permita aceitar ou refutar uma dada conjectura taxonômica (Goldstein & DeSalle, 2011). Por enquanto essas premissas ainda estão sendo validadas.

Entretanto, a metodologia do *barcoding* é também criticada na literatura, principalmente em relação aos critérios de determinação de espécie. Na abordagem de construção de árvore, seja ela baseada em estado de caráter (máxima verossimilhança, inferência Bayesiana) ou matriz de distância (NJ), a crítica reside na arbitrariedade quando se quantifica a proximidade gráfica (Will & Rubinoff, 2004; Little & Stevenson, 2007). Já na abordagem por distância a existência do “*barcoding gap*” não é sustentada por estudos recentes (Wiemers & Fiedler, 2007; Yassin *et al.*, 2010), além disso, a distância não permite a

identificação de caracteres únicos, apenas indica a proximidade numérica entre as sequências. A falha no sucesso do *DNA barcoding* também pode ocorrer devido à amostragem incompleta, o que pode levar a um agrupamento inaccurado com a sequência mais similar disponível, pois o método de distância sempre retorna um resultado positivo de identificação, mesmo que nenhuma sequência co-específica exista no banco de dados. Se uma das espécies estudadas tiver alta variabilidade intra-específica e for parcialmente amostrada, o resultado da identificação podem ser duas espécies diferentes, tanto na avaliação por distância quanto na árvore. Assim, a pesquisa com *DNA barcoding* de roedores sigmodontíneos envolve as dificuldades taxonômicas existentes, a amostragem suficiente do número de espécies e de indivíduos dentro de cada distribuição geográfica e a metodologia de análise de sequências empregada para identificar as espécies.

#### 4. OBJETIVOS

- Construir um banco de dados de sequências DNA do gene COI de diferentes espécies de sigmodontíneos utilizando amostras de coleções e disponibilizá-los em base de dados online,
- Avaliar a aplicabilidade do método de DNA *barcoding* como ferramenta para identificação de espécies de sigmodontíneos comparando a metodologia tradicional com métodos filogenéticos (máxima verossimilhança e inferência Bayesiana),
- Comparar o padrão de variação genética do gene COI com o gene mitocondrial CYTB e o nuclear IRBP em diferentes níveis taxonômicos (tribo, gênero, espécie) através de diferentes métodos de reconstrução filogenética.

## 5. CAPÍTULO I

### **DNA barcoding of rodents reservoirs of zoonoses: distance and tree-based approaches highlight the taxonomic bottleneck.**

Lívia Müller<sup>1,2</sup>, Gislene Lopes Gonçalves<sup>1,2</sup>, Pedro Cordeiro-Estrela<sup>1,2,3\*</sup>, Jorge Reppold Marinho<sup>4</sup>, Sérgio Luiz Althoff<sup>5</sup>, André Felipe Testoni<sup>5</sup>, Enrique González<sup>6</sup> and Thales R. O. de Freitas<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
3. Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Pavilhão Lauro Travassos, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, Brazil. CEP 21040-900. pedroestrela@yahoo.com, +55 21 2562-1560 / 1253
4. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
5. Universidade Regional de Blumenau
6. Museo Nacional de Historia Natural, Uruguay.

\* Corresponding author:

Artigo submetido à revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*.



## 5.1 Abstract

Species identification through DNA barcoding is a tool to be added to taxonomic procedures once validated. Applications in public health would aid the identification of zoonoses vectors and reservoirs. Species of rodents from the subfamily Sigmodontinae are known to be reservoirs of arenaviruses, hantaviruses. We used distance-based and probabilistic phylogenetic inference methods to evaluate cytochrome c oxidase subunit I (COI) performance in sigmodontine identification. A total of 130 sequences from 21 field-trapped species, mainly from southern Brazil, were generated and analyzed with 58 GenBank sequences. Preliminary analysis revealed 9.5% of field misidentifications, mainly juveniles, which were reclassified after examination of specimens and karyotypes. The mean K2P distances were 15.2% among genera and 2.4% among species. Both methods retrieved similar topologies and monophyly for most species. A 'barcoding gap' and a phylogenetic signal were recovered. We provide information for the description of a new species as well as the first COI sequence of recently described genus *Drymoreomys*. Our data supports the use of COI for species identification, especially for potential reservoirs genera *Akodon* and *Oligoryzomys*. We reinforce that the barcoding approach should be used coupled with other taxonomic and systematic procedures in an integrative framework and based on museum collections.

**Keywords:** COI, Sigmodontinae, Taxonomy, Hantavirus, Arenavirus, BrBOL.

**Funding:** Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CNPq-CAPES PROTAX Program for Taxonomy, BrBOL: Rede Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade.

## 5.2 Introduction

DNA barcoding is very likely an initiative that will significantly contribute to species identification (DeSalle, 2006). In this context, both Taxonomy and Systematics will benefit from the construction of a database of cytochrome oxidase subunit I (COI) sequences encompassing both worldwide and species-wide sampling. Such information source would enable the reliable identification of query specimens if and only if the specimens of this database are correctly identified and named. The main difficulties of this task are not only operational (e.g. resources for large-scale survey projects) but also, and mainly, taxonomic. Even if such a DNA barcode database is gathered the identification process will likely stumble upon a taxonomic bottleneck (Goldstein & DeSalle, 2011). Despite this fact, it has become clear that “DNA barcoding is a potentially powerful heuristic tool in identifying specimens of described species and generating hypotheses of new ones” (Goldstein & DeSalle, 2011). Several studies have demonstrated the effectiveness of this approach in animal groups (Hebert et al. 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Ward et al., 2005; Hajibabaei et al. 2006; Smith et al. 2006; Witt et al., 2006; Ekrem et al., 2007; Borisenko et al. 2008). In some areas where barcoding would be mostly beneficial (i.e. most biodiversity hotspots), there is a lack of scientific collections, taxonomists and funding. Thus, our goal in this study is to investigate whether DNA barcoding approach (hereafter barcoding) is a reliable tool for species identification in a developing country such as Brazil, which has a development model based on the transformation of natural landscapes which is a source of severe health problems related to zoonoses. In this context, barcoding could be a helpful taxonomic identification tool to public health, or at least part of a process of identification, as many zoonoses vectors and reservoirs are species of mice and rats which are difficult to identify. The knowledge of the exact species that is carrying harmful pathogens is essential to the studies of factors leading to occurrences (Fichet-Calvet & Rogers 2009), pathogen proliferation and transmission between animal vectors, as well as and for epidemiologic inferences as a whole.

The success of barcoding as a species identification tool, as originally envisioned, rests upon the performance of distance based methods which depend on the existence a disjunction between intra and interspecific distance

distributions, also known as 'barcoding gap' (Wiemers & Fiedler 2007 but see Lowenstein et al. 2009 and Pons et al. 2006). Besides the search for this disjunctive distribution, researchers have been looking for empirical criteria or distance threshold values to define a species limit. For mammals and birds the limit of interspecific divergence has been gambled at 2% (Hebert et al. 2003a). Although this approach is by no means a replacement of taxonomy (Ebach & Holdrege 2005), if applied cautiously among a diverse group, it can provide a reasonable criterion to detect specimens worthy of detailed taxonomic analysis (Stahls & Savolainen 2008). For example, in large scale inventories there are often dominant species, which are abundant, and rare species that require a careful taxonomic analysis. Ecologists, evolutionary biologists and taxonomists can often be overwhelmed by the amount of work arising from a biodiversity assessment (Valentini et al. 2009) or collection during disease outbreaks. Furthermore, the growth of barcode databases is a potential enhancer of fast species recognition in epidemiological studies. However, the extent to which this approach is useful in specific taxonomic groups is a matter of empirical evaluation.

Here we compare distance based analyses with probabilistic phylogenetic inference methods aimed at recovering reciprocal monophyletic groups to identify rodents from the subfamily Sigmodontinae. This is the most diverse family-level mammalian clade in the Neotropical region (Weksler 2006) with up to 377 species according to Wilson & Reeder (2005). Besides that, these rodents are important vectors and reservoirs of human diseases. Hemorrhagic fevers caused by Arenaviruses are transmitted by three species of this subfamily (*Calomys callosus*, *Calomys musculinus*, and *Zygodontomys brevicauda*; Salazar-Bravo et al. 2002). Hantaviruses, the etiological agents of Hantavirus pulmonary syndrome in the Americas, have many sigmodontine species as reservoirs. Hantavirus lineages are often associated with a single species (but see Chu et al. 2009). A total of 13 species are known reservoirs of hantaviruses and arenaviruses: *Oligoryzomys nigripes*, *O. flavescens*, *O. fornesi*, *O. stramineus*, *O. chacoensis*, *O. utiaritensis*, *O. longicaudatus*, *Necromys lasiurus*, *Holochilus sciureus*, *H. chacarius*, *Calomys laucha*, *Calomys musculinus* and *Akodon montensis* (Murúa et al. 2003, Carbajo & Pardiñas 2007, Porcasi et al. 2005, Chu et al. 2009, Goodin et al. 2009, da Rosa et al. 2010, Oliveira et al.

2011, Travassos da Rosa et al. 2011) and *Nectomys squamipes* is the host of *Schistosoma mansoni* (Martinez et al. 2008).

Taxonomic studies in sigmodontine rodents are particularly active as new species are constantly being described (Oliveira & Bonvicino 2002, Emmons & Patton 2005, Costa et al. 2007, Gonçalves et al. 2005, Pardiñas et al. 2005, Percequillo et al. 2005, 2008, 2011, Bonvicino et al. 2010, Pardiñas & Teta 2011, Rocha et al. 2011). Also, large-scale taxonomic revisionary works are reshaping systematic knowledge of this group (Weksler 2006, Jayat et al. 2010). In this context, molecular markers allow us to test taxonomic hypotheses using mostly selectively neutral characters (Smith & Patton 1999, Weksler 2003, 2006, D'Elía 2003, Almeida et al. 2007).

In this study we examine the sequence variability of COI in sigmodontine species, particularly from the southern Brazilian region, where most of the cases of hantavirus outbreaks have been reported (Raboni et al. 2009, Oliveira et al. 2011). We also evaluate the existence of a 'barcoding gap' between intra- and interspecific distances, and test the monophyly of putative species. Such information was used to infer the utility of barcoding in species identification by combining this dataset with sequences deposited in GenBank. We also emphasize the benefits and pitfalls of this approach both from an economic and taxonomic perspective. Finally, the phylogenetic and phylogeographical use of COI in evolutionary approaches is discussed.

### 5.3 Material and Methods

#### **Sampling**

A total of 130 sigmodontine specimens encompassing 21 species were collected from different localities in Brazil (Table 1); most of them have vouchers and additional information (e.g. diploid number). Tissues obtained from environmental assessments studies without vouchers and in which no additional information was provided, represent 36% of our sampling. Species surveyed are representative of the major tribes: Oryzomyini, Akodontini, Thomasomyini and Phyllotini. Besides that, species with contentious allocation at tribal level, such as *Juliomys pictipes*, *Rhagomys rufescens*, *Delomys dorsalis* and *D. sublineatus*, were also analyzed. All sequences have been deposited in Genbank (accession numbers GU938873-GU939002 See supplementary material, table 1). Sigmodontine sequences available in GenBank were also added in our analysis (n=58) (See supplementary material, table 2).

#### **DNA extraction, PCR amplification and sequencing**

DNA was extracted from tissues samples (heart, liver, muscle, kidney and ear) stored at -20°C in 100% ethanol using CTAB (Doyle & Doyle 1987) and phenol chloroform (Sambrook et al. 1989) protocols. The 648-bp target region of COI was amplified through polymerase chain reaction (PCR) using primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). Amplification reaction followed Folmer et al. (1994). PCR products were purified with a mix of Shrimp Alkaline Phosphatase and Exonuclease (GE Healthcare, EUA) and sequenced in an ABI 377<sup>®</sup> (Applied Biosystems Inc.).

#### **Data analysis**

Sequences were visually checked in Chromas and aligned in Clustal X software implemented in MEGA 4.2 (Kumar et al. 2008). Sequence divergence was calculated using Kimura two-parameter (K2P) base substitution model (Kimura 1980). A distance matrix was processed to calculate divergence averages (standard errors and ranges) at different taxonomic levels. A Neighbor-joining (NJ) tree based on K2P distances was reconstructed to represent the

pattern of divergence among taxa using ape library (Paradis et al. 2004) in software R (R development core team, 2008).

Distances were analyzed among different taxonomic hierarchical levels. Intraspecific, interspecific, intrageneric and intertribal mean distances were calculated. Species with one specimen or with high divergence were excluded from the intraspecific analysis. Distance distributions were evaluated through histograms. The 'barcoding gap' was evaluated by comparing intraspecific and interspecific distance distribution assessed through kernel density estimation. The area of superimposition of density curves was calculated.

Model selection of sequence evolution was estimated using MrAIC (Nylander 2004). Phylogenetic reconstruction was carried out using Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). ML trees were obtained with PHYML v2.4.4 (Guindon & Gascuel 2003) and BI using MrBayes3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) with 2 independent runs of 4 chains for 5000000 generations. Branch support was assessed through bootstrap and posterior probabilities. Distance based and probabilistic trees were compared to evaluate monophyletic groups. The Neotomine species *Peromyscus maniculatus* was used as outgroup in all analysis (obtained from Genbank, accession number EF568630).

## 5.4 Results

### Barcode divergences between species

We first performed a distance based analysis evaluating intraspecific and intrageneric genetic distances. Results showed a few highly discrepant values, i.e. some intraspecific values were much higher than expected (>10%). Then we compare neighbor-joining distance based trees to phylogenetic trees obtained from the same data set and both results are in agreement in relation to clusters and bootstrap/posterior probability, with few exceptions in support values for the topology of three genera: BI and ML inferences showed *Calomys* monophyletic with *Delomys* with posterior probability of 1 whereas NJ clustered *Calomys* with *Rhagomys* with 35 of bootstrap. Some specimens, all detached with an asterisk in table 1, are clearly misidentified specimens (see below). These were reclassified either as a known species if the sequence was monophyletic with a coherent group of sequences or as unknown taxon if it was not “closely” related to anyone. Here we describe K2P distances values highlighting differences after specimen reclassification (Fig.1).

K2P distance between all specimens ranged from 0 and 29.3% (mean( $\bar{x}$ )=14.7%, variance( $\sigma^2$ ) = 0.002) with a bimodal frequency distribution, one mode centered near 0% and the other around 15% (data not shown). Intraspecific variation ranged from 0 to 16.7%. Histograms for each species showed a mode around 0%. Before reclassification the mean distance was 3.2% ( $\sigma^2$ =0.002) and 2.4% ( $\sigma^2$ =0.001) afterwards. Intrageneric mean distance values retrieved more differences. Before reclassification it varied between 14.2% and 17.6% ( $\bar{x}$ =16.1%,  $\sigma^2$ =0.0002), and after, between 11.2% and 19.7% ( $\bar{x}$ =15.2%,  $\sigma^2$ =0.0007). Eleven genres (*Deltamys*, *Handleyomys*, *Juliomys*, *Necromys*, *Nectomys*, *Nephelomys*, *Oxymycterus*, *Rhagomys*, *Scapteromys*, *Sooretamys*, and *Thaptomys*) were not surveyed in this analysis since they are represented by only one species in our sampling.

*Oligoryzomys vegetus* (EU095457) and *O. fulvescens* (EU095455-56) were removed from the data set because they clustered together and were not related to other *Oligoryzomys* spp. We also removed *Necromys urichi* (EU095420) due to very discrepant phylogenetic position with regards to other members of its tribe, the Akodontini. Intertribal distances calculated among Akodontini,

Oryzomyini and *incertae sedis* group varied between 15.4 and 17.2% ( $\bar{x}$ =16.1%,  $\sigma^2$ =0.0001). However, after reclassification the values ranged from 9.6 to 14.6% ( $\bar{x}$ =12.3%,  $\sigma^2$  =0.0006). Histograms from each taxa showed a bimodal distribution, all with one small mode centered at 0% and another mode around the mean (data not shown).

After reclassification intraspecific genetic distance for *A. montensis*, *E. russatus*, *C. expulsus*, *C. tener*, *D. dorsalis* and *D. sublineatus* were reduced. A total, 23 species presented intraspecific genetic distances <2% (Fig. 1).

### **Model selection and phylogenetic analysis**

The model of sequence evolution selected with the Bayesian Information Criteria was HKY+I+G. The results of parameter estimation of the proportion of invariant sites, transition/transversion ratios, nucleotide frequencies, gamma shape parameter and likelihood of Maximum likelihood and Bayesian inference are compared in Table 2. Likelihood scores stabilized after 100000 generations in the Bayesian inference. PSRF attained 1 indicating convergence between runs. A total of 490 000 samples were kept for summary statistics.

### **Barcode recovery**

Similar topologies from NJ, BI and ML trees were retrieved, varying mainly in relation to branch support values. Monophyletic groups were recovered for most of the surveyed species with high probability support. As the resulted tree was too large we present it in four subtrees corresponding mainly to taxonomic groupings: Akodontini (Fig. 2), Phyllotini, Thomasomyini and *incertae sedis* (Fig. 3) and Oryzomyini (Fig. 4 and 5). Some specimens grouped within unrelated ones (*Calomys expulsus* CRB2582, *Calomys* sp. 1787 and 1788, *Delomys dorsalis* 9954, *D. sublineatus* 9994, *Euryoryzomys russatus* JR458 and JR459, *Oligoryzomys nigripes* DG15 and *Scapteromys* sp. 1007), representing a conflict between phylogenetic position and field identifications. Two samples of *Juliomys pictipes* did not cluster. *Akodon* sp PCE24 was monophyletic with other *Akodon montensis* sequences and presented low K2P distance (<2%) with other *A. montensis* sampled revealing its species identification. The sample 9629 probably belongs to the genus *Oligoryzomys*; although it clustered with other *Oligoryzomys* sequences it was not nested within any of the species sampled.



### Phylogenetic utility of COI

Sigmodontine species are generally arranged into tribes that represent monophyletic groups of genera (D'Elía et al. 2007). A well supported molecular phylogeny to evaluate the likelihood of these tribes is still lacking, although many studies have made inferences regarding phylogenetic relationships within major tribes (e.g. Weksler 2006, D'Elía 2003). Based on our results the molecular marker COI showed a phylogenetic signal at the tribal level. Most Oryzomyini species were monophyletic. Considering misidentifications, all species are monophyletic except samples identified as *Sooretamys angouya*, *Oligoryzomys fulvescens* and *O. vegetus*. However, *Oecomys*, *Transandinomys* and *Neacomys* are also monophyletic, *Oligoryzomys*, *Euryoryzomys*, *Oryzomys* and *Hylaeamys* were paraphyletic, although these relations could be an artifact due to misidentification from specimens whose sequences are available in Genbank or/and to the lack of phylogenetic signal for COI. Thomasomyini and Phyllotini tribes were each represented by only one monophyletic genus, *Rhiphidomys* and *Calomys* respectively. *Incertae sedis* species *Delomys dorsalis* and *Delomys sublineatus* were monophyletic with *Calomys* with a posterior probability of 1. *Rhagomys rufescens* was monophyletic with *Delomys* and *Calomys* with a posterior probability of 0.93. Akodontini species were divided in two monophyletic groups, one containing most of its species (all of them monophyletic) and the other with *Necromys lasiurus* and *Thaptomys nigrita*. All *Akodon* spp. were monophyletic except *Akodon* sp.2, which was sister group with *Deltamys* sp.

## 5.5 Discussion

The present study tested the use of COI sequences for taxonomic identification with distance based and probabilistic phylogenetic inference methods for sigmodontine rodents. Most of the species and genera were recovered as monophyletic groups. Our sampling, a phylogenetic signal of COI sequences, distance patterns provided enough information for the identification of major reservoir species for which taxonomic identification at the species level is not straightforward as *Akodon*, *Oligoryzomys* and *Calomys*. In the following sections we discuss several aspects that are necessary for the barcoding initiative to be successful.

### **Misidentifications, integrative taxonomy and the taxonomic bottleneck**

Most of the taxonomic identifications of specimens were correct and based on external characters. Identification was made mainly by mammalogists with several years of field experience but without a strict taxonomic background. Some of the identifications were made by undergraduate students during student projects. Misidentified specimens represent 9.5 % of the sample. In the present work, barcoding for sigmodontine rodents can clearly improve correct identification percentages and serve as a crosschecking procedure.

Misidentifications were detected either on discrepant intraspecific distances ranges and/or phylogenetic position. Specimens clustered within unrelated ones and their genetic distances were higher than intraspecific values expected (Table 3). We considered these specimens as misidentified instead of incomplete lineage sorting, introgression or current gene flow because the species are reasonably established through taxonomic work that involved data from different sources such as cytogenetic, morphology, morphometric and geographic distribution. This point highlights the importance of basic research and complete museum collections as reference to support barcoding studies and clarify dubious results.

Two specimens of *Euryoryzomys russatus* (JR458 and JR459) were monophyletic and related to 24 *Oligoryzomys nigripes*. These samples were obtained from ear tissue and there are no vouchers available to confirm

identification. We consider that these specimens identified in the field only by external morphology are in fact *O. nigripes*, as overall appearance (i.e. long hind feet, higher tail/body length, small size) of *E. russatus* juveniles are similar to *O. nigripes*. Specimen DG15 previously identified as *O. nigripes* clustered together with *O. flavescens* indicating a clearly field misidentification, which happen to occur between these species.

*Akodon azarae* JR328 and JR329, *Calomys* sp. 1787 and 1788 and *Akodon* sp. 2 A17 grouped together, therefore we classified all as *A. azarae*. *Calomys* sp. was previously identified as a species from Cerrado biome. However these sequences were monophyletic with *A. azarae* whose distribution is limited to southern Brazil and does not occur in the Cerrado biome. *Akodon* sp.2 was thought to be a new *Akodon* species from field notes. Eight from 9 samples previously identified as such *Akodon* sp.2 were monophyletic and seems to be more related to *Deltamys kempfi* than to other *Akodon* species; only the specimen A17 clustered with *A. azarae*.

A total of 10 samples of *Euryoryzomys russatus* were monophyletic with *Delomys dorsalis* 9954 and *D. sublineatus* 9994. These two *Delomys* sequences were collected in Blumenau, Santa Catarina state, are more related to three *E. russatus* collected in the same locality. Karyotypes of the two specimens showed diploid numbers of  $2n=82$  and  $72$  respectively, the same described for both species whereas *E. russatus* has  $2n=80$ . Since simple chromosome counting could be difficult, these discrepancies are plausible and could be clarified with karyotype comparison, however, the karyotypes from samples 9954 and 9994 are not available. Analysis of museum specimens 9994 and 9954 showed they are juveniles, reinforcing field misidentification hypothesis. Other 12 *D. dorsalis* specimens collected in Rio Grande do Sul state formed a monophyletic group, as well other two *D. sublineatus* sequences, and both were sister groups. The assumption of misidentification is the most likely, even if these species show clear external diagnostic characters. This example clearly shows the need of an integrative taxonomic approach.

In our sampling, one of the specimens 9792 clustered with a specimen of *Mus musculus* and and unknown specimen (1007) with low support. After examination of the specimen its identification was confirmed by morphological characters as *Drymoreomys albimaculatus* a recently described genus

(Percequillo, Weksler and Costa 2011) from mid altitude Atlantic forest of São Paulo and Santa Catarina States. This point highlights the need of very intense efforts to build DNA barcoding libraries for the identification of rare taxa and the need of genuine collaboration with taxonomist for the correct naming of sequences.

### **Distribution expansions and species discovery**

*Calomys expulsus* showed a cohesive group, but one specimen (CRB 2582) clustered together with *C. tener*, revealing a field misidentification that were reclassified. Differentiation between *Calomys* spp. are not obvious (Salazar-Bravo et al. 2002, Almeida et al. 2007, Haag et al. 2007, Cordeiro-Estrela et al. 2006, 2008, Bonvicino et al. 2010). Misidentification between *C. expulsus* and *C. tener* is not surprising, as both species are similar, without refined analyzes. The two species are often diagnosed on the basis of overall size but have shown significant overlap in this character (Cordeiro-Estrela et al. 2006). These two species can also be recognized through morphometric analysis (Bonvicino & Almeida 2000, Cordeiro-Estrela et al. 2006). *Calomys expulsus* and *C. tener* have the same diploid number, but they can be separated by karyotype because they differ in fundamental number and in the abundance and distribution of constitutive heterochromatin. According to Almeida et al. (2007) the distribution of *C. tener* encompasses the Cerrado biome. Haag et al. (2007) collected one specimen in Quintão (29°40'S, 50°12'W), along the coast of Rio Grande do Sul, expanding the knowledge of its distribution. Our specimen was captured in Alegrete, a grassland area which is isolated from other specimens of the distribution by a belt of the Atlantic forest that encompasses all three Brazilian southern states. This finding was clearly surprising and indicates either an introduction of *C. tener* in southern grasslands or a possible past connection between southern grasslands known as Campos Sulinos biome and the Cerrado savana-like grasslands during past climatic fluctuations.

Our barcoding results also support the recognition of a new Akodontine species. Although we performed analysis based only on ear tissue samples, the collector (Ezequiel Pedó, IBAMA) already had hypothesized that these specimens could represent a new taxa. Previously assigned as *Akodon* sp. 2, it was recovered as the sister group of *Deltamys kempi*, with high posterior

probability (= 0.96) support. All other *Akodon* species grouped together in a cohesive cluster (Fig.3). Furthermore, genetic distance data between *Akodon* spp. is less than 8%, whereas between *Deltamys kempfi* and *Akodon* sp.2 it ranges between 10-11%; between *Akodon* sp.2 and *Akodon* species is 12-16%. The karyotype of the new species is  $2n=34$ , according to the collector, whereas *D. kempfi* has a multiple sexual chromosomal system presenting  $2n=35, 36, 37$  or  $38$  (Fronza et al. 1981, Castro et al. 1991, Sbalqueiro et al. 1984). *Akodon* and *Deltamys* belong to the same tribe and can be differentiated by karyotype comparison: a singular small chromosome pair is present in all *Akodon*, which is absent in *D. kempfi*. D'Elia (2003) using nuclear and mitochondrial genes found *D. kempfi* as the sister group of *Akodon* spp.

This example clearly shows the potential of barcoding efforts to provide additional characters for the recognition of new species. Nevertheless, the formal description of species depends on the evidence of additional characters for taxa delimitation, evaluation of available names, and most importantly, the analysis of type specimens. This taxonomic bottleneck could be partly overcome if initiatives were undertaken to barcode type specimens which are the name bearers.

These examples show two important points. First, that there is a large number of material collected either by inexperienced mammalogists or in projects not focused on taxonomy that are grossly misidentified. This fact is often overlooked and/or understated in the literature and has profound implications for epidemiological surveillance and biodiversity assessments. There is a clear need not only to have more taxonomists but to provide taxonomic training to non-taxonomists who often underestimate diversity and complexity in the identification process. The identification of rare species, juveniles, or species complexes and the correct application of names or the identification of new species are tasks that require not only a solid taxonomic background, but also many years of field and museum experience. Second, and most importantly, we stress that the number of taxonomists will be an important bottleneck for the success of DNA barcoding as an identification tool. Identifying misclassifications requires background knowledge about the taxons' distribution, phylogenetic position and range of variation. Likewise, building solid sequences databases for identification as iBOL is proposing will require not only that databases be built with the close collaboration of taxonomists, but also to include either holotypes or

topotypes specimens which will name the monophyletic groups or clusters analyzed.

### **COI sequence divergence: increasing sampling**

Few studies investigated COI sequence divergence in rodents, especially regarding the barcoding approach. Borisenko et al. (2008) studied small mammals (opossums, bats and rodents) from Guiana and Suriname and suggested the effectiveness of such target region in species identification.

Mitochondrial genes cytochrome b and COI has resembling divergence values. Cytochrome b has historically been used to identify mammal species. Within species of Akodontines cytochrome b sequence divergence is 0.18-0.53 (same population) and 0.26-11.37 (different populations); different species in the same genus present 1.23-14.72 and different genera 9.26-24.34 (D'Elía 2003). Baker and Bradley (2006) compiled cytochrome b sequence distances obtained by several authors and then calculated the mean for rodents; the mean intraspecific divergence was 1.5 (0.0-4.7) and intergeneric was 10.9 (4.9-16.9). Our results confirmed a similarity of distance patterns among COI and published cytochrome b divergences.

We found that interspecific genetic variation exceeds intraspecific variation to such an extent that a gap exists (Fig.7), which enables the assignment of unidentified individuals to their species with a negligible error rate (< 1%). However the gap was not congruent to 2% proposed by Hebert et al. (2003a) and, most relevant, it might be an artifact of incomplete sampling. It is important to note that sampling of different populations is necessary to be more precise in determining variability of a specific gene, especially in species with wide geographical distribution. *Oligoryzomys nigripes*, *Akodon montensis* and *Thaptomys nigrita* were the species with the widest coverage of their geographical distribution and likely representing different populations. Nevertheless it did not cover the whole distribution area of these species. All of them presented monophyletic groups with low genetic intraspecific pairwise distances and a mean below 2%. The threshold will most likely vary between different taxonomic groups and for sigmodontine the values found could be due to recent rapid radiation, an evaluation with adequate sampling will clarify this issue. DNA barcoding must be supported by evolutionary studies and knowledge

of diversification processes of target species to understand the patterns of barcoding results.

In this study we used distance-based and probabilistic methods to analyze the data set. Both results presented here are in agreement, improving barcode identification. As long as previous phylogenetic and sequence distances studies with known species are available, pairwise distance values can serve to distinguish them or indicate a specimen that deserves particular attention. Research must rely on potential problems of this approach such as different evolution rates between species, which was not detected in this study since none of the species presented long discrepant branches. Insufficient sampling can reveal biased results, for example lack of specimens from different localities of its distribution can induce low intraspecific values generating false barcoding gaps.

### **Phylogenetic relationships**

A phylogenetic signal was recovered by COI sequences. Chantangsi & Lynn (2008) demonstrated COI potential for both species identification and phylogenetic relationships. In our study individuals from Oryzomyini and Phyllotini tribes grouped together, and Akodontini splits in two groups. However, internal evolutionary relationships remains unclear compared with previous works based on others molecular markers and morphological characters (D'Elía 2003, Weksler 2003, D'Elía et al. 2006, Weksler et al. 2006). Within the group species of Akodontini the relations were similar as evidenced by nuclear and mitochondrial sequences (D'Elía 2003), [[A.montensis+A.azarae] D. kempii]. *Incertae sedis* species collected in Atlantic Forest biome clustered with Phyllotini tribe which is composed predominantly by Andean species. This relation supports the hypothesis of past connection between species that today lives in Atlantic Forest and Andean region, a biogeographical pattern also described for birds, frogs and sigmodontine genuses *Akodon* and *Rhagomys* (Percequillo et al. 2011, Steiner-Souza et al. 2008).

On the other hand, relationships inside tribe Oryzomyini does not agree with results obtained by Weksler et al. (2006) based on IRBP sequences and 99 morphological characters. The genera *Oryzomys*, *Oligoryzomys*, *Hylaeamys* and *Euryoryzomys* are not monophyletic according to COI sequences, however this is probably a consequence of misidentified specimens whose sequences were

made available in Genbank. As there is no museum voucher information linked to these sequences, taxonomic identification based on morphology could not be realized. The building of a barcode database with explicit voucher specimen information will certainly be a major scientific contribution of barcoding projects by allowing in depth taxonomic works after barcoding screenings.

## **5.6 Acknowledgments**

We are deeply indebted to Ezequiel Pedó, Daniel Galiano, Lena Geise, Cibele Bonvicino, Marcelo Passamani and Renata Pardini for samples. This research was financially supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). PCE was funded by CAPES-CNPq-PROTAX and by PDJ CNPq FIOCRUZ. The following work was supported by BrBOL: Brazilian Barcoding of Life.



## 5.7 Literature cited

- Almeida, F., Bonvicino, C., Cordeiro-Estrela, P., 2007. Phylogeny and temporal diversification of the genus *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae): implications for the biogeography of open/dry biomes of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42: 449-466.
- Baker, R.J., Bradley, R.D., 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J. Mamm.* 87: 643-662.
- Bonvicino, C.R., Almeida, F.C., 2000. Karyotype, morphology and taxonomic status of *Calomys expulsus* (Rodentia: Sigmodontinae). *Mammalia* 64: 339-351.
- Bonvicino, C.R., de Oliveira, J.A., Gentile, R., 2010. A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Eastern Brazil. *Zootaxa* 2336: 19-25.
- Borisenko, A.V., Lim, B.K., Ivanova, N.V., Hebert, P.D.N., 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 471-479.
- Carbajo, A.E., Pardiñas, U.F.J., 2007. Spatial distribution model of a hantavirus reservoir, the long-tailed colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*), in Argentina. *J. Mamm.* 88: 1555-1568.
- 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.
- Chantangsi, C., Lynn, D.H., 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 979-987.
- Chu, Y.K., Goodin, D., Owen, R.D., Koch, D., Jonsson, C.B., 2009. Sympatry of 2 hantavirus strains, Paraguay, 2003-2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1977-1980.
- Cordeiro-Estrela, P., Baylac, M., Denys, C., Marinho-Filho, J., 2006. Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. *J. Mamm.* 87: 1270-1279.
- Cordeiro-Estrela, P., Baylac, M., Denys, C., Polop, J., 2008. Combining geometric morphometrics and pattern recognition to identify interspecific patterns of skull variation: case study in sympatric Argentinian species of genus *Calomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontina). *Biol. J. Linn. Soc.* 94: 365-378.
- Costa, L.P., Pavan, S.E., Leite, Y.L.R., Fagundes, V., 2007. A new species of *Juliomys* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from the Atlantic forest of southeastern Brazil. *Zootaxa* 1463: 21-37.
- da Rosa, E.S.T., de Lemos, E.R.S., de Almeida Medeiros, D.B., Simith, D.B., de Souza Pereira, A., Elkhoury, M.R., Mendes, W.S., Vidigal, J.R.B., de Oliveira, R.C., d'Andrea, P.S., Bonvicino, C.R., Cruz, A.C.R., Nunes, M.R.T., da Costa Vasconcelos, P.F., 2010. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhao, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 1952-1955.
- De Salle, R., 2006. Species Discovery versus Species Identification in DNA Barcoding Efforts: Response to Rubinoff. *Conserv. Biol.* 20: 1545-1547.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.

D'Elía, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-32.

D'Elía, G., Luna, L., González, E.M., Patterson, B.D., 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 558-564.

D'Elía, G., Pardiñas, U.F.J., Teta, P., Patton, J.L., 2007. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71:187–194.

Ebach, M.C., Holdrege, C., 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434: 697.

Ekrem, T., Willassen, E., Stur, E., 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Mol Phylogenet Evol* 43: 530-542.

Emmons, L.H., Patton, J.L., 2005. A New Species of *Oryzomys* (Rodentia: Muridae) from Eastern Bolivia. *Am. Mus. Nov.* 3478: 1-26.

Fichet-Calvet, E., Rogers, D.J., 2009. Risk Maps of Lassa Fever in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e388.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.

Fronza, M., Wainberg, R., Cataleo, G., 1981. Multiple sex chromosomes in *Deltamys kemp* (Rodentia: Cricetidae): Preliminary steps towards the establishment of the XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>/XX system. *Caryologia* 34: 457-466.

Goldstein, P.Z., De Salle, R., 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* 33: 135-147.

Gonçalves, P.R., Almeida, F.C., Bonvicino, C.R., 2005. A new species of *Wiedomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Brazilian Cerrado. *Mamm. Biol.* 70: 46-50.

González, E.M., 2000. Un nuevo género de roedor sigmodontino de Argentina y Brasil (Mammalia, Rodentia, Sigmodontinae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Mont.* 12: 1-12.

Goodin, D.G., Paige, R., Owen, R.D., Ghimire, K., Koch, D.E., Chu, Y.K., Jonsson, C.B., 2009. Microhabitat characteristics of *Akodon montensis*, a reservoir for hantavirus, and hantaviral seroprevalence in an Atlantic forest site in eastern Paraguay. *J. Vector. Ecol.* 34: 104-113.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.

- Haag, T., Muschner, V.C., Freitas, L.B., Oliveira, L.F.B., Langguth, A.R., Mattevi, M.S., 2007. Phylogenetic relationships among species of the genus *Calomys* with emphasis on South American lowland taxa. *J. Mamm.* 88: 769-776.
- Hajibabaei, M., Singer, G., Hickey, D., 2006. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49: 851-854.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: S96-S99.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M., 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 10: 1657-1663.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jayat, J.P., Ortiz, P.E., Salazar-Bravo, J., Pardiñas, U.F.J., D'Elía, G., 2010. The *Akodon boliviensis* species group (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Argentina: species limits and distribution, with the description of a new entity. *Zootaxa* 2409: 1-61.
- Kimura, M., 1980. Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 522-526.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings Bioinf.* 9: 299-306.
- Lowenstein, J.H., Amato, G., Kolokotronis, S.-O., 2009. The Real *maccoyii*: Identifying Tuna Sushi with DNA Barcodes – Contrasting Characteristic Attributes and Genetic Distances. *PLoS ONE* 4: e7866.
- Martinez, E.M., Costa-Silva, M., Neves, R.H., de Oliveira, R.M.F., Machado-Silva, J.R., 2008. Biological implications of the phenotypic plasticity in the *Schistosoma mansoni* - *Nectomys squamipes* model. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 50: 229-232.
- Murúa, R., González, L.A., Lima, M., 2003. Population dynamics of rice rats (a Hantavirus reservoir) in southern Chile: feedback structure and non-linear effects of climatic oscillations. *Oikos* 102: 137-145.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrAIC.pl. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira, J., Bonvicino, C., 2002. A new species of sigmodontine rodent from the Atlantic forest of eastern Brazil. *Acta Theriol.* 47: 307-322.
- Oliveira, R.C., Padula, P.J., Gomes, R., Martinez, V.P., Bellomo, C., Bonvicino, C.R., Lima, D.I.F., Bragnolo, C., Caldas, A.C.S., D'Andrea, P.S., Lemos, E.R.S., 2011.

Genetic Characterization of Hantaviruses Associated with Sigmodontinae Rodents in an Endemic Area for Hantavirus Pulmonary Syndrome in Southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3: 301-314.

Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.

Pardiñas, U.F.J., D'Elía, G., Cirignoli, S., Suarez, P., 2005. A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from northern campos grasslands of Argentina. *J. Mamm.* 86: 462-474.

Pardiñas, U.F.J., Teta, P., 2011. On the taxonomic status of the Brazilian mouse *Calomys anoblepas* Winge, 1887 (Mammalia, Rodentia, Cricetidae). *Zootaxa* 2788: 38-44.

Paresque R, Christoff AU, Fagundes V 2009. Karyology of the Atlantic forest rodent *Juliomys* (Cricetidae): A new karyotype from southern Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 32: 301-305.

Percequillo, A.R., Carmignotto, A.P.J., Silva, M.J., 2005. A new species of *Neusticomys* (Ichthyomyiini, Sigmodontinae) from central Brazilian Amazonia. *J. Mamm.* 86: 873-880.

Percequillo, A.R., Hingst-Zaher, E., Bonvicino, C.R., 2008. Systematic Review of Genus *Cerradomys* Weksler, Percequillo and Voss, 2006 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with Description of Two New Species from Eastern Brazil. *Am. Mus. Nov.* 3622: 1-46.

Percequillo, A.R., Weksler, M., Costa, L.P., 2011. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. *Zool. J. Linn. Soc.* 161: 357-390.

Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D., Vogler, A.P., 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst. Biol.* 55: 595-609.

Porcasi, X., Calderón, G.E., Lamfri, M., Scavuzzo, M., Sabbatini, M.S., Polop, J.J., 2005. Predictive distribution maps of rodent reservoir species of zoonoses in Southern America. *Mastozool. Neotrop.* 12: 199-216.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008. Available from: <http://www.R-project.org>.

Raboni, S.M., Hoffmann, F.G., Oliveira, R.C., Teixeira, B.R., Bonvicino, C.R., Stella, V., Carstensen, S., Bordignon, J., D'Andrea, P.S., Lemos, E.R.S., Santos, C.N.D.D., 2009. Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Parana (southern Brazil). *J. Gen. Virol.* 90: 2166-2171.

Rocha, R.G., Ferreira, E., Costa, B.M.A., Martins, I.C.M., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Fonseca, C., 2011. Small mammals of the mid-Araguaia River in central Brazil, with the description of a new species of climbing rat. *Zootaxa* 2789: 1-34.

Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W., Bowen, M.D., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Yates, T.L., 2002. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1: 191-199.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning - A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sbalqueiro, I.J., Mattevi, M.S., Oliveira, L.F.B., 1984. Na  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  mechanism of sex determination in a South American rodent, *Deltamys kempi* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 38: 50-55.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. *J. Mamm. Evol.* 6: 89-128.

Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 3657-3662.

Sparks, J.S., Smith, W.L., 2006. *Sicyopterus lagocephalus*: Widespread species, species complex, or neither? A critique on the use of molecular data for species identification. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 400-402.

Stahls, G., Savolainen, E., 2008. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 46: 82-87.

Steiner-Souza, F., Cordeiro-Estrela, P., Percequillo, A.R., Testoni, A.F., Althoff, S.L., 2008. New records of *Rhagomys rufescens* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic forest of Brazil. *Zootaxa* 1824: 28-34.

Travassos da Rosa, E.S., Medeiros, D.B.A., Nunes, M.R.T., Simith, D.B., de Souza Pereira, A., Elkhoury, M.R., Lavocat, M., Marques, A.A.R., Via, A.V., D'Andrea, P., Bonvicino, C.R., Lemos, E.R.S., Vasconcelos, P.F.C., 2011. Pygmy rice rat as potential host of castelo dos sonhos hantavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1527-1530.

Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24: 110-117.

Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1847-1857.

Weksler, M., 2003. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 331-349.

Weksler, M., 2006. Phylogenetic relationships of Oryzomyine Rodents (Muroidea: Sigmodontinae): separate and combined analyses oh morphological and molecular data. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 296: 1-149.

Weksler, M., Percequillo, A.R., Voss, R.S., 2006. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *Am. Mus. Nov.* 3537: 1-29.

Wiemers, M., Fiedler, K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4: 1-16.

Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press.

Witt, J.D.S., Threlloff, D.L., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.* 15: 3073-3082.

**Table I**

List of sigmodontine species, specimens and localities surveyed in this study.

<b>Taxa</b>	<b>Sample ID</b>	<b>Locality</b>
<i>Akodon azarae</i>	JR328, JR329	Alegrete, RS, BR
<i>Akodon montensis</i>	JR338 JR407 DG21, DG22, DG23 JR386, JR389 JR197, JR198, JR199, JR203,  JR264, JR461, JR535 JR335, JR336 9826, 9595	Barracão, RS, BR Erechim, RS, BR Passo Fundo, RS, BR Barracão, RS, BR Terra de Areia, RS, BR  Ronda Alta, RS, BR Blumenau, SC, BR
<i>Akodon paranaensis</i>	JR411 6844, 6963	Erechim, RS, BR São Domingos, SC, BR
<i>Akodon sp.1</i>	PCE24	Margarida do Sul, RS, BR
<i>Akodon sp.2</i>	A7, A10, A17*, A24, A25, A26, A29,  A33, A43	S. F. de Paula, RS, BR
<i>Calomys expulsus</i>	LBCE1547, LBCE1548 CRB2732, CRB2733 LG408 CRB2374 LG443 CRB2582* 1787*, 1788*	Caetitê, BA, BR Correntina, BA, BR Mucugê, BA, BR Mimoso de Goiás, GO, BR Itinga, MG, BR BR BR
<i>Calomys sp</i>		
<i>Calomys sp.nov</i>	LBCE5556	Capitão Andrade, MG, BR
<i>Calomys tener</i>	JR405	Alegrete, RS, BR
<i>Delomys dorsalis</i>	AB6, AB10, AB519 JR207, JR229, JR230, JR290,  JR349, JR527, JR536, JR538 DD2, DD3, DD40 9954* JR224	São Paulo, BR Terra de Areia, RS, BR  S. F. de Paula, RS, BR Blumenau, SC, BR Unknown, BR
<i>Delomys sublineatus</i>	9331, 9950, 9994*	Blumenau, SC, BR
<i>Deltamys kempii</i>	PCE05, PCE06, PCE11, PCE12,  PCE13	Rocha, UY
<i>Euryoryzomys russatus</i>	JR194, JR205, JR208, JR281,  JR297, JR298, JR299, JR458*, JR459* 9409, 9695, 9773	Terra de Areia, RS, BR  Blumenau, SC, BR
<i>Juliomys pictipes</i>	9667*, 9735	Blumenau, SC, BR
<i>Necromys lasiurus</i>	JR346 6859	Rondinha, RS, BR Blumenau, SC, BR
<i>Oligoryzomys</i>	JR332	Alegrete, RS, BR
<i>flavescens</i>		
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	JR202, JR209, JR210, JR258,  JR259, JR467 JR339 JR409 DG00, DG01, DG05C, DG06,  DG15* JR337 JR363 JR425, JR426, JR457, JR518 OLN31, ON1, OPN52, OPN55,	Terra de Areia, RS, BR  Barracão, RS, BR Erechim, RS, BR Passo Fundo, RS, BR  Ronda Alta, RS, BR Terra de Areia, RS, BR S. F. de Paula, RS, BR

	OPN57, OPN58, OPN59, OPN61, OPN64, OPN87	
	9600	Blumenau, SC, BR
	6884	São Domingos, SC, BR
<i>Oxymycterus sp.</i>	9792*	Blumenau, SC, BR
<i>Rhagomys rufescens</i>	9908, 9921	Blumenau, SC, BR
<i>Scapteromys sp</i>	1007*	S. J. dos Pinhais, PR, BR
<i>Sooretamys angouya</i>	JR196	Terra de Areia, RS, BR
	9793	Blumenau, SC, BR
<i>Thaptomys nigrita</i>	JR372	Derrubadas, RS, BR
	TN3	S. F. de Paula, RS, BR
	6559	Blumenau, SC, BR
<b>Sp sp</b>	9629	Unknown, BR

Specimens with \* received other taxonomy identification after preliminary analysis. BA, Bahia; BR, Brazil; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; SC, Santa Catarina; UY, Uruguay.

**Table II**

Comparison between results of Maximum likelihood and Bayesian inference. Mean and variance are represented by X and  $\sigma^2$ , respectively.

<b>Model</b>	<b>Maximum likelihood HKY</b>	<b>Bayesian Inference HKY</b>
Proportion of invariant	0.338	X=0.359688
Transition/transversion ratio	4.695	$\sigma^2=0.000388$ X=6.076899
"A" Nucleotide frequency	0.28535	$\sigma^2=0.104496$ X=0.317278
"C" Nucleotide frequency	0.26002	$\sigma^2=0.000152$ X=0.279264
"G" Nucleotide frequency	0.16086	$\sigma^2=0.000074$ X=0.073416
"T" Nucleotide frequency	0.29378	$\sigma^2=0.000014$ X=0.330042
Ln Likelihood	-14115.49548	$\sigma^2=0.000090$ -14225.06



Discrete gamma model	YES	YES
Gamma shape parameter	0.712	X=0.521552
		$\sigma^2=0.000390$

---

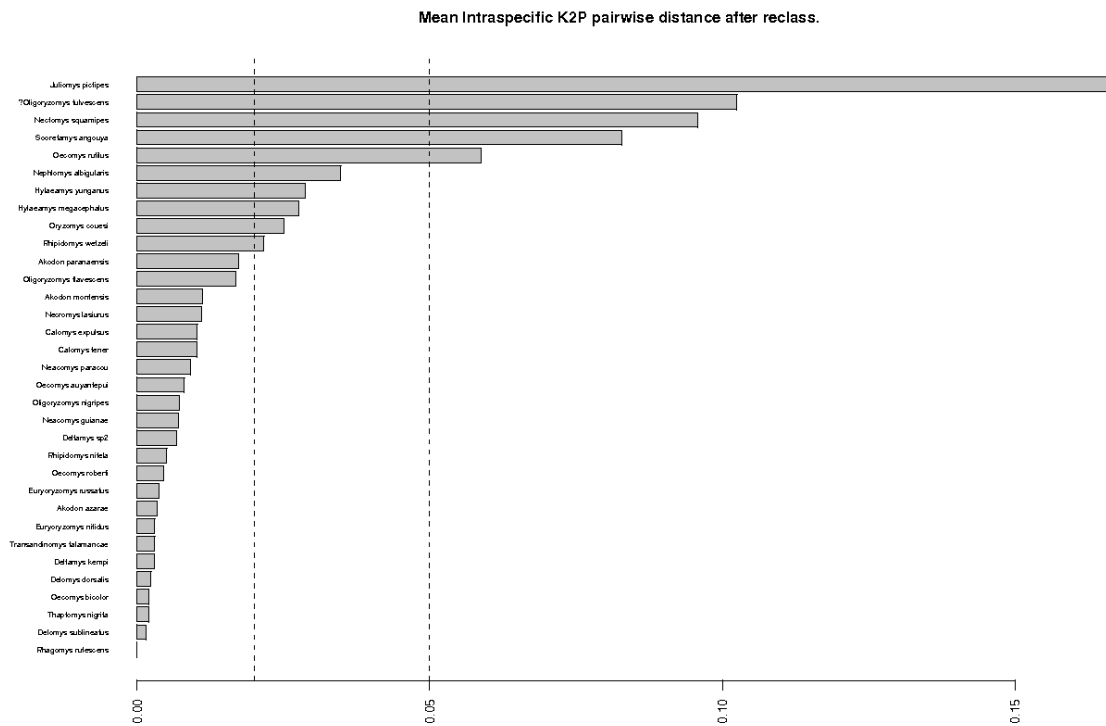
**Table III**

Specimens reclassified after previous analysis. Field identification was different from barcode identification then additional data were added to molecular results to determine correct species.

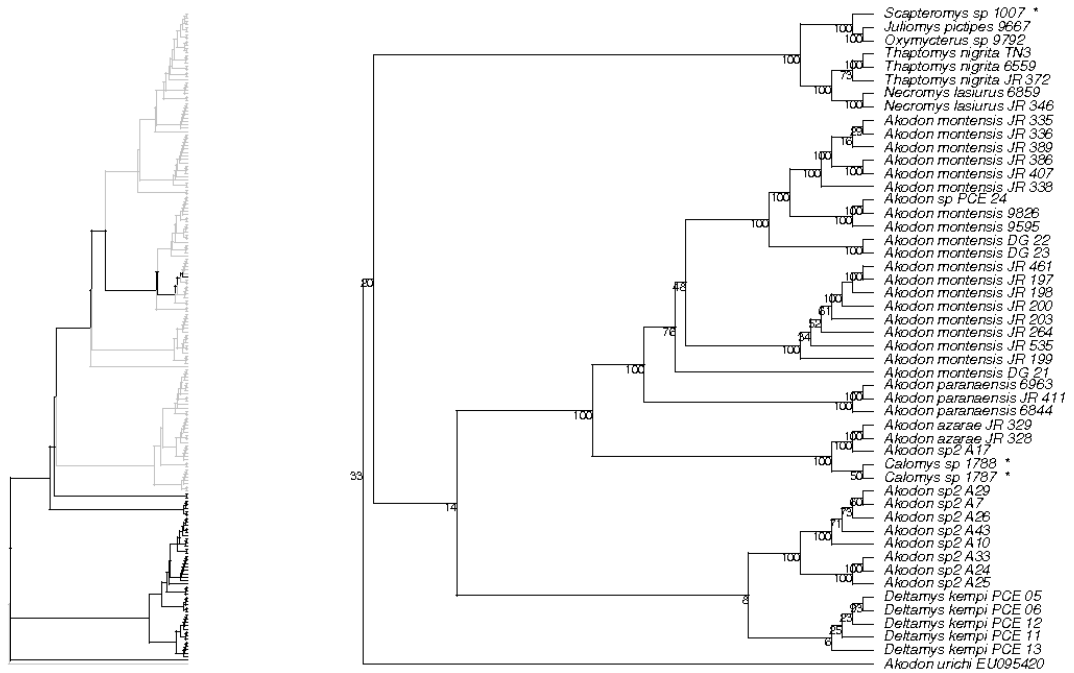
Field identification	Barcoding identification	2 n	Cs	Reclassification reason
<i>Akodon sp2</i> A17	<i>Akodon azarae</i>	-	RS, BR	<i>Akodon</i> is a speciose genus with difficult differentiation without genetic markers such as karyotype.
<i>Calomys sp</i> 1787	<i>Akodon azarae</i>	-	BR	Identification by undergraduates
<i>Calomys sp</i> 1788	<i>Akodon azarae</i>	-	BR	
<i>Calomys expulsus</i> CRB2582	<i>Calomys tener</i>	-	BR	Common misidentification due to similarity.
<i>Delomys dorsalis</i> 9954	<i>Euryoryzomys russatus</i>	8	SC, BR	Juveniles specimens collected.
<i>Delomys sublineatus</i> 9994	<i>Euryoryzomys russatus</i>	7 2	SC, BR	
<i>Euryoryzomys russatus</i> JR458	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	-	RS, BR	<i>E. russatus</i> juveniles are similar to <i>O. nigripes</i> adults.
<i>Euryoryzomys</i>	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	-	RS,	

<i>russatus</i> JR459			BR	
<i>Juliomys pictipes</i> 9667	<i>Mus musculus</i>	3 6	SC, BR	Likely field material change. Identified by BLAST
<i>Oligoryzomys nigripes</i> DG15	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	-	RS, BR	<i>O. nigripes</i> and <i>O. flavescens</i> are morphologically similar.
<i>Oxymycterus</i> sp 9792	<i>Drymoreomys albimaculatus</i>	-	SC, BR	New genus described this year
<i>Scapteromys</i> sp 1007	Unknown	3 6	PR, BR	

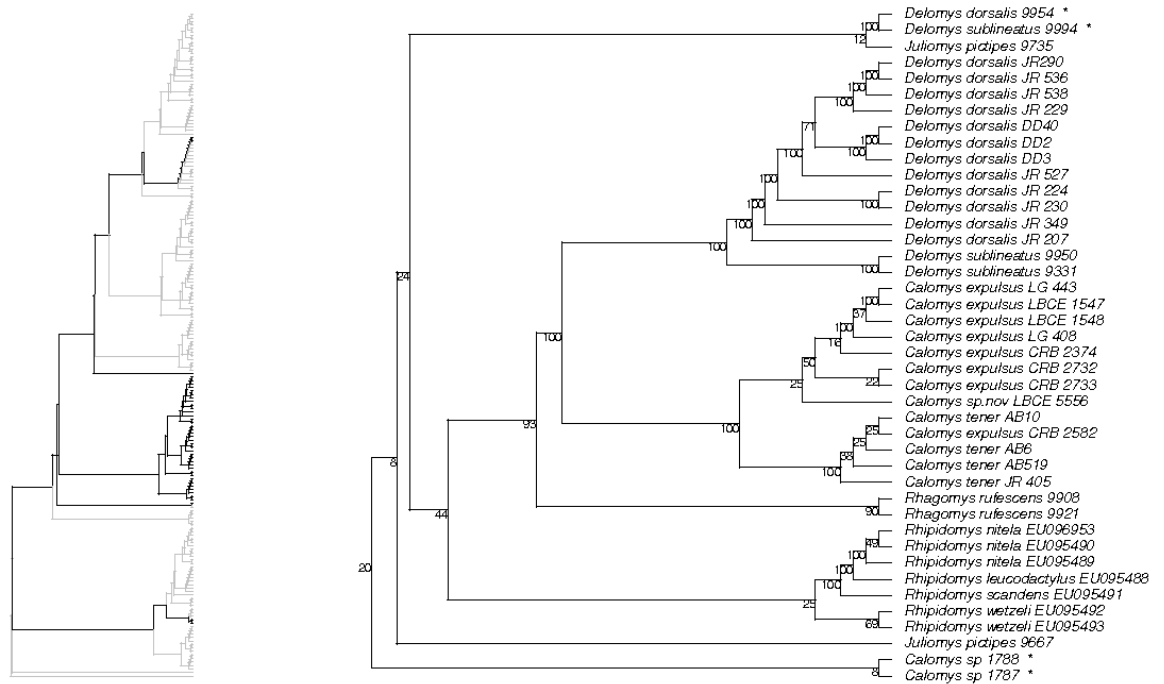
Dn., diploid number; Cs., collection site; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; BR, Brazil.



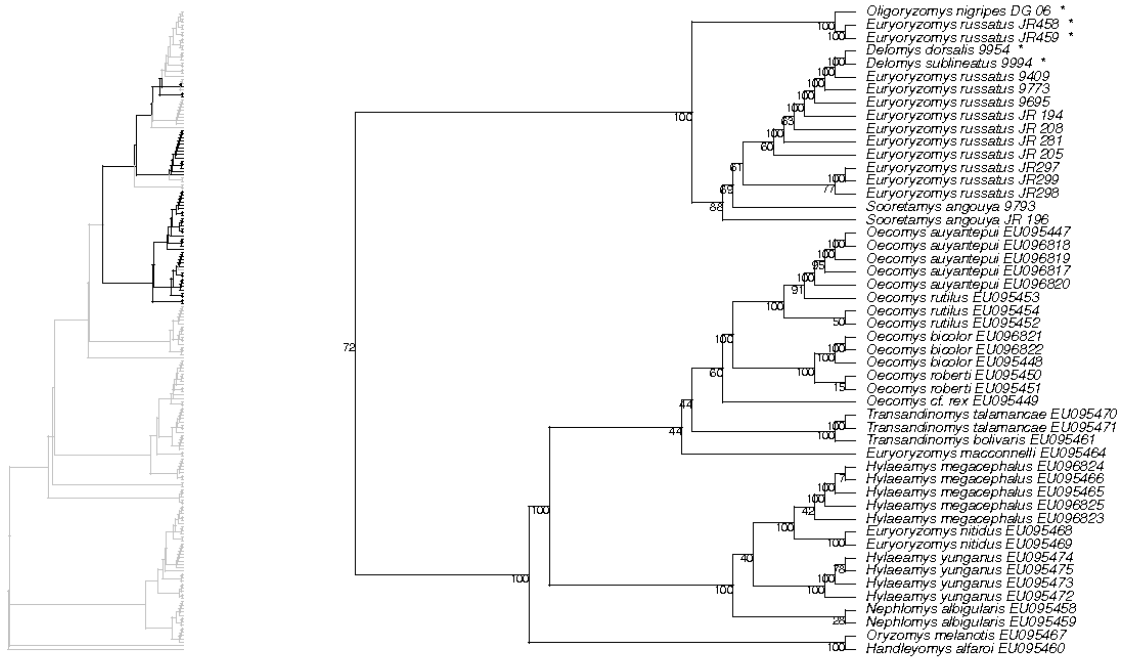
**Figure 1.** Mean intraspecific K2P pairwise distance after reclassification. First line highlights the suggested 2% limit of intraspecific variation and second 5% of genetic divergence. Twenty-three species are below this limit and 10 are above. The area of superimposition between the curves is shaded.



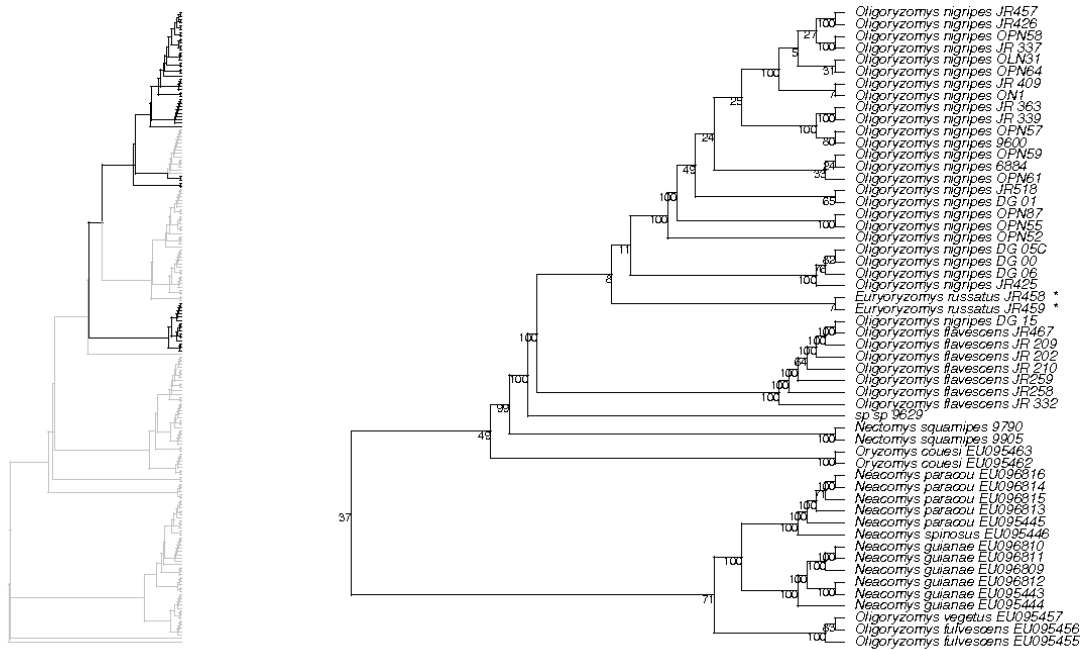
**Figure 2.** Bayesian phylogeny inferred from 648 bp of COI sigmodontine gene sequences. On the left is the complete tree with all samples. Branches in black are represented in the tree on the right. The subtree includes specimens from the tribe Akodontini. Specimens identified with asterisk are present in more than one figure. Posterior probabilities of node support values are figured as percentages.



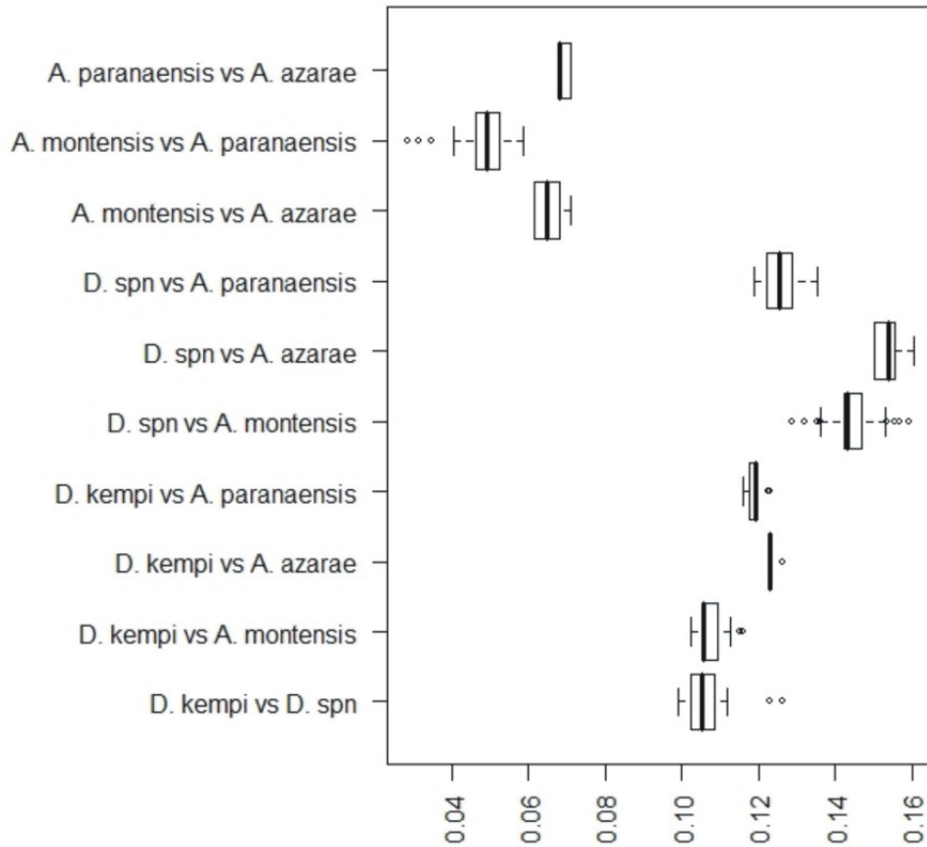
**Figure 3.** Bayesian phylogeny inferred from 648 bp of COI sigmodontine gene sequences. On the left is the complete tree with all samples. Branches in black are represented in the tree on the right. The subtree includes specimens which have been classified as *incertae sedis* at the tribal level (*Delomys dorsalis*, *D. sublineatus*, *Rhagomys rufescens* and *Juliomys pictipes*), as well as specimens from the tribe Phyllotini (*Calomys spp*) and Thomasomyini (*Rhipidomys spp*). Specimens identified with asterisk are present in more than one tree figure. Posterior probabilities of node support values are figured as percentages.



**Figure 4.** Bayesian phylogeny inferred from 648 bp of COI sigmodontine gene sequences. On the left is the complete tree with all samples. Branches in black are represented in the tree on the right. The subtree includes specimens from the tribe Oryzomyini (part 1). Specimens identified with asterisk are present in more than one tree figure. Posterior probabilities of node support values are figured as percentages.

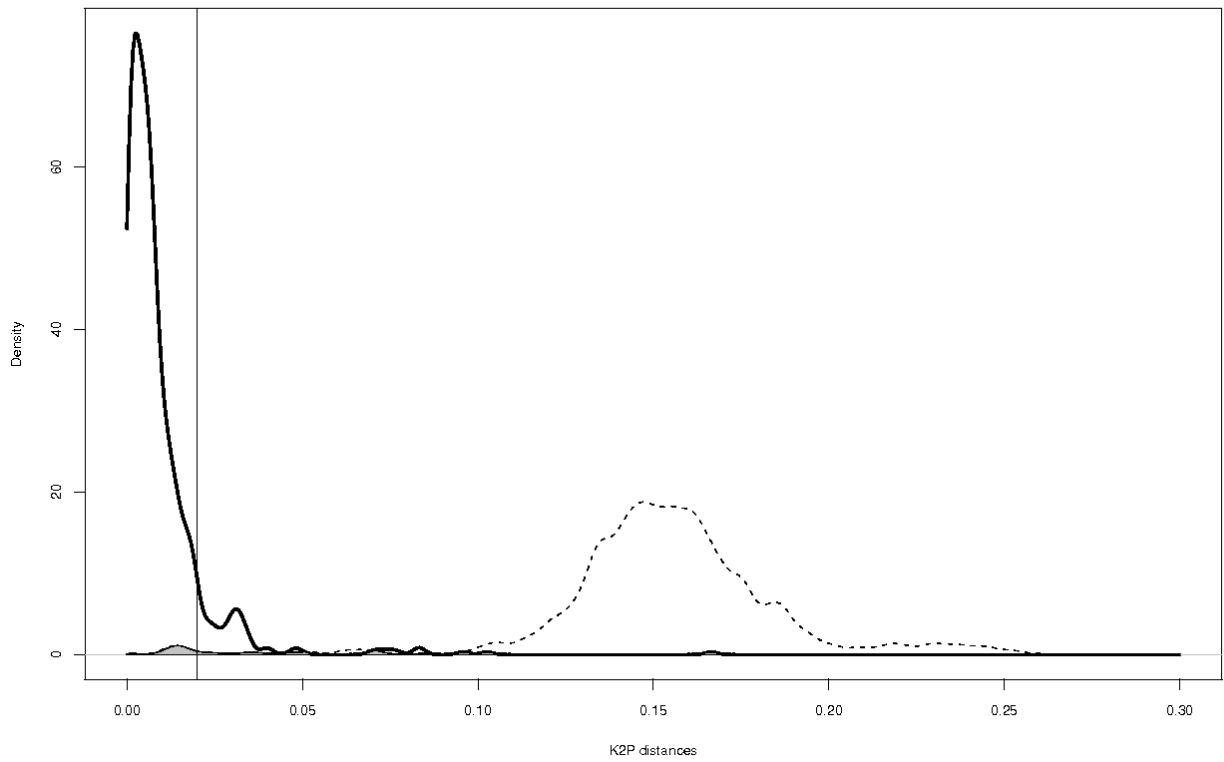


**Figure 5.** Bayesian phylogeny inferred from 648 bp of COI sigmodontine gene sequences. On the left is the complete tree with all samples. Branches in black are represented in the tree on the right. The subtree includes specimens from the tribe Oryzomyini (part 2). Specimens identified with asterisk are present in more than one tree figure.



**Figure 6.** Comparison among K2P genetic distances of *Deltamys kempi*, *Deltamys* sp. (D.spn) and *Akodon* species. Distance between *Deltamys* sp and *Akodon* species exceeds *Akodon* intrageneric distance and it is higher than difference between *Deltamys kempi* and *Akodon* species. New species could belong to *Deltamys* genus or represent a new genus.

Inter and Intraspecific distances



**Figure 7.** Intra (continuous line) and interspecific (stippled line) pairwise genetic distances based on K2P model. Overlap between the distances is represented in grey. The limit of 2% proposed by Hebert (2003a) was highlighted.



## Supplementary Material

**Table II** : GenBank accession numbers, field number and species of sigmodontine rodents sequences in this study.

<b>GenBank accession</b>	<b>Field identification</b>	<b>Species</b>
GU938873	DG21	<i>Akodon montensis</i>
GU938874	DG22	<i>Akodon montensis</i>
GU938875	DG23	<i>Akodon montensis</i>
GU938876	DG06	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938877	DG00	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938878	DG05	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938879	A7	<i>Akodon sp2</i>
GU938880	A17	<i>Akodon azarae</i>
GU938881	A24	<i>Akodon sp2</i>
GU938882	A26	<i>Akodon sp2</i>
GU938883	A25	<i>Akodon sp2</i>
GU938884	A29	<i>Akodon sp2</i>
GU938885	9792	<i>Drymoreomys albimaculatus</i>
GU938886	DG01	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938887	JR518	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938888	JR425	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938889	JR426	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938890	JR457	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938891	DG15	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938892	JR467	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938893	JR258	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938894	JR259	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938895	JR299	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938896	JR297	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938897	JR298	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938898	JR458	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938899	JR459	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938900	JR290	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938901	DD40	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938902	DD3	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938903	DD2	<i>Delomys dorsalis</i>

GU938904	JR230	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938905	JR349	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938906	JR538	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938907	JR229	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938908	TN3	<i>Thaptomys nigrita</i>
GU938909	JR372	<i>Thaptomys nigrita</i>
GU938910	6559	<i>Thaptomys nigrita</i>
GU938911	1787	<i>Akodon azarae</i>
GU938912	1788	<i>Akodon azarae</i>
GU938913	PCE24	<i>Akodon montensis</i>
GU938914	PCE11	<i>Deltamys kemp</i>
GU938915	PCE12	<i>Deltamys kemp</i>
GU938916	PCE13	<i>Deltamys kemp</i>
GU938917	PCE05	<i>Deltamys kemp</i>
GU938918	PCE06	<i>Deltamys kemp</i>
GU938919	JR461	<i>Akodon montensis</i>
GU938920	JR197	<i>Akodon montensis</i>
GU938921	JR198	<i>Akodon montensis</i>
GU938922	JR200	<i>Akodon montensis</i>
GU938923	JR199	<i>Akodon montensis</i>
GU938924	JR203	<i>Akodon montensis</i>
GU938925	JR264	<i>Akodon montensis</i>
GU938926	JR335	<i>Akodon montensis</i>
GU938927	JR336	<i>Akodon montensis</i>
GU938928	JR338	<i>Akodon montensis</i>
GU938929	JR386	<i>Akodon montensis</i>
GU938930	JR389	<i>Akodon montensis</i>
GU938931	JR535	<i>Akodon montensis</i>
GU938932	9826	<i>Akodon montensis</i>
GU938933	9595	<i>Akodon montensis</i>
GU938934	JR407	<i>Akodon montensis</i>
GU938935	CRB2582	<i>Calomys tener</i>
GU938936	LG443	<i>Calomys expulsus</i>
GU938937	LG408	<i>Calomys expulsus</i>
GU938938	LBCE1548	<i>Calomys expulsus</i>
GU938939	LBCE1547	<i>Calomys expulsus</i>
GU938940	LBCE5556	<i>Calomys sp.new</i>

GU938941	CRB2374	<i>Calomys expulsus</i>
GU938942	CRB2732	<i>Calomys expulsus</i>
GU938943	CRB2733	<i>Calomys expulsus</i>
GU938944	JR405	<i>Calomys tener</i>
GU938945	JR536	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938946	JR224	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938947	9954	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938948	JR207	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938949	JR527	<i>Delomys dorsalis</i>
GU938950	9994	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938951	9331	<i>Delomys sublineatus</i>
GU938952	9950	<i>Delomys sublineatus</i>
GU938953	9629	Unknown
GU938954	JR205	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938955	9409	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938956	JR281	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938957	JR208	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938958	9773	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938959	JR194	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938960	9695	<i>Euryoryzomys russatus</i>
GU938961	9793	<i>Sooretamys angouya</i>
GU938962	JR196	<i>Sooretamys angouya</i>
GU938963	9735	<i>Juliomys pictipes</i>
GU938964	9667	<i>Mus musculus</i>
GU938965	9908	<i>Rhagomys rufescens</i>
GU938966	9921	<i>Rhagomys rufescens</i>
GU938967	9905	<i>Nectomys squamipes</i>
GU938968	9790	<i>Nectomys squamipes</i>
GU938969	9600	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938970	OLN31	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938971	6884	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938972	OPN61	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938973	OPN59	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938974	OPN58	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938975	JR409	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938976	JR337	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938977	JR363	<i>Oligoryzomys nigripes</i>

GU938978	ON1	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938979	JR339	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938980	OPN52	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938981	OPN55	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938982	OPN64	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938983	OPN87	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938984	OPN57	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU938985	JR209	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938986	JR202	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938987	JR210	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938988	JR332	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
GU938989	JR328	<i>Akodon azarae</i>
GU938990	JR329	<i>Akodon azarae</i>
GU938991	JR411	<i>Akodon paranaensis</i>
GU938992	6844	<i>Akodon paranaensis</i>
GU938993	6963	<i>Akodon paranaensis</i>
GU938994	A33	<i>Akodon sp2</i>
GU938995	A43	<i>Akodon sp2</i>
GU938996	A10	<i>Akodon sp2</i>
GU938997	JR346	<i>Necromys lasiurus</i>
GU938998	6859	<i>Necromys lasiurus</i>
GU938999	1007	Unknown
GU939000	AB6	<i>Calomys tener</i>
GU939001	AB519	<i>Calomys tener</i>
GU939002	AB10	<i>Calomys tener</i>

**Table II** : Accession numbers and species of sigmodontine sequences available in Genbank before this research.

<b>Accession number</b>	<b>Species</b>
EU095420	<i>Akodon urichi</i>
EU095443	<i>Neacomys guianae</i>
EU095444	<i>Neacomys guianae</i>
EU095445	<i>Neacomys paracou</i>
EU095446	<i>Neacomys spinosus</i>

EU095447	<i>Oecomys auyantepui</i>
EU095448	<i>Oecomys bicolor</i>
EU095449	<i>Oecomys cf. rex</i>
EU095450	<i>Oecomys roberti</i>
EU095451	<i>Oecomys roberti</i>
EU095452	<i>Oecomys rutilus</i>
EU095453	<i>Oecomys rutilus</i>
EU095454	<i>Oecomys rutilus</i>
EU095455	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>
EU095456	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>
EU095457	<i>Oligoryzomys vegetus</i>
EU095458	<i>Nephelomys albigularis</i>
EU095459	<i>Nephelomys albigularis</i>
EU095460	<i>Handleyomys alfaroi</i>
EU095461	<i>Transandinomys bolivaris</i>
EU095462	<i>Oryzomys cousei</i>
EU095463	<i>Oryzomys cousei</i>
EU095464	<i>Euryoryzomys macconelli</i>
EU095465	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
EU095466	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
EU095467	<i>Oryzomys melanotis</i>
EU095468	<i>Euryoryzomys nitidus</i>
EU095469	<i>Euryoryzomys nitidus</i>
EU095470	<i>Transandinomys talamancae</i>
EU095471	<i>Transandinomys talamancae</i>
EU095472	<i>Hylaeamys yunganus</i>
EU095473	<i>Hylaeamys yunganus</i>
EU095474	<i>Hylaeamys yunganus</i>
EU095475	<i>Hylaeamys yunganus</i>
EU095488	<i>Rhipidomys leucodactylus</i>
EU095489	<i>Rhipidomys nitela</i>

EU095490	<i>Rhipidomys nitela</i>
EU095491	<i>Rhipidomys scandens</i>
EU095492	<i>Rhipidomys wetzeli</i>
EU095493	<i>Rhipidomys wetzeli</i>
EU096809	<i>Neacomys guianae</i>
EU096810	<i>Neacomys guianae</i>
EU096811	<i>Neacomys guianae</i>
EU096812	<i>Neacomys guianae</i>
EU096813	<i>Neacomys paracou</i>
EU096814	<i>Neacomys paracou</i>
EU096815	<i>Neacomys paracou</i>
EU096816	<i>Neacomys paracou</i>
EU096817	<i>Oecomys auyantepui</i>
EU096818	<i>Oecomys auyantepui</i>
EU096819	<i>Oecomys auyantepui</i>
EU096820	<i>Oecomys auyantepui</i>
EU096821	<i>Oecomys bicolor</i>
EU096822	<i>Oecomys bicolos</i>
EU096823	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
EU096824	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
EU096825	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
EU096953	<i>Rhipidomys nitela</i>

---

## 6. CAPÍTULO II

### **Análise comparativa de marcadores moleculares para identificação e filogenia de roedores sigmodontíneos**

Lívia Müller<sup>1,2</sup>, Gislene L. Gonçalves<sup>1,2</sup>, Pedro Cordeiro-Estrela<sup>1,2,3\*</sup>, Jorge R. Marinho<sup>4</sup>, Sérgio L. Althoff<sup>5</sup>, André F. Testoni<sup>5</sup>, Enrique González<sup>6</sup> & Thales R. O. Freitas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Pavilhão Lauro Travassos, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, Brazil. CEP 21040-900. pedroestrela@yahoo.com, +55 21 2562-1560 / 1253

<sup>4</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

<sup>5</sup>Universidade Regional de Blumenau

<sup>6</sup>Museo Nacional de Historia Natural, Uruguay.

\* Corresponding author:

*Manuscrito em preparação*

## **6.1 Introdução**

Os roedores sigmodontíneos possuem alta riqueza de espécies, representando a mais diversa linhagem de mamíferos no nível de família da região Neotropical (Weksler, 2003). Também, apresentam uma notável diversidade de adaptações ecológicas que os permitiram ocupar a maioria dos biomas sul-americanos.

A taxonomia e a sistemática da subfamília Sigmodontinae foi foco de diversos estudos moleculares nas últimas décadas (Steppan, 1995; Engel *et al.*, 1998; Smith & Patton, 1999; D'Elía, 2003; D'Elía *et al.*, 2003; Weksler, 2003; D'Elía *et al.*, 2006), entretanto diferentes aspectos da complexa taxonomia do grupo permanecem não resolvidos, como os limites entre as espécies, as relações filogenéticas entre os táxons e os limites e composição dos táxons elevados.

Os gêneros são tradicionalmente classificados em nove tribos (Abrothrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini) e alguns, como *Delomys*, *Euneomys*, *Irenomys*, *Juliomys* e *Rhagomys* não foram definitivamente atribuídos a nenhuma tribo sendo classificados como *incertae sedis*.

Nesse contexto este estudo pretende avaliar a aplicabilidade do DNA *barcoding* como ferramenta de identificação para essas espécies, pois muitas são crípticas ou de difícil distinção pela simples observação de caracteres morfológicos externos. Além disso, pretende-se avaliar as relações filogenéticas das espécies de sigmodontíneos coletadas principalmente nos biomas brasileiros da Mata Atlântica e Cerrado através de métodos probabilísticos de inferência filogenética e de distância genética de sequências separadas e concatenadas de dois marcadores moleculares mitocondriais, citocromo b (CYTB) e citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), e um nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) juntamente com sequências disponíveis no banco de dados do Genbank.

## **6.2 Material e Métodos**

### **Amostragem**

Foram utilizadas 322 amostras de tecido de roedores sigmodontíneos disponibilizados por pesquisadores brasileiros, coletados em diferentes localidades, abrangendo principalmente a região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do



país (Tabelas 1 e 2). Os tecidos foram constituídos por fígado, músculo, coração, rim ou orelha. A maioria das amostras foi previamente identificada em nível de espécie, entretanto, algumas apenas em nível de gênero, e outras chegaram sem qualquer tipo de identificação.

Para o marcador molecular COI foram adicionadas 57 sequências disponíveis no *Genbank*, para o CYTB foram adicionadas 56 sequências e para o IRBP 75 sequências (Tabela 3).

**Tabela 1:** Amostras utilizadas: número de identificação da amostra, identificação taxonômica realizada pelo coletor, tribo, código do local de coleta (CLC) e marcadores amplificados nesse estudo.

Número	Gênero	Espécie	Tribo	CLC	COI	CYTB	IRBP
JR328	<i>Akodon</i>	<i>azarae</i>	Akodontini	10	sim	sim	sim
JR329	<i>Akodon</i>	<i>azarae</i>	Akodontini	10	sim	sim	sim
UFPR681	<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	Akodontini	43	sim	sim	não
UFPR682	<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	Akodontini	43	sim	sim	não
UFPR688	<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	Akodontini	43	sim	sim	não
UFPR737	<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	Akodontini	43	sim	sim	não
UFPR784	<i>Akodon</i>	<i>cursor</i>	Akodontini	46	sim	sim	não
RQ200	<i>Akodon</i>	<i>lindberghi</i>	Akodontini	36	sim	sim	sim
RQ211	<i>Akodon</i>	<i>lindberghi</i>	Akodontini	36	sim	sim	sim
RQ225	<i>Akodon</i>	<i>lindberghi</i>	Akodontini	36	sim	sim	sim
DG021	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	4	sim	sim	sim
DG022	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	4	sim	não	não
DG023	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	4	sim	não	não
FURB797	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	33	não	sim	sim
FURB9595	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	30	sim	sim	sim
FURB9826	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	30	sim	sim	sim
G23	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	7	sim	sim	sim
JR197	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	não	não
JR198	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	sim	sim
JR199	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	sim	não
JR200	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	54	sim	sim	não
JR203	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	não	não
JR264	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	não	não
JR335	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	11	sim	sim	sim
JR336	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	11	sim	não	não
JR338	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	12	sim	sim	sim
JR386	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	14	sim	sim	sim
JR389	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	14	sim	não	não
JR407	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	15	sim	não	não
JR461	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	sim	sim
JR535	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	9	sim	não	não

RQ195	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	36	não	sim	sim
RQ196	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	36	sim	sim	não
RQ204	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	36	não	sim	sim
UFPR1005	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	39	sim	sim	sim
UFPR1009	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	40	sim	sim	sim
UFPR1012	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	Akodontini	40	sim	sim	sim
FURB6844	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	32	sim	sim	não
FURB6963	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	32	sim	sim	não
JR411	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	15	sim	sim	sim
UFPR885	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	51	sim	sim	não
UFPR890	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	50	sim	sim	não
UFPR956	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	40	sim	sim	sim
UFPR987	<i>Akodon</i>	<i>paranaensis</i>	Akodontini	40	sim	sim	sim
TAI23	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI24	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI25	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI26	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI28	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI30	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	sim
TAI31	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	não	não
TAI32	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI33	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI34	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI35	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
TAI39	<i>Akodon</i>	<i>reigi</i>	Akodontini	20	sim	sim	não
UFPR851	<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	Akodontini	47	não	sim	não
UFPR854	<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	Akodontini	48	sim	sim	não
UFPR888	<i>Akodon</i>	<i>serrensis</i>	Akodontini	48	sim	sim	sim
G1	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	5	sim	sim	sim
G2	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	5	sim	sim	não
LBCE15562	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	16	sim	sim	sim
LBCE15568	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15570	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	16	sim	sim	sim
PCE24	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	23	sim	sim	sim
RIB01	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RIB03	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RIB05	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RIB10	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RIB21	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RIB26	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	1	sim	não	não
RQ144	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	54	não	sim	não
UFRGS6443	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	21	sim	não	não
UFRGS6872	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	21	sim	não	não
UFRGS6899	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	21	sim	não	não
UFRGS7243	<i>Akodon</i>	sp	Akodontini	21	sim	não	não
A10	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não
A17	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	sim
A24	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não
A25	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não
A26	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não

A29	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	sim
A33	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não
A43	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	sim
A7	<i>Akodon</i>	sp2	Akodontini	16	sim	sim	não
LBCE5556/MN71971	<i>Calomys</i>	<i>cerqueirai</i>	Phyllotini	34	sim	sim	não
LBCE5576	<i>Calomys</i>	<i>cerqueirai</i>	Phyllotini	54	não	sim	não
CRB2374	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	26	sim	sim	sim
CRB2582	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	54	sim	sim	sim
CRB2732	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	27	sim	sim	não
CRB2733	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	27	sim	sim	não
LBCE1547/MN63372	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	28	sim	sim	não
LBCE1548/MN63373	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	28	sim	sim	não
LG408	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	29	sim	GQ328930	sim
LG443	<i>Calomys</i>	<i>expulsus</i>	Phyllotini	35	sim	sim	não
RQ197	<i>Calomys</i>	sp	Phyllotini	36	sim	sim	sim
RQ198	<i>Calomys</i>	sp	Phyllotini	36	sim	sim	sim
AB10	<i>Calomys</i>	<i>tener</i>	Phyllotini	25	sim	sim	sim
AB519	<i>Calomys</i>	<i>tener</i>	Phyllotini	25	sim	sim	sim
AB6	<i>Calomys</i>	<i>tener</i>	Phyllotini	25	sim	sim	não
JR405	<i>Calomys</i>	<i>tener</i>	Phyllotini	10	sim	sim	sim
RQ103	<i>Cerradomys</i>	<i>scotti</i>	Oryzomyini	38	não	sim	sim
RQ108	<i>Cerradomys</i>	<i>scotti</i>	Oryzomyini	38	não	sim	sim
RQ91	<i>Cerradomys</i>	<i>scotti</i>	Oryzomyini	38	não	sim	sim
RQ98	<i>Cerradomys</i>	<i>scotti</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ217	<i>Cerradomys</i>	<i>subflavus</i>	Oryzomyini	36	sim	sim	sim
RQ219	<i>Cerradomys</i>	<i>subflavus</i>	Oryzomyini	36	sim	sim	não
RQ237	<i>Cerradomys</i>	<i>subflavus</i>	Oryzomyini	36	sim	sim	não
DD2	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	1	sim	sim	sim
DD3	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	1	sim	não	não
DD40	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	1	sim	sim	sim
FURB5897	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	30	sim	sim	sim
FURB9954	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	31	sim	sim	não
JR207	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	sim	não
JR224	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	54	sim	não	não
JR229	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	não	não
JR230	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	sim	sim
JR290	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	não	não
JR349	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	sim	sim
JR527	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	sim	não
JR536	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	sim	não
JR538	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	9	sim	não	não
UFPR855	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	48	sim	sim	não
UFPR857	<i>Delomys</i>	<i>dorsalis</i>	incertae sedis	48	sim	sim	não
FURB9331	<i>Delomys</i>	<i>sublineatus</i>	incertae sedis	30	sim	sim	sim
FURB9950	<i>Delomys</i>	<i>sublineatus</i>	incertae sedis	30	sim	sim	sim
FURB9994	<i>Delomys</i>	<i>sublineatus</i>	incertae sedis	30	sim	sim	sim
UFPR729	<i>Delomys</i>	<i>sublineatus</i>	incertae sedis	43	não	sim	não
ALV15	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV18	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV25	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV27	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	sim
ALV44	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV47	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV48	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	2	sim	sim	não

BUJ08	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	3	sim	sim	sim
PCE05	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	53	sim	sim	não
PCE06	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	53	sim	sim	não
PCE11	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	53	sim	sim	sim
PCE12	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	53	sim	sim	não
PCE13	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	53	sim	sim	não
SJN15	<i>Deltamys</i>	<i>kempi</i>	Akodontini	19	sim	sim	sim
FURB9409	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	31	sim	sim	sim
FURB9695	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	31	sim	sim	não
FURB9773	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	31	sim	sim	sim
G10	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	6	sim	sim	sim
G7	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	8	sim	sim	não
JR194	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR205	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
JR208	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
JR281	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR297	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR298	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR299	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
UFPR667	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	42	sim	sim	não
UFPR759	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	45	sim	sim	não
UFPR767	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	45	sim	sim	não
UFPR772	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	Oryzomyini	45	não	sim	não
G8	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	6	sim	não	não
PAL19	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	17	não	sim	não
PAL21	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	17	não	sim	não
RIB07	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	1	não	sim	sim
RIB18	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	1	não	sim	não
XAN32	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	Oryzomyini	22	não	sim	não
C102	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	54	sim	sim	sim
C103	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	54	sim	sim	sim
RQ100	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ101	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ102	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ106	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ109	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ80	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ81	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ88	<i>Hylaeamys</i>	<i>s megacephalus</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	não
RQ92	<i>Hylaeamys</i>	<i>s</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
B201	Indeterminado		indeterminado	54	sim	não	não
Fercal1	Indeterminado		indeterminado	54	não	sim	não
Fercal2	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID02	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID03	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim

KID04	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID05	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID08	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID09	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID10	Indeterminado		indeterminado	54	não	sim	sim
KID11	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID12	Indeterminado		indeterminado	54	não	sim	não
KID13	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID14	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID15	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID16	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID17	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID18	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID19	Indeterminado		indeterminado	54	não	sim	sim
KID23	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID25	Indeterminado		indeterminado	54	não	sim	sim
KID34	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
KID37	Indeterminado		indeterminado	54	sim	não	não
KID60	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
LBCE15565	Indeterminado		indeterminado	16	sim	sim	sim
LBCE15572	Indeterminado		indeterminado	16	sim	sim	sim
SEQ1787	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
SEQ1788	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
SEQ2196	Indeterminado		indeterminado	54	não	não	sim
SEQ2728	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	sim
SEQ2731	Indeterminado		indeterminado	54	sim	sim	não
UFPR1007	Indeterminado		indeterminado	40	não	sim	não
FURB9735	<i>Juliomys</i>	<i>pictipes</i>	incertae sedis	30	sim	sim	sim
FURB6859	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	32	não	sim	não
JR346	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	13	sim	sim	sim
RQ104	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	38	não	sim	sim
RQ212	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	36	não	sim	não
RQ218	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	36	não	sim	não
RQ226	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	36	não	sim	sim
RQ96	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	38	sim	sim	sim
RQ97	<i>Necomys</i>	<i>lasiurus</i>	Akodontini	38	sim	sim	não
FURB9790	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	30	sim	sim	sim
FURB9905	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	30	sim	sim	sim
RQ87	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
UFPR605	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	41	sim	sim	não
UFPR607	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	41	sim	sim	não
UFPR608	<i>Nectomys</i>	<i>squamipes</i>	Oryzomyini	41	sim	sim	sim
RQ89	<i>Oecomys</i>	<i>bicolor</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
RQ93	<i>Oecomys</i>	<i>bicolor</i>	Oryzomyini	38	sim	sim	sim
LG52	<i>Oecomys</i>	<i>mamorae</i>	Oryzomyini	37	não	não	sim
LG50	<i>Oecomys</i>	<i>roberti</i>	Oryzomyini	37	sim	sim	sim

LG51	<i>Oecomys</i>	<i>roberti</i>	Oryzomyini	37	sim	sim	sim
UFPR1010	<i>Oecomys</i>	sp	Oryzomyini	39	sim	sim	sim
DG015	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	4	sim	não	não
JR202	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR209	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
JR210	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
JR258	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR259	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR332	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	10	sim	sim	sim
JR467	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
PIN01	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	24	sim	sim	não
UFPR883	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	50	não	sim	sim
UFPR949	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	52	sim	sim	sim
UFPR952	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	40	sim	sim	não
UFPR968	<i>Oligoryzomys</i>	<i>flavescens</i>	Oryzomyini	40	sim	sim	sim
DG000	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	4	sim	não	não
DG001	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	4	sim	sim	sim
DG005	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	4	sim	não	não
DG006	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	4	sim	não	não
FURB6884	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	32	sim	sim	sim
FURB9600	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	30	sim	sim	sim
JR337	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	11	sim	sim	sim
JR339	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	12	sim	sim	sim
JR363	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	não
JR409	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	15	sim	sim	sim
JR425	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR426	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR457	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR458	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR459	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	não	não
JR518	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
OLN31	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
ON1	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	sim	não
OPN52	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	sim	não
OPN55	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	sim	sim
OPN57	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
OPN58	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
OPN59	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
OPN61	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
OPN64	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
OPN87	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	1	sim	não	não
SJN21	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	19	sim	sim	sim
UFPR978	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	Oryzomyini	50	não	sim	sim
MEV01	<i>Oxymycterus</i>	<i>nasutus</i>	Akodontini	3	não	sim	sim
LBCE15561	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15563	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim

LBCE15566	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15571	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15573	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15574	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
LBCE15575	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	16	não	sim	sim
UFPR1008	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	sim
UFPR754	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	44	não	sim	não
UFPR995	<i>Oxymycterus</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	não
FURB9908	<i>Rhagomys</i>	<i>rufescens</i>	incertae sedis	30	sim	sim	não
FURB9921	<i>Rhagomys</i>	<i>rufescens</i>	incertae sedis	30	sim	sim	não
RQ94	<i>Rhipidomys</i>	<i>mastacalis</i>	Thomasomyini	38	sim	sim	sim
RQ82	<i>Rhipidomys</i>	sp	Thomasomyini	38	sim	sim	sim
UFPR957	<i>Scapteromys</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	não
UFPR958	<i>Scapteromys</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	sim
UFPR972	<i>Scapteromys</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	sim
UFPR985	<i>Scapteromys</i>	sp	Akodontini	40	não	sim	sim
ALV01	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV04	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	sim
ALV06	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV07	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV08	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV09	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV10	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	sim
ALV11	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV12	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV13	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV14	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV19	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	sim	sim	não
ALV20	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV21	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV23	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	não
ALV43	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	2	não	sim	sim
BUJ02	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	3	não	sim	não
BUJ04	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	3	não	sim	não
BUJ05	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	3	não	sim	não
SC	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	18	não	sim	sim
SJN16	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	19	não	sim	sim
SJN18	<i>Scapteromys</i>	<i>tumidus</i>	Akodontini	19	não	sim	não
FURB9793	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	Oryzomyini	30	sim	sim	sim
JR196	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	Oryzomyini	9	sim	sim	sim
UFPR998	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	Oryzomyini	39	sim	sim	sim
UFRGS6677	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	Oryzomyini	21	sim	não	não
FURB6559	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	31	sim	não	não
JR372	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	14	sim	sim	sim
TN3	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	16	sim	sim	sim
UFPR889	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	48	não	sim	não

UFPR892	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	49	não	sim	não
UFPR893	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	48	sim	sim	sim
UFPR997	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	39	não	sim	não
UFRGS6433	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	Akodontini	21	sim	não	não

**Tabela 2:** Locais de coleta das amostras utilizadas neste estudo.

<b>Código</b>	<b>Localidade</b>	<b>Município</b>	<b>UF</b>	<b>País</b>
1		Barra do Ribeiro	RS	Brasil
2	APA Lagoa Verde	Rio Grande	RS	Brasil
3		Bujuru	RS	Brasil
4	FLONA	Passo Fundo	RS	Brasil
5		Cambará do Sul	RS	Brasil
6		Serafina Corrêa	RS	Brasil
7		Itapeva	RS	Brasil
8		Guaporé	RS	Brasil
9	Rota do Sol	Tainhas-Terra de Areia	RS	Brasil
10		Alegrete	RS	Brasil
11		Ronda Alta	RS	Brasil
12		Barracão	RS	Brasil
13		Rondinha	RS	Brasil
14	Parque Florestal Estadual do Turvo	Charqueadas	RS	Brasil
15		Erechim	RS	Brasil
16	Pró-Mata	São Francisco de Paula	RS	Brasil
17		Palmares do Sul	RS	Brasil
18		Canoas	RS	Brasil
19		São José do Norte	RS	Brasil
20	Estação Ecológica do Taim		RS	Brasil
21	FLONA	São Francisco de Paula	RS	Brasil
22		Xangrila	RS	Brasil
23		Santa Margarida do Sul	RS	Brasil
24	Ilha da Pintada	Eldorado do Sul	RS	Brasil
25			SP	Brasil
26		Mimoso de Goiás	GO	Brasil
27		Correntina	BA	Brasil
28		Caetité	BA	Brasil
29		Mucugê	BA	Brasil
30	PN da Serra do Itajaí	Indaial	SC	Brasil
31	PN da Serra do Itajaí	Blumenau	SC	Brasil
32	Usina Hidrelétrica Quebra-Queixo	São Domingos	SC	Brasil
33		Itá	SC	Brasil
34		Capitão Andrade	MG	Brasil
35		Itinga	MG	Brasil
36	PN Serra da Canastra		MG	Brasil
37	Pantanal		MG	Brasil
38	Parque Nacional de Brasília	Brasília	DF	Brasil
39	RPPN Botuquara	Palmeira	PR	Brasil
40	Barro Preto	São José dos Pinhais	PR	Brasil
41		Guaraqueçaba	PR	Brasil
42	Ilha das Laranjeiras	Guaraqueçaba	PR	Brasil
43	Ilha Rasa	Guaraqueçaba	PR	Brasil



44	Índios	Guaraqueçaba	PR	Brasil
45	Tromomo	Guaraqueçaba	PR	Brasil
46	Ilha do Rabelo	Guaraqueçaba	PR	Brasil
47		Quatro Barras	PR	Brasil
48	Roça Nova	Piraquara	PR	Brasil
49		Piraquara	PR	Brasil
50		Curitiba	PR	Brasil
51		São José dos Pinhais	PR	Brasil
52		São João do Triunfo	PR	Brasil
53	Parque Nacional Santa Teresa			Uruguai
54	Desconhecido			

Abreviações: PN, Parque Nacional; APA, Área de Proteção Ambiental; FLONA, Floresta Nacional; RPPN, Reserva Particular do Patrimônio Natural; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo; GO, Goiás; BA, Bahia; SC, Santa Catarina; MG, Minas Gerais; DF, Distrito Federal; PR, Paraná.

**Tabela 3:** Sequencias provenientes do Genbank utilizadas neste estudo.

Gene	Números de acesso no Genbank
COI	EU095443-75, EU095488-93, EU096809-25 e EU096953 AF108666-67, AF108670, AF108680-81, AF108686-87, AF108695, AF108699, AF184051, AF184053, AF184057-58, AF385603, AY033168, AY195865, AY206770, AY273910, AY273912, AY273916-17, AY273919, AY275134, AY964051, DQ826009, EF101876, EF101879, EF101888-89, EF206805-15, EF455019, EF622509, EF661854, EU157764, EU251017-18, EU251020, EU251024, EU251034, EU340012, EU579477, CYTB EU579487, GQ328930, GU126516, JF489123, U03529 e U03550. AY163577-80, AY163584-90, AY163592, AY163595-98, AY163600-1, AY163604-30, IRBP AY163632-34, AY163636-42, AY163644-46, EU273418-29, EU273431-34 e GU126515.

### Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

A extração de DNA a partir de tecido seguiu o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações. O resultado da extração foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x corado com Brometo de Etídio e visualizado em transilumidor de luz ultra-violeta.

Foram amplificados os marcadores moleculares COI, CYTB e IRBP. Para COI foram utilizados os *primers* LCO1490 e HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) e a

amplificação seguiu condições descritas por Folmer *et al.* (1994). Para o CYTB foram utilizados dois conjuntos de *primers*, MVZ05 com MVZ26 e MVZ35 com MVZ14 (Smith & Patton, 1993), seguindo as condições de Palma *et al.* (2005). Para o IRBP também foram utilizados dois conjuntos de *primers*, 111A1 com 878F e E2 com B2 (Weksler 2003), seguindo as condições de amplificação sugeridas pelo mesmo autor. As sequencias nucleotídicas dos *primers* utilizados estão listadas na tabela 4.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x corado com Brometo de Etídio e visualizado em transilumidor de luz ultra-violeta. Posteriormente, os produtos foram purificados com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e Exonuclease (EXO) (GE Healthcare, EUA).

Os produtos de PCR purificados foram analisados em um sequenciador ABI 377<sup>®</sup> (Applied Biosystems Inc.).

**Tabela 4:** *Primers* utilizados.

Gene	Nome do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Referência
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994
CYTB	MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	Smith & Patton, 1993
	MVZ26	AGATCTTTGATTGTGTAGTAGGGGT	Smith & Patton, 1993
	MVZ35	TCTCAGAAACCTGRAAYATYGG	Smith & Patton, 1993
	MVZ14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC	Smith & Patton, 1993
IRBP	111A1	ATGCGGAAGGTCTCTTGGATAAC	Weksler, 2003
	878F	CTCCACTGCCCTCCCATGTCT	Weksler, 2003
	E2	AGCAGATGCGCAGAGCCATAGTGGT	Weksler, 2003
	B2	ATGAGGTGTTCCGTGTCCTG	Weksler, 2003

### Alinhamento de sequências

Os cromatogramas foram checados no programa Chromas 2.0 e posteriormente alinhados de forma automática no programa Clustal X implementado no MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) e revisados visualmente.

## **Análise dos dados**

### **Teste de Saturação**

O teste de saturação para os três marcadores moleculares foi realizado no programa DAMBE (Xia & Xie 2001) utilizando dois modelos evolutivos: Kimura 1980 (K80) e *General Time-Reversible* (GTR).

### **Seleção de modelo evolutivo**

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos que explica a evolução das sequências contidas em cada alinhamento de sequências de DNA foi escolhido através do programa MrModeltest (Nylander, 2004) utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC) implementados no programa PAUP (Swofford, 2003).

### **Análises filogenéticas de *Neighbor-Joining***

Foram utilizados três métodos para as inferências filogenéticas: Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimilhança (MV) e *Neighbor-Joining* (NJ). Para cada um dos marcadores foi gerada uma árvore final em cada método.

A reconstrução filogenética a partir de inferência Bayesiana foi realizada no programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) com 2 corridas independentes de 4 cadeias. O número de gerações utilizadas variou entre os marcadores, sendo 9.000.000 para o COI, 5.000.000 para o CYTB, 8.100.000 para o IRBP-indivíduos e 5.000.000 para o IRBP sítios. As primeiras 200.000 árvores foram descartadas através do *burn-in*.

O método de MV foi conduzido na versão *online* do programa PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) com a árvore inicial tipo BIONJ e o suporte dos nós foi estimado utilizando 100 replicações de *bootstrap*.

As árvores de *NJ* foram geradas no programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011) utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros e 1000 replicações de *bootstrap* para avaliar o suporte dos nós.

Para o enraizamento da árvore, utilizou-se como grupo externo para o COI a amostra B201 de uma espécie de marsupial (não identificada), para o CYTB *Peromyscus maniculatus* (JF489123) e para o IRBP *Peromyscus maniculatus* (AY163630) e *Scotinomys teguina* (AY163639).

### **Concatenação dos dados**

Os indivíduos com os três marcadores amplificados e as sequências determinadas nas análises filogenéticas anteriores foram concatenados em um único alinhamento, totalizando 126 indivíduos com 2078 pb. Como grupo externo foi utilizada a espécie *Peromyscus mexicanus*. A análise de inferência Bayesiana foi realizada com 2 corridas independentes de 4 cadeias, 8.000.000 de gerações e com o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+I+G. As primeiras 800.000 árvores foram descartadas através do *burn-in*.

### **Análise de distância genética**

As distâncias entre as amostras do gene COI foram calculadas no programa R (R development core team, 2008) com a biblioteca ape (Paradis et al. 2004) utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros. Primeiro foi realizado o cálculo dentro de cada espécie e quando identificada alguma sequência com valor mais acentuado das demais na matriz de distâncias ela foi comparada com as demais espécies e identificada a sequência ou espécie mais próxima, ou seja, com menor distância.

## **6.3 Resultados**

### **Alinhamentos de sequências de DNA**

Foram amplificadas 269 amostras para o marcador molecular COI (Tabela 1). As espécies dos gêneros *Oxymycterus* e *Scapteromys* não amplificaram com

o conjunto de *primers* universais utilizados. Incluindo as sequências do *Genbank* o alinhamento de 651 pares de bases (pb) totalizou 326 indivíduos.

Para o gene CYTB foram obtidas 252 sequências (Tabela 1) sendo que nenhuma espécie apresentou problemas de amplificação. O alinhamento totalizou 818 pb e 308 indivíduos com as sequências do *Genbank*.

O alinhamento do gene IRBP possuía vários dados faltantes, os quais enviesaram os resultados do teste de saturação (veja item 6.2.2). Para evitar possibilidade de resultados tendenciosos o conjunto de sequências foi reformulado de duas formas: (i) foram removidos os indivíduos com parte da sequência faltante, resultando em um alinhamento com 1221 pb de 119 sequências provenientes desse estudo e 75 do *Genbank*, o qual foi denominado IRBP-indivíduos; (ii) foram removidos sítios com maior quantidade de dados faltantes no início e no final do alinhamento, totalizando 609 pb de 157 sequências provenientes desse estudo (Tabela 1) e 75 do *Genbank*, o qual foi denominado IRBP-sítios.

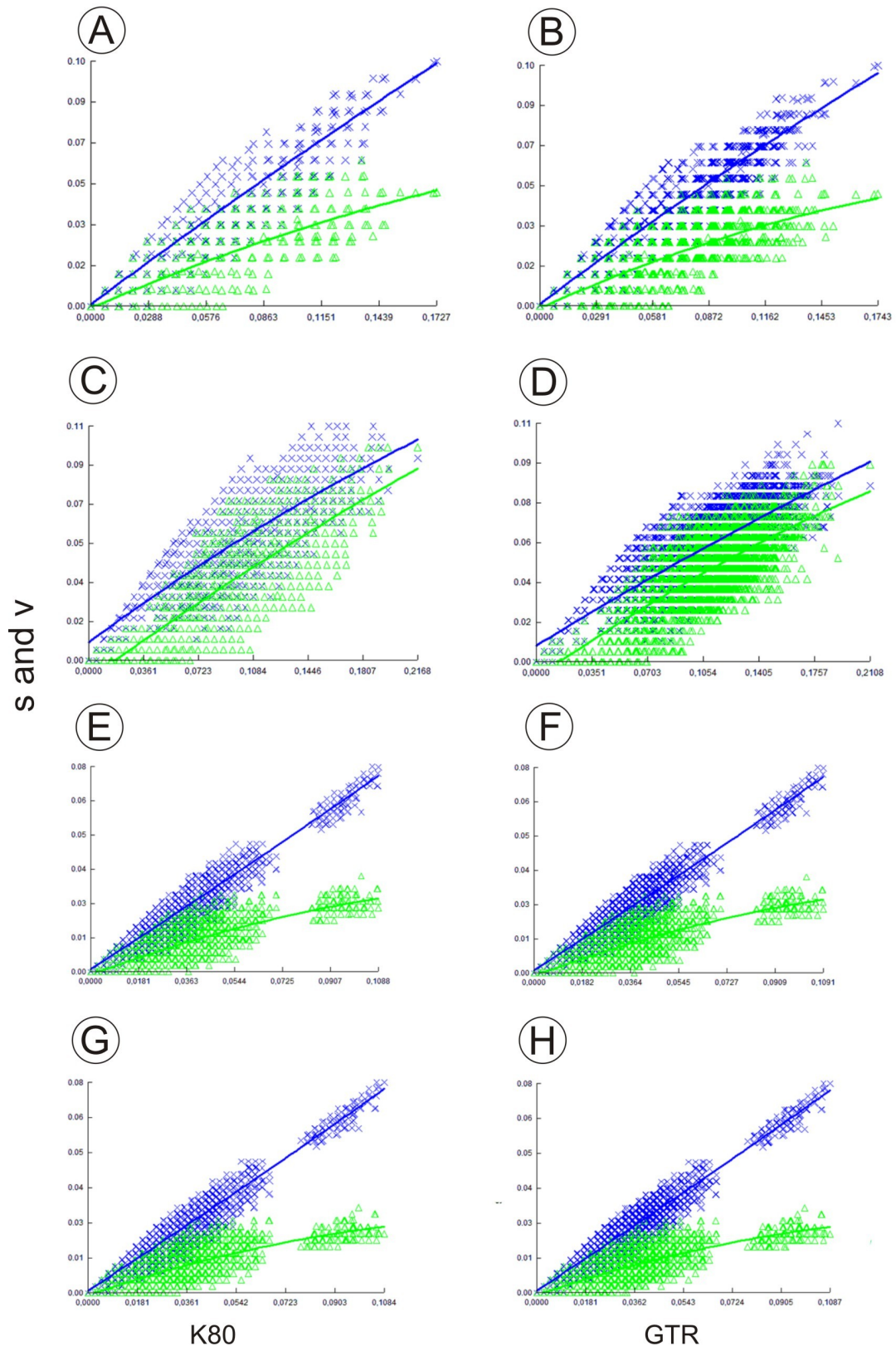
### **Teste de Saturação**

Os testes para o COI revelaram a ausência de saturação tanto para a taxa de transição (s) quando de transversão (v) para ambos os modelos de substituição de nucleotídeos testados (Fig. 1A e B). Para o gene CYTB o mesmo padrão de ausência de saturação foi observado (Fig. 1C e D). O alinhamento do gene IRBP apresentou saturação na taxa de transversão quando utilizado o modelo K80 e saturação na taxa de transição quando utilizado o modelo GTR (dados não apresentados). Tal alinhamento, após sofrer as alterações descritas acima, apresentou ambas as taxas não saturadas (Fig. 1E-H).

### **Seleção de modelo evolutivo**

O modelo de evolução de sequência escolhido através do AIC para os marcadores mitocondriais COI e CYTB foi GTR+I+G. Para o conjunto de dados nuclear IRBP-indivíduos foi GTR+I+G, e para o IRBP-sítios foi SYM+I+G.

X s  $\Delta$  v



**Figura 1:** Teste de saturação para o alinhamento dos genes COI (A e B), CYTB (C e D) e IRBP (E-F, sítios; G-H, indivíduos). As taxas de transição (s) e transversão (v) estão

plotadas versus as distâncias genéticas, calculadas pelo modelo de Kimura 1980 (K80) e *General time reverse* (GTR) para as diferentes espécies.

### **Análises filogenéticas de *Neighbor-Joining***

As análises pelos métodos de MV, IB e NJ identificaram 30 amostras cuja espécie era indeterminada, 21 amostras que estavam identificadas em nível genérico e 12 identificações errôneas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Indivíduos reidentificados. Número de identificação da amostra, identificação realizada pelo coletor e identificação através de análise filogenética de marcadores moleculares.

<b>Número</b>	<b>Identificação pelo coletor</b>	<b>Identificação molecular</b>
G23	<i>Akodon montensis</i>	<i>Deltamys kempii</i>
TAI30	<i>Akodon reigi</i>	<i>Akodon azarae</i>
LBCE15570	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon azarae</i>
PCE24	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
RQ144	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
UFRGS6443	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
UFRGS6872	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
UFRGS6899	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
UFRGS7243	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>
G1	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon paranaensis</i>
G2	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon paranaensis</i>
LBCE15568	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon serrensis</i>
LBCE15562	<i>Akodon</i> sp	<i>Delomys dorsalis</i>
A17	<i>Akodon</i> sp2	<i>Akodon azarae</i>
CRB2582	<i>Calomys expulsus</i>	<i>Calomys tener</i>
RQ197	<i>Calomys</i> sp	<i>Calomys tener</i>
RQ198	<i>Calomys</i> sp	<i>Calomys tener</i>
FURB9954	<i>Delomys dorsalis</i>	<i>Euryoryzomys russatus</i>
FURB9994	<i>Delomys sublineatus</i>	<i>Euryoryzomys russatus</i>
UFPR667	<i>Euryoryzomys russatus</i>	<i>Akodon montensis</i>
G8	<i>Holochilus brasiliensis</i>	<i>Nectomys squamipes</i>
SEQ1787	Indeterminado	<i>Akodon azarae</i>
SEQ1788	Indeterminado	<i>Akodon azarae</i>
KID05	Indeterminado	<i>Calomys expulsus</i>
KID34	Indeterminado	<i>Calomys expulsus</i>
KID04	Indeterminado	<i>Calomys tener</i>
KID15	Indeterminado	<i>Calomys tener</i>

SEQ2728	Indeterminado	<i>Calomys tener</i>
SEQ2731	Indeterminado	<i>Calomys tener</i>
LBCE15565	Indeterminado	<i>Delomys dorsalis</i>
LBCE15572	Indeterminado	<i>Deltamys</i> sp.nov.
Fercal2	Indeterminado	<i>Hylaeamys megacephalus</i>
B201	Indeterminado	Marsupial
KID02	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID03	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID08	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID09	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID10	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID11	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID13	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID14	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID16	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID17	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID18	Indeterminado	<i>Necromys lasiurus</i>
KID23	Indeterminado	<i>Oligoryzomys moojeni?</i>
KID25	Indeterminado	<i>Oligoryzomys moojeni?</i>
KID60	Indeterminado	<i>Oligoryzomys moojeni?</i>
KID37	Indeterminado	<i>Pseudoryzomys simplex</i>
KID19	Indeterminado	<i>Rhipidomys</i> sp
KID12	Indeterminado	<i>Thalpomys cerradensis</i>
SEQ2196	Indeterminado	<i>Wiedomys pyrhorhinos</i>
FURB9790	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>Sooretamys angouya</i>
UFPR1010	<i>Oecomys</i> sp	<i>Sooretamys angouya</i>
LBCE15561	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15563	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15566	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15571	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15573	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15574	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
LBCE15575	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
UFPR1008	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
UFPR995	<i>Oxymycterus</i> sp	<i>Oxymycterus nasutus</i>
ALV19	<i>Scapteromys tumidus</i>	<i>Deltamys kempii</i>

## COI

As árvores de MV (Figura 2), IB (Fig. 3) e NJ (Fig. 4A1-A2) resultaram em topologias semelhantes com altos valores de suporte nos ramos terminais.

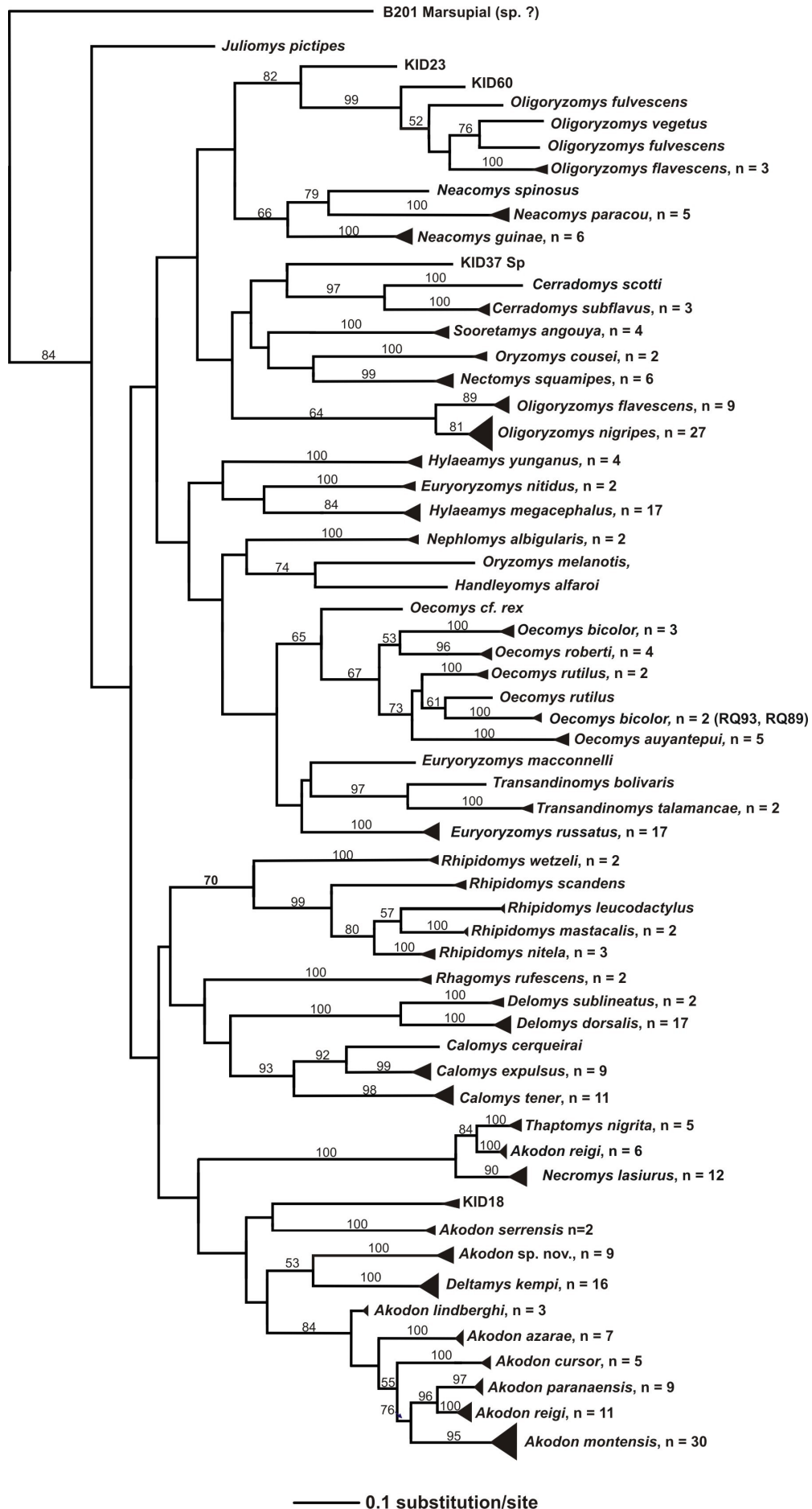


A tribo Oryzomyini foi recuperada com baixos valores de suporte em todas as análises. Phyllotini e Thomasomyini, ambas as tribos representadas por apenas um gênero, *Calomys* e *Rhipidomys* respectivamente, apresentaram monofilia recíproca. Akodontini não foi recuperada nas análises de IB (Fig. 3) e NJ (Fig. 4A2), entretanto na MV (Fig. 2) a tribo é monofilética. A espécie *Juliomys pictipes* (*incertae sedis*) posicionou-se como um ramo único (Fig. 2, 3, 4A2).

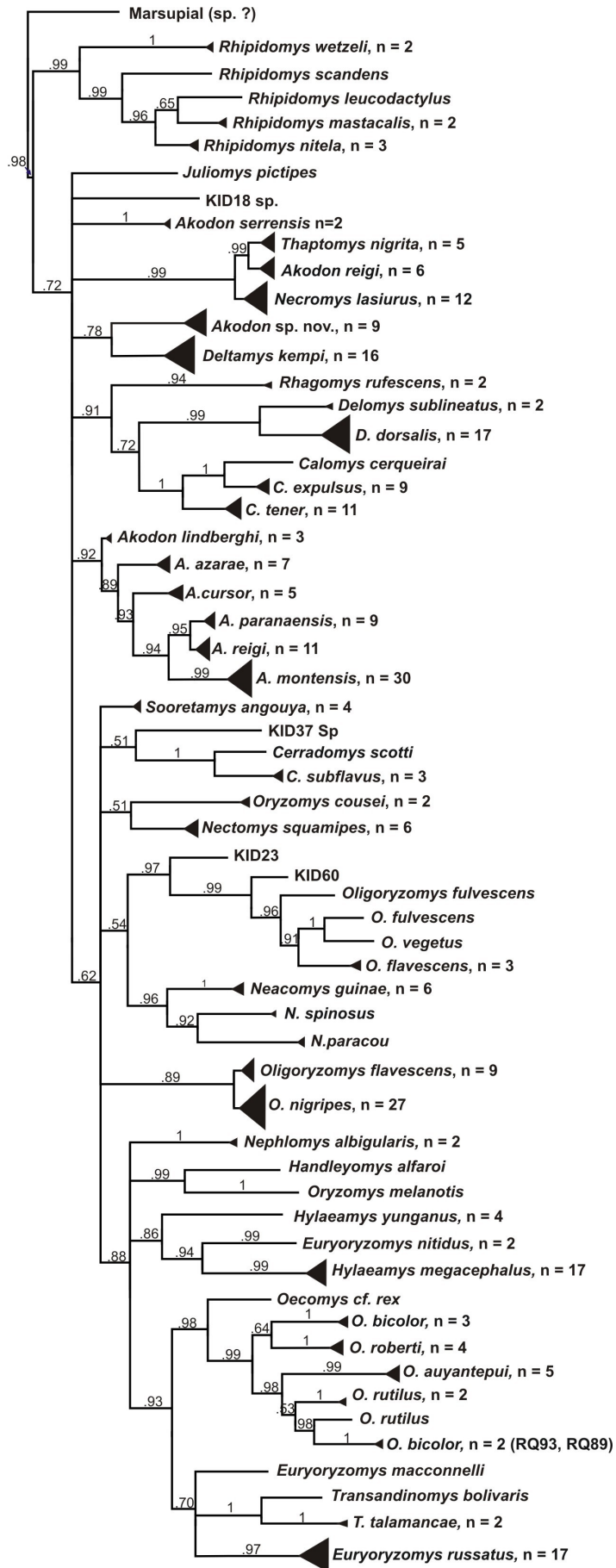
O gênero *Akodon* foi parafilético, pois *A. serrensis*, embora esteja classificado como Akodontini, não forma um clado com as demais espécies do gênero. A espécie nova *Akodon* sp.2 posiciona-se como grupo irmão de *Deltamys kempii* em todas as árvores (Fig. 2, 3, 4A2).

Quatro espécies não apresentaram monofilia: *Akodon reigi*, *Oligoryzomys fulvescens*, *Oligoryzomys flavescens* e *Oecomys bicolor*. *Akodon reigi* apresentou dois grupos, um mais relacionado à *Thaptomys nigrita* e outro irmão de *A. paranaensis*. As duas amostras de *Oligoryzomys fulvescens* provenientes do Genbank agruparam com outra sequência do mesmo gênero, *O. vegetus*, proveniente do mesmo estudo. Três das doze amostras de *O. flavescens* (UFPR949, UFPR952 e UFPR968) foram mais relacionadas a *O. fulvescens* e *O. vegetus*. Por outro lado, as demais 9 amostras da mesma espécie são monofiléticas e irmãs de *O. nigripes* nas árvores de MV e IB (Fig. 2, 3). *Oecomys bicolor* também apresentou dois agrupamentos, ambos inseridos dentro do gênero, um representado pelas amostras provenientes do Genbank e outro com as amostras deste trabalho.

O gênero phyllotino *Calomys* agrupou com *Delomys* com baixo suporte na ML, e *Rhagomys rufescens* posicionou-se externamente a estes gêneros (Fig. 2). Na análise de NJ, *Calomys* agrupou com *Rhagomys rufescens* com baixo suporte e *Delomys* mostrou-se como um ramo único (Fig. 4A2).



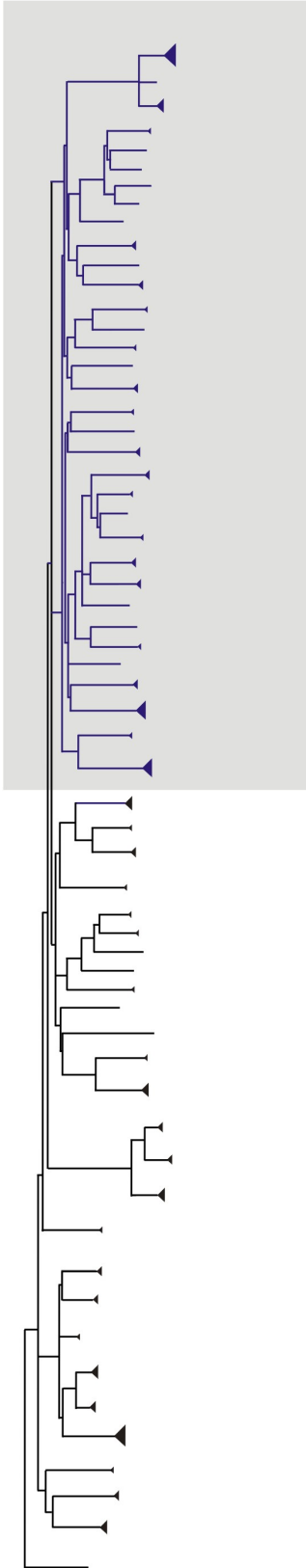
**Figura 2:** Árvore consenso obtida pelo método de Máxima verossimilhança a partir de 651 pb do gene COI para 308 indivíduos. Os valores de *bootstrap* para cada clado estão indicados acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de sequências utilizadas (n) está indicado.



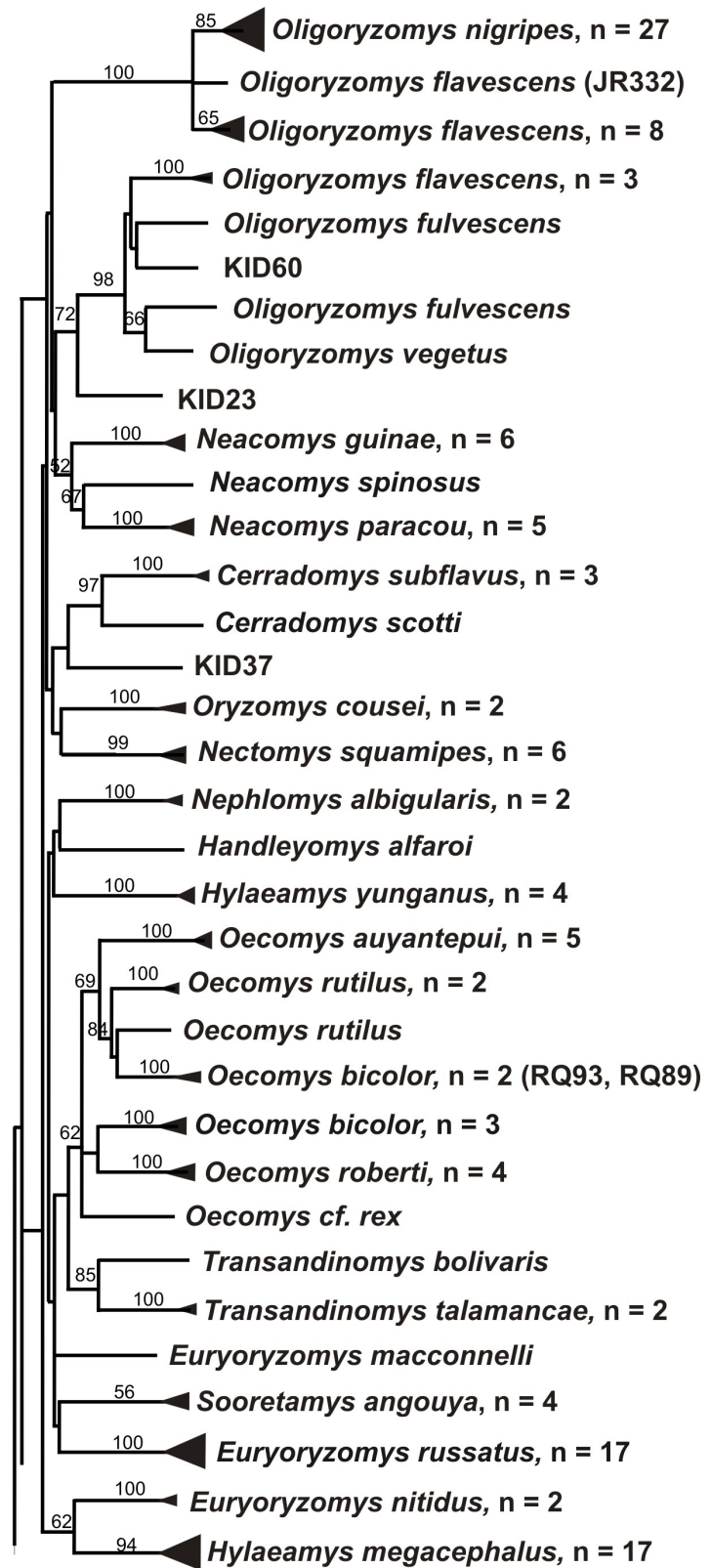
— 0.1 substitution/site

**Figura 3:** Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana a partir de 651 pb do gene COI para 308 indivíduos. A probabilidade posterior de cada clado está indicada acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de sequências utilizadas (n) está indicado.

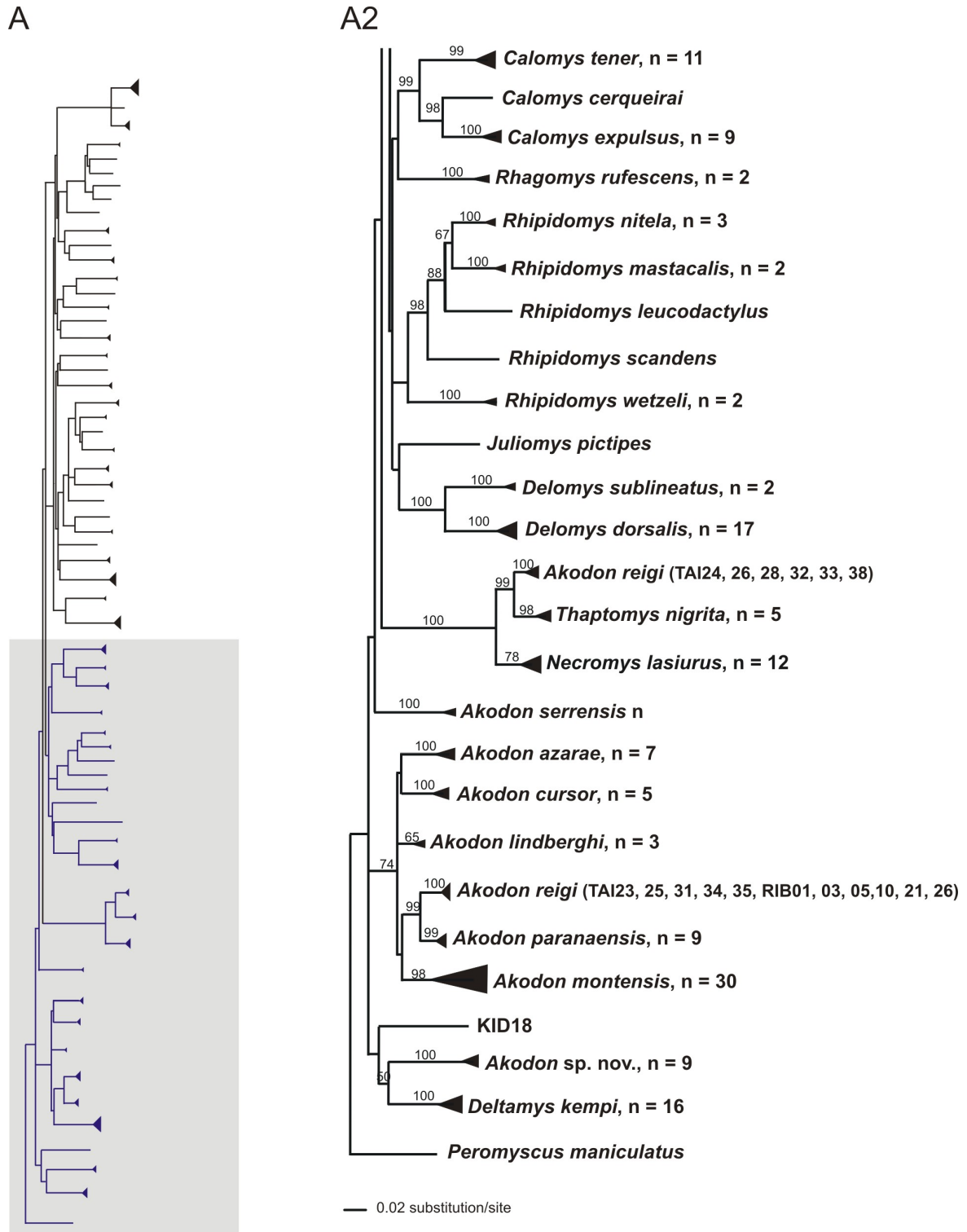
A



A1



— 0.02 substitution/site



**Figura 4:** Árvore consenso obtida pelo método de *Neighbor-Joining* (A) a partir de 651 pb do gene COI para 308 indivíduos, dividido em 2 sub-árvores (A1-A2). Os valores de *bootstrap* de cada clado está indicado acima do respectivo ramo interno. Táxons em vermelho indicam agrupamentos não-esperados.

## CYTB

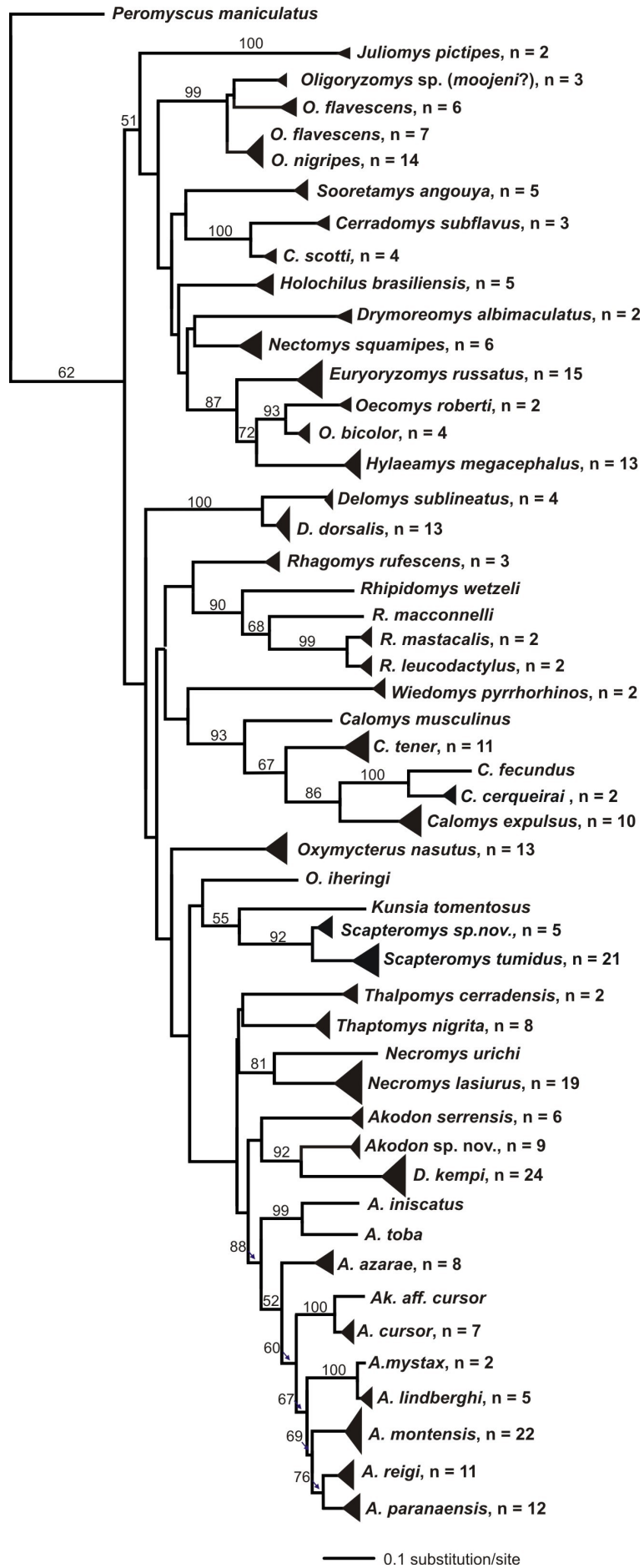
As análises de MV, IB e NJ apresentaram resultados concordantes e bem suportados para os ramos terminais (Fig. 5-7).

A tribo Oryzomyini foi recuperada nas três análises, porém com baixo suporte em MV e NJ. *Juliomys pictipes* não pode ser atribuído a nenhuma tribo, com exceção da análise de NJ que está incluso nos oryzomíneos. Phyllotini e Thomasomyini, ambas as tribos representadas por apenas um gênero, são monofiléticas. Akodontini formou um clado na árvore de MV com baixo suporte, na árvore de NJ as espécies estão agrupadas sem suporte e na árvore de IB *Oxymycterus nasutus* está fora da tribo. O gênero *incertae sedis Delomys* apresentou-se como um ramo único em todas as análises. *Wiedomys pyrrhorhinos* posiciona-se como grupo irmão do gênero *Calomys*, da tribo Phyllotyini. *Rhagomys rufescens* aparece como irmão do gênero *Rhipidomys* com suporte baixo na árvore de MV e alta probabilidade posterior na árvore de IB. Por outro lado, na árvore de NJ *R. rufescens* é irmão de *Drymoreomys albimaculatus*, entretanto, com baixo suporte (Fig. 7).

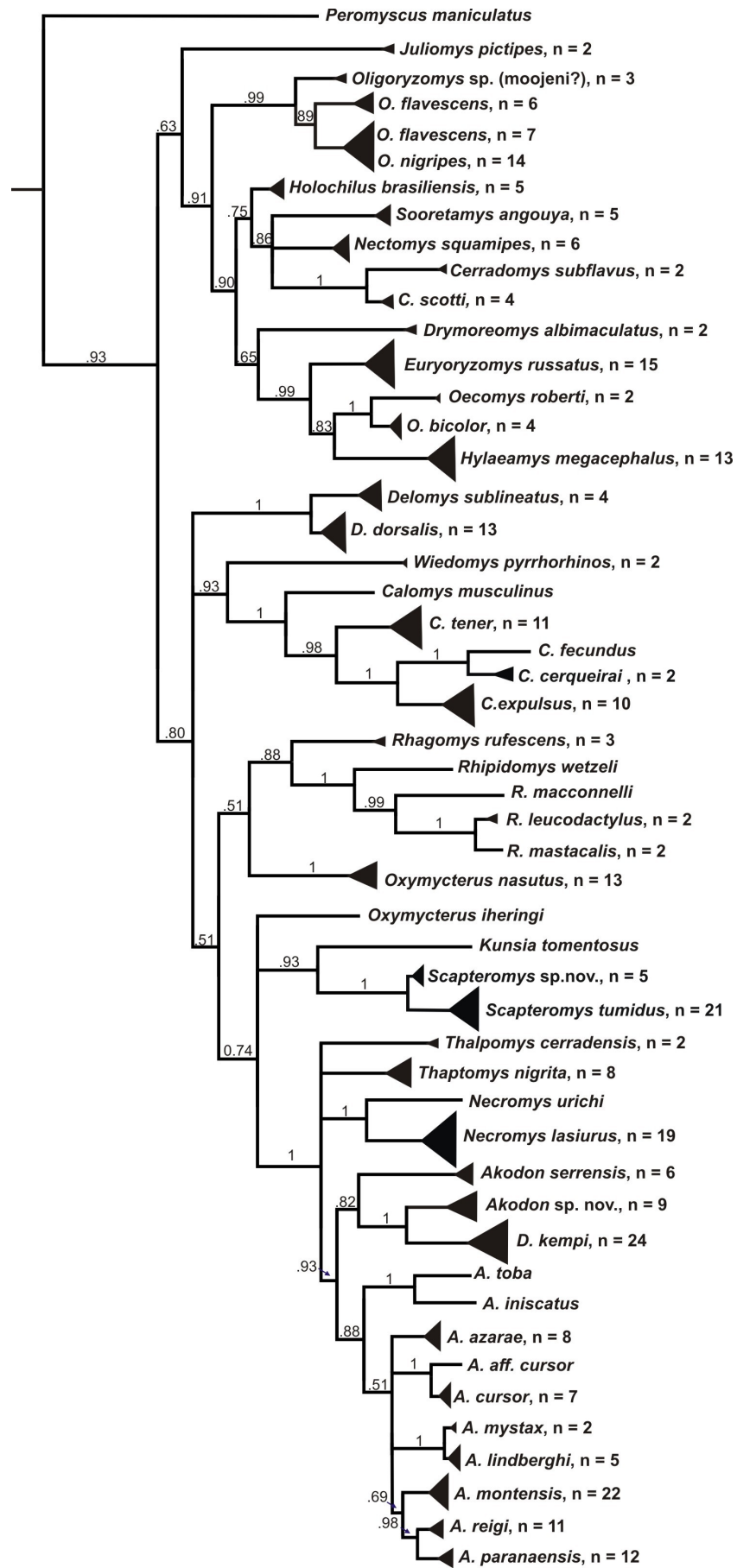
O gênero *Akodon* também apresenta-se parafilético, pois *A. serrensis* está relacionado às espécies de *Deltamys* nas análises de MV e IB (Fig. 5-6). , sendo um ramo único e externo dentro da tribo na árvore de NJ (Fig. 7). A espécie nova *Akodon* sp.2 apresenta-se como grupo irmão de *Deltamys kempfi* em todas as análises (Fig. 5, 6, 7)

Duas espécies não foram monofiléticas: *Oligoryzomys nigripes* e *O. flavescens*. Na IB e NJ ambas posicionam-se como um único clado (Fig. 5 e 7, respectivamente), e na MV (Fig. 6) formam um grupo com *O. moojeni* sem definição das espécies. Seis indivíduos de *O. flavescens* (JR332, PIN01, UFPR952, UFPR949, UFPR968 e DQ826009) formaram um ramo bem suportado e irmão dos demais *Oligoryzomys* em todas as análises (Fig. 6). A análise de NJ falhou em recuperar as espécies *Rhagomys rufescens* e *Scapteromy tumidus*. *S. tumidus* ficou dividida em vários ramos únicos, e *Scapteromy sp.* é monofilético sem relação com *S. tumidus* e a tribo Akodontini (Fig. 7).



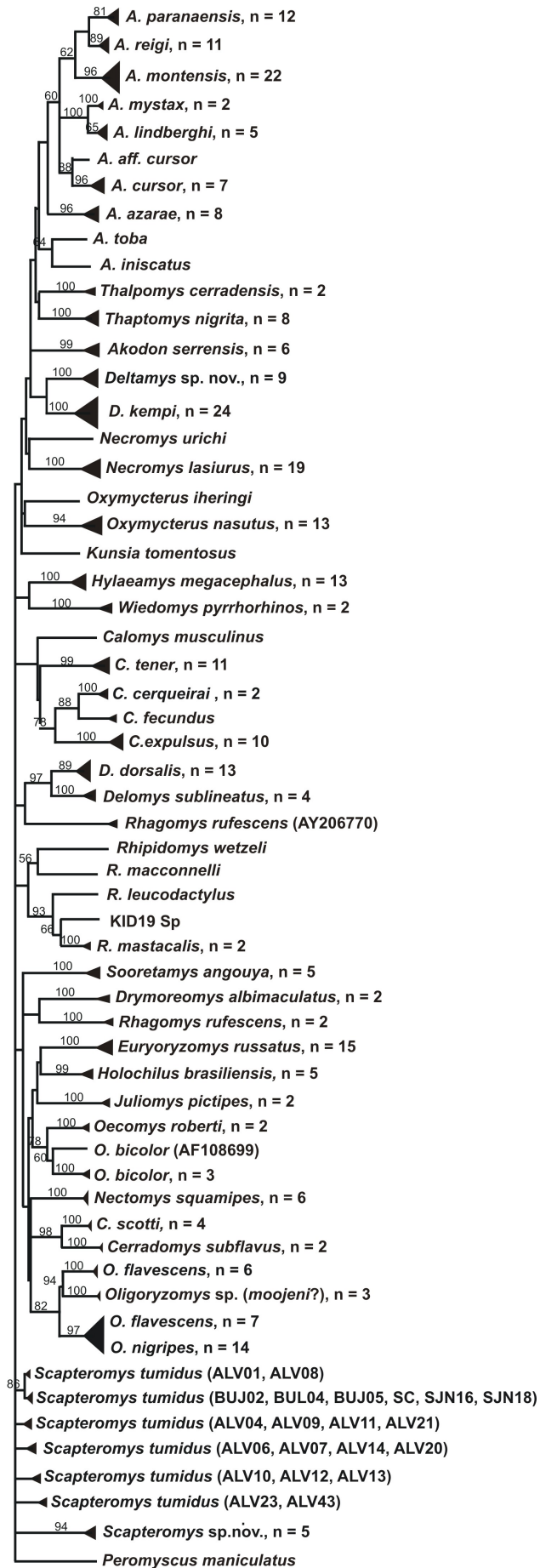


**Figura 5:** Árvore consenso obtida pelo método de Máxima verossimilhança a partir de 818 pb do gene CYTB para 326 indivíduos. Os valores de *bootstrap* para cada clado estão indicados acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de sequências (n) utilizadas está indicado.



— 0.1 substitution/site

**Figura 6:** Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana a partir de 818 pb do gene CYTB para 326 indivíduos. A probabilidade posterior de cada clado está indicada acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de sequências (n) utilizadas está indicado.



— 0.02 substitution/site

**Figura 7:** Árvore consenso obtida pelo método der *Neighbor-Joining* a partir de 818 pb do gene CYTB para 326 indivíduos. Os valores de *bootstrap* para cada clado estão indicados acima do respectivo ramo interno. Táxons em vermelho indicam agrupamentos não-esperado.

## IRBP

As árvores de MV (Fig. 8A1-A4), IB (Fig. 9A1-A4) e NJ (Fig. 10A1-A2) de IRBP-sítios apresentam topologias concordantes. As árvores de IRBP-indivíduos para todas as análises são semelhantes e divergem em poucos ramos das árvores de IRBP-sítios (dados não apresentados).

As tribos *Oryzomyini* e *Thomasomyini* foram recuperadas em todas as análises. As espécies *Juliomys pictipes* e *Wiedomys pyrrhorhinos* não foram atribuídas a nenhuma tribo. A tribo *Phyllotini* não foi recuperada nas análises, pois os gêneros *Phyllotis* e *Calomys* não agruparam com exceção da análise de NJ do IRBP-indivíduos. A tribo *Akodontini* foi monofilética em todas as análises exceto na de NJ de IRBP-indivíduos onde *Oxymycterus nasutus* não está dentro da tribo.

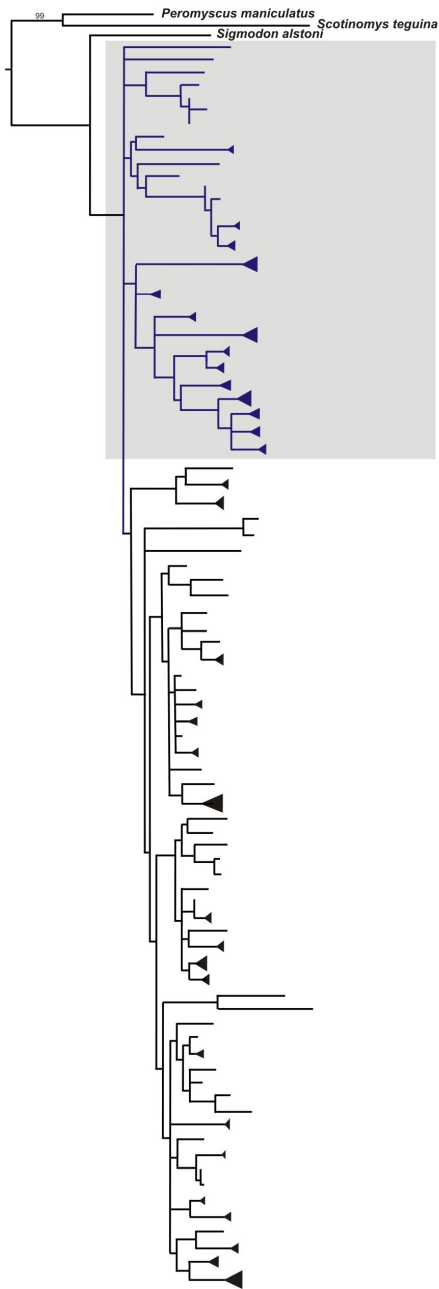
O gênero *Akodon* é monofilético nas análises de MV e IB de IRBP-sítios e em todas as análises de NJ, todavia o suporte é baixo no ramo que une *A. serrensis* às demais espécies do gênero. Na árvore de IB de IRBP-indivíduos há politomia dos ramos de *Akodon serrensis*, *Deltamys* spp, *Necomys lasiurus* e o clado das demais espécies do gênero *Akodon*. Por outro lado, na árvore de ML *A. serrensis* agrupa com as demais espécies do gênero com um suporte baixo (bootstrap de 41), sendo o gênero irmão de *Deltamys* spp. A espécie nova *Akodon* sp.2 apresenta-se como grupo irmão de *Deltamys kempii*.

As espécies *Oligoryzomys nigripes* e *O. flavescens* formaram um único grupo e nas análises de NJ não podem ser diferenciadas das demais espécies do gênero. O gênero *Delomys*, o qual está presente apenas em IRBP-sítios, não teve suas duas espécies discriminadas nas análises. O mesmo ocorreu com os gêneros *Holochilus* e *Rhipidomys* tanto para a análise com redução de indivíduos como para com redução de pares de base. As espécies do gênero *Scapteromys* não foram diferenciadas em IRBP-sítios, porém quando o número de sítios foi aumentado elas agruparam em todas as análises com altos valores de suporte. As três espécies de *Calomys* – *expulsus*, *lepidus* e *tener* – não foram diferenciadas na IB de IRBP-sítios, já o mesmo alinhamento analisado com MV separou as espécies. Quando o número de sítios foi aumentado, as espécies foram reconhecidas como monofiléticas em ambas as análises. As duas análises de NJ diferenciaram as espécies de *Calomys*. Na árvore de NJ de IRBP-sítios o

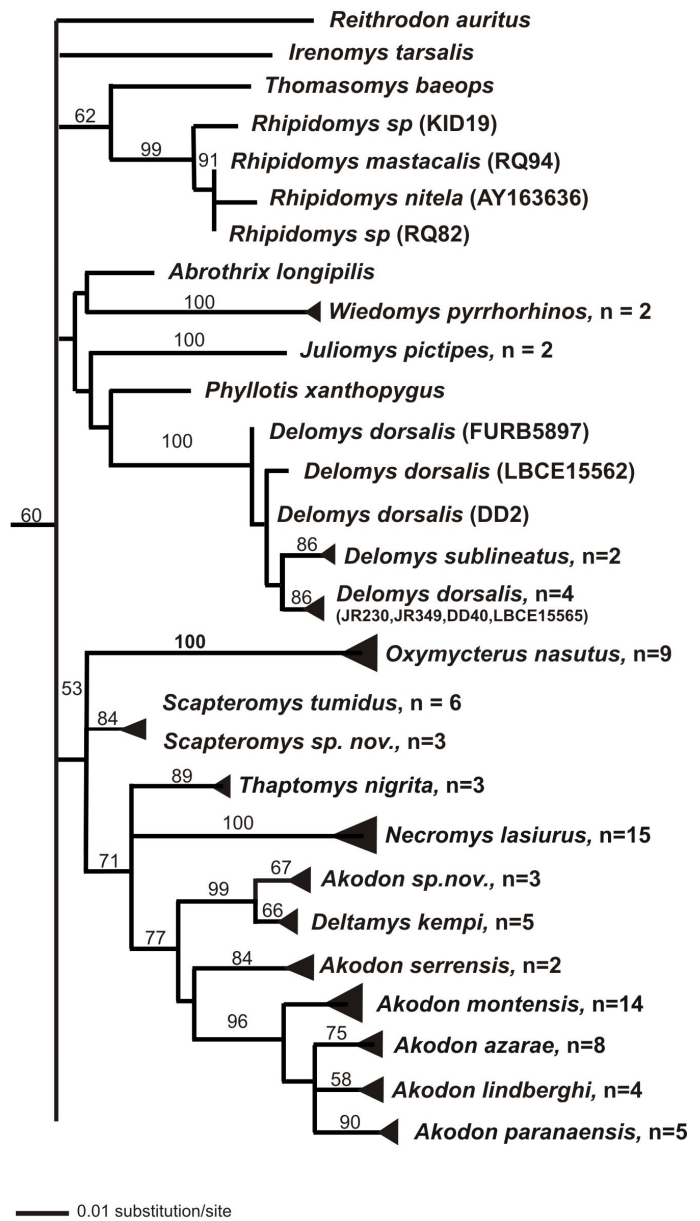
indivíduo AY163623 *Oryzomys palustris* está agrupado com *O. cousei*, a mesma análise com IRBP-indivíduos os recuperou como espécies monofiléticas.



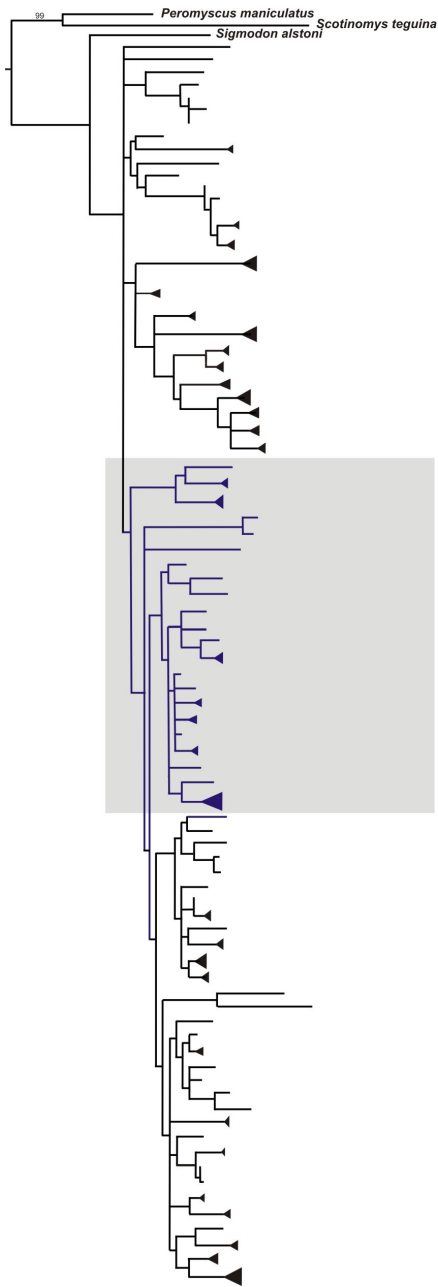
A



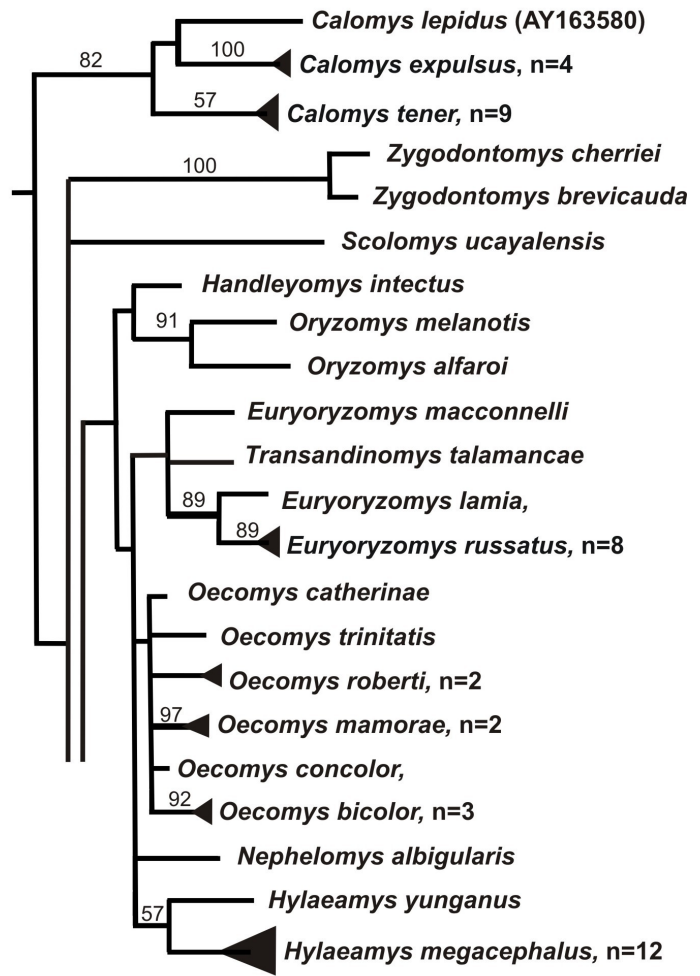
A1



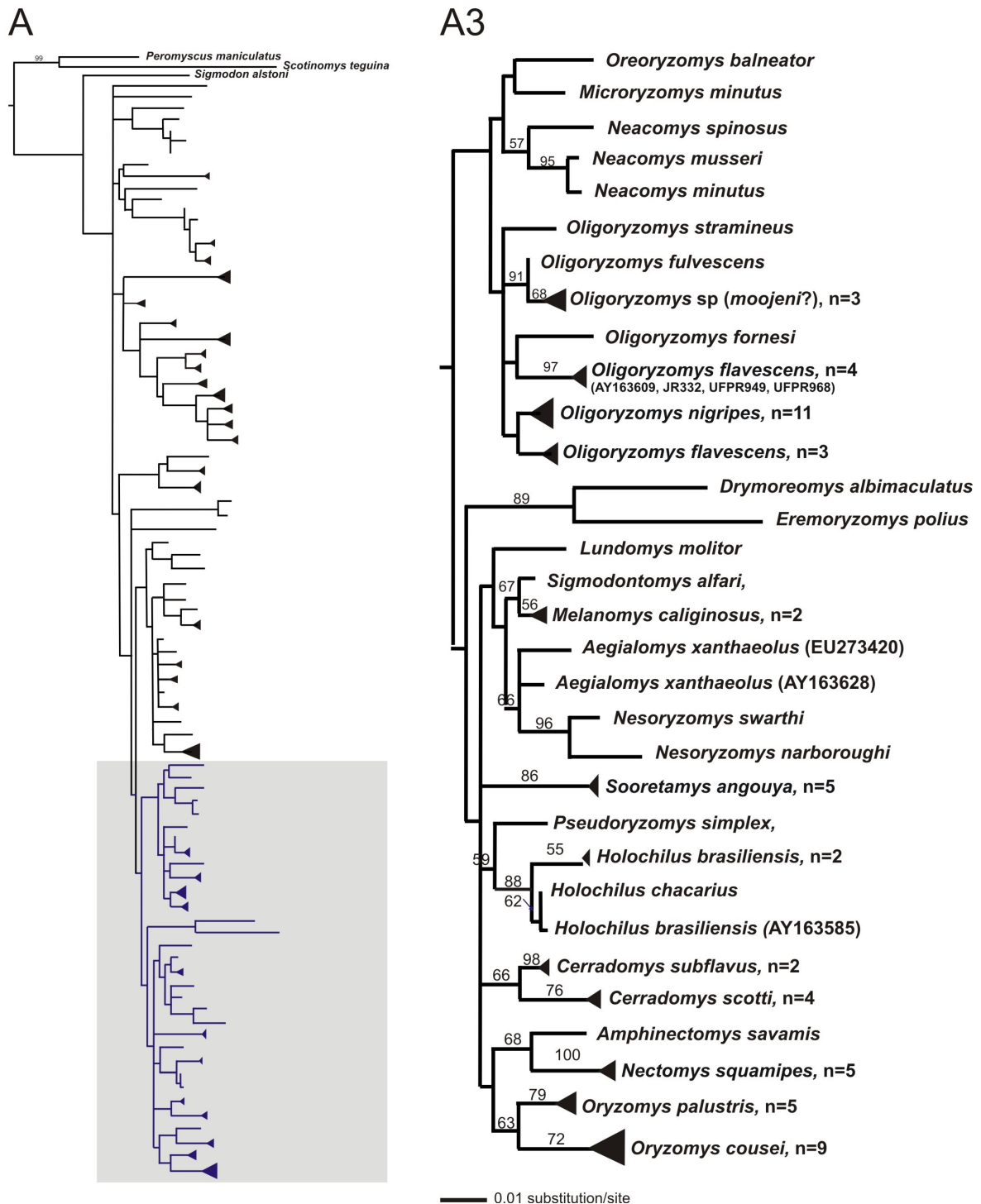
A



A2

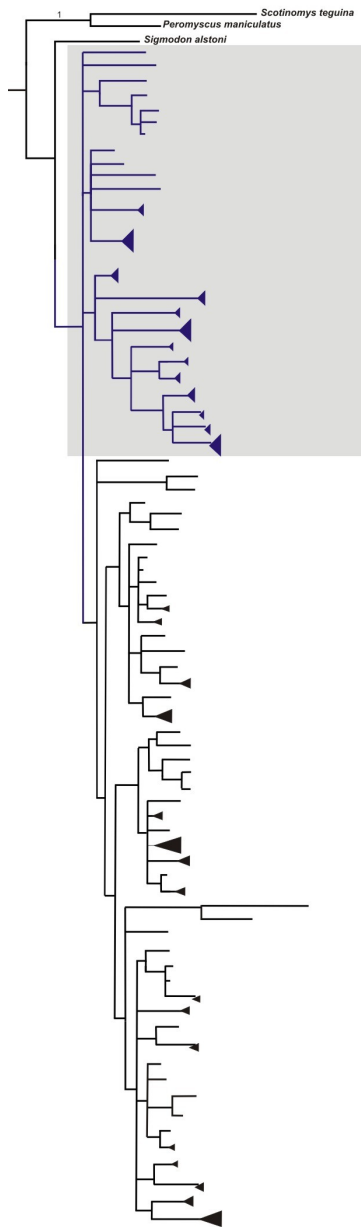


— 0.01 substitution/site

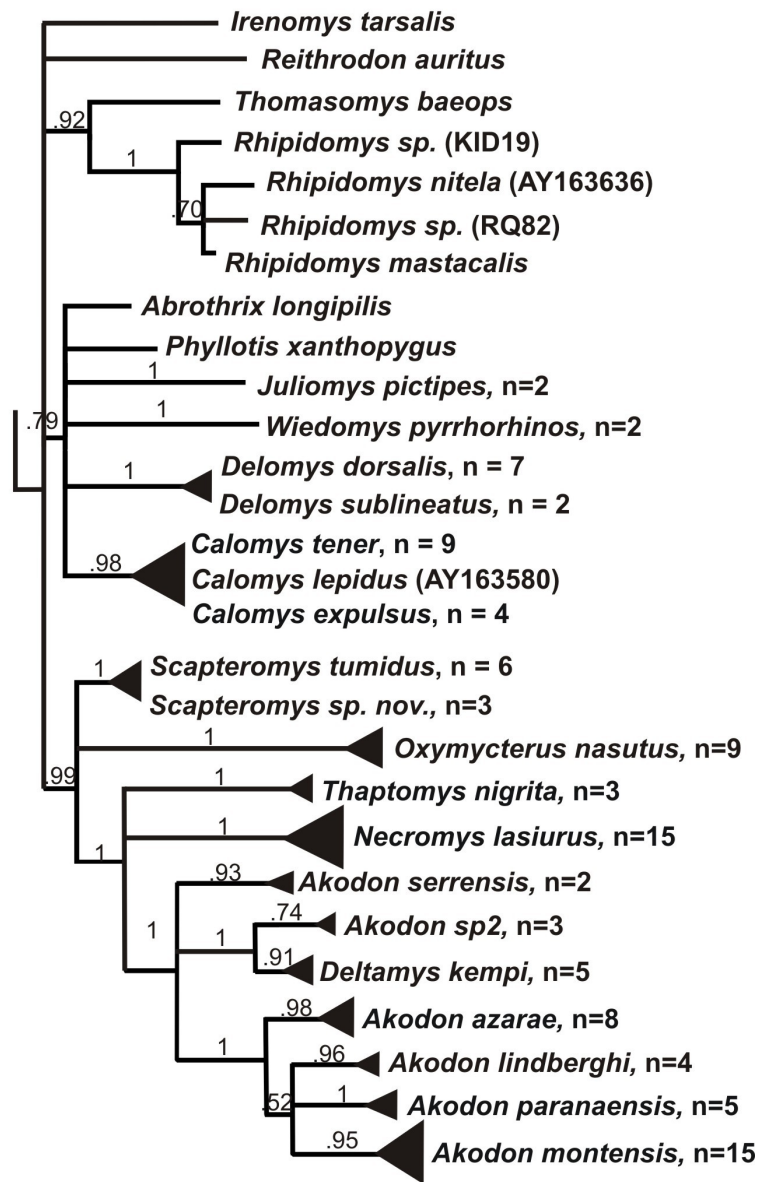


**Figura 9:** Árvore consenso (A) obtida pelo método de Máxima verossimilhança a partir de 609 pb do gene IRBP do alinhamento com redução no número de pares de base (IRBP-sítios) para 232 indivíduos, apresentada na forma de 3 sub-árvores (A1-A3). Os valores de *bootstrap* para cada clado está indicado acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de seqüências (n) analisadas está indicado.

A

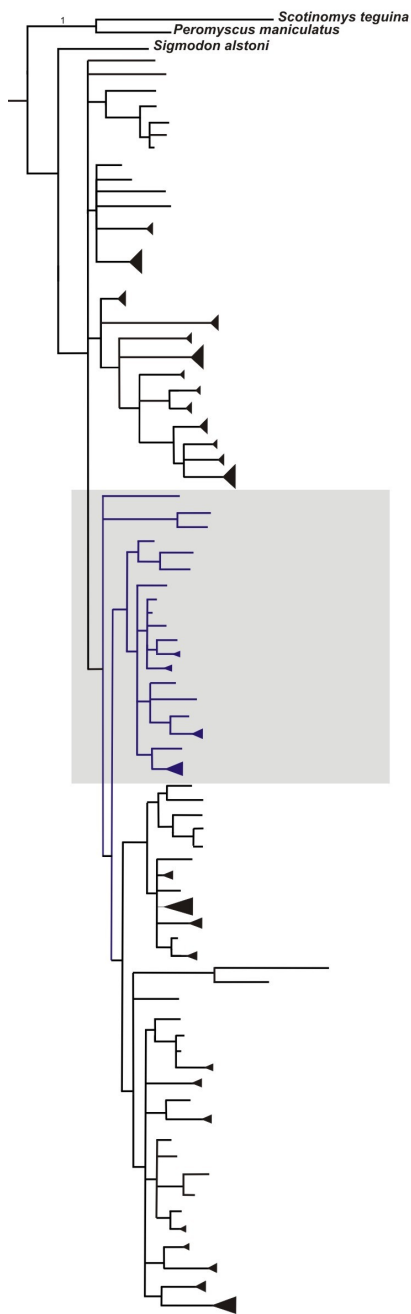


A1

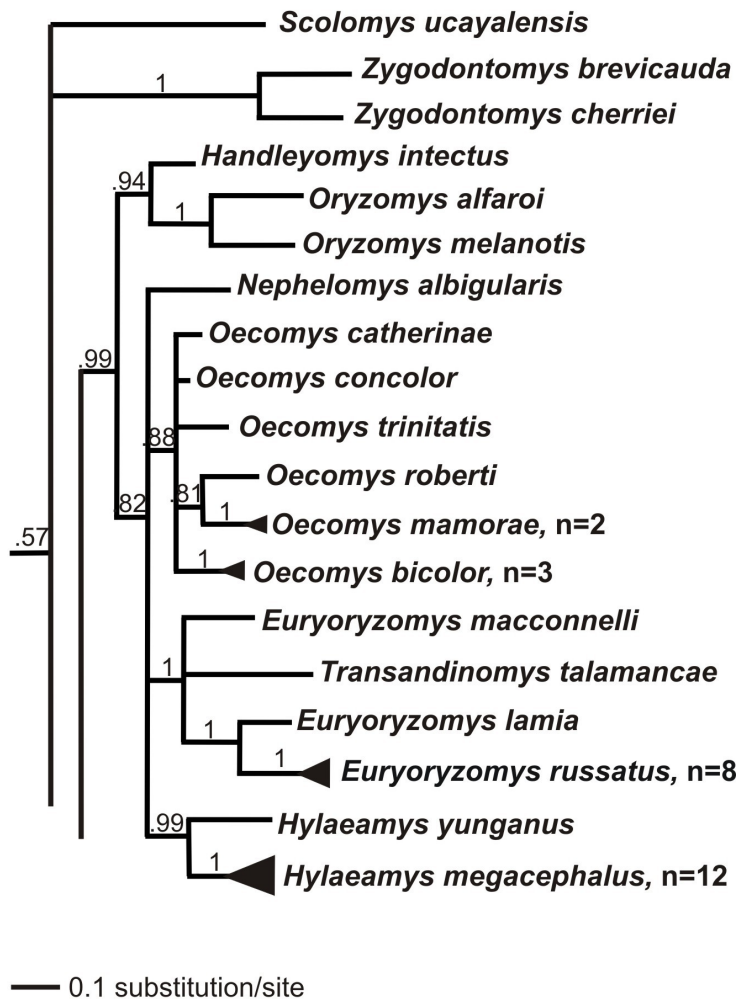


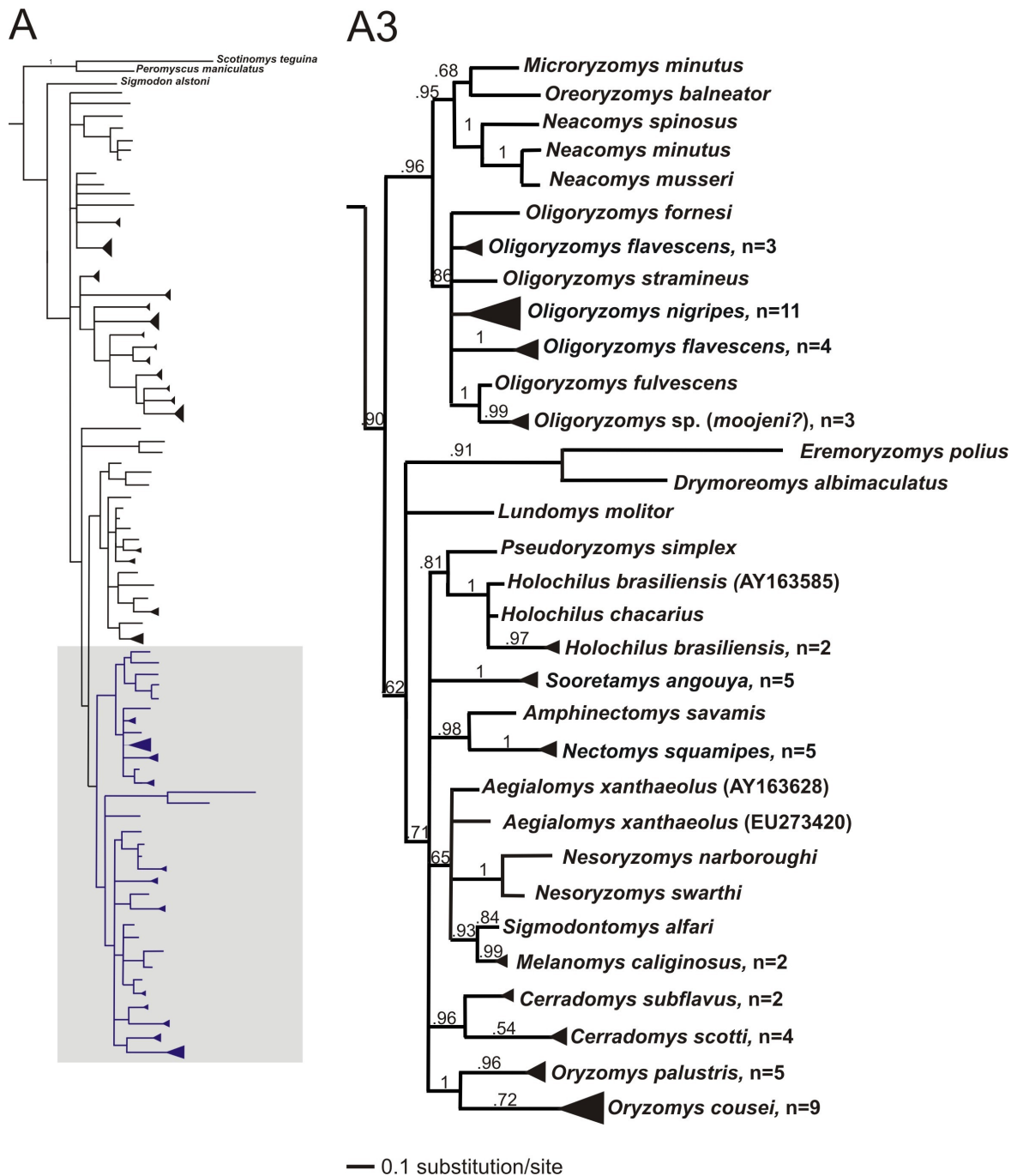
— 0.1 substitution/site

A



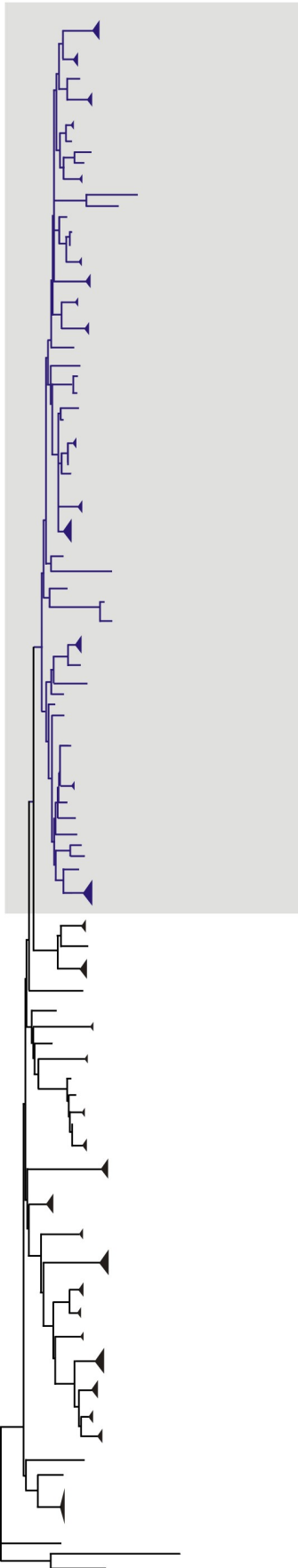
A2



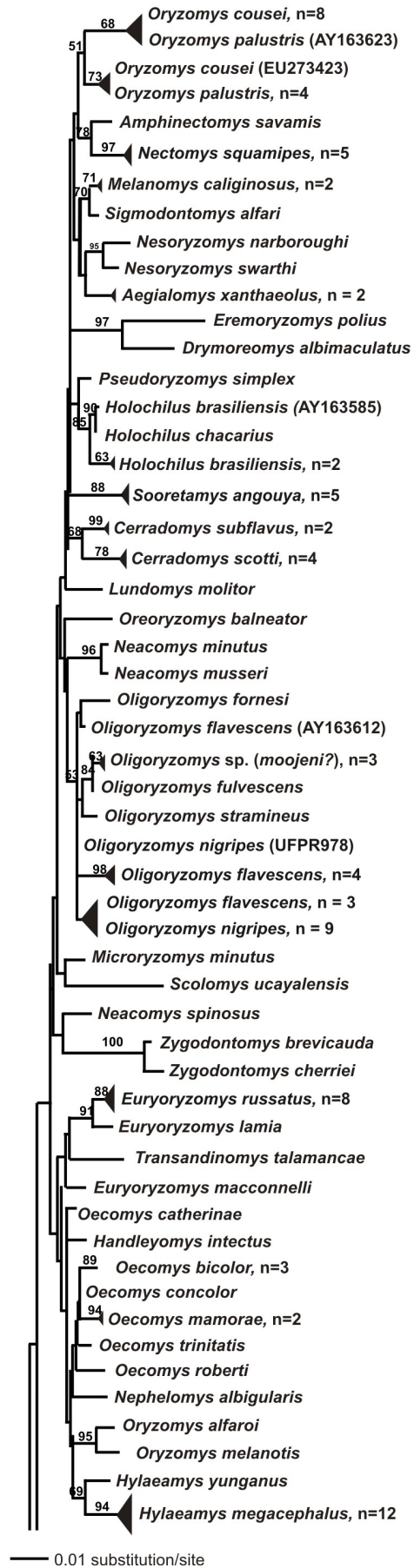


**Figura 9:** Árvore consenso (A) obtida pela análise Bayesiana de 609 pb do gene IRBP do alinhamento com redução no número de pares de base (IRBP-sítios) para 232 indivíduos, apresentada na forma de 3 sub-árvores (A1-A3). A probabilidade posterior de cada clado está indicada acima do respectivo ramo interno. Os ramos representando indivíduos da mesma espécie foram colapsados e o número de seqüências (n) analisadas está indicado.

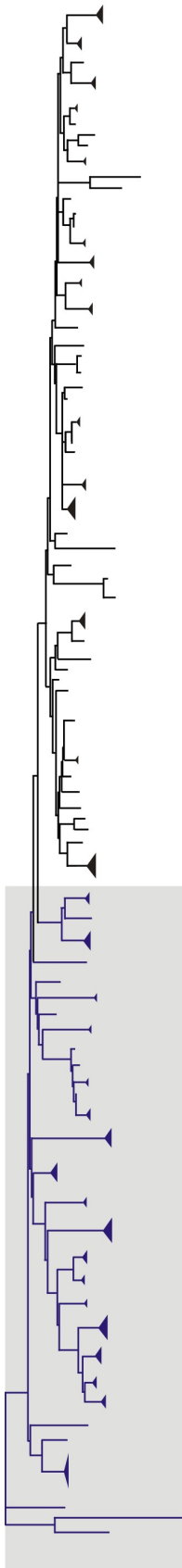
A



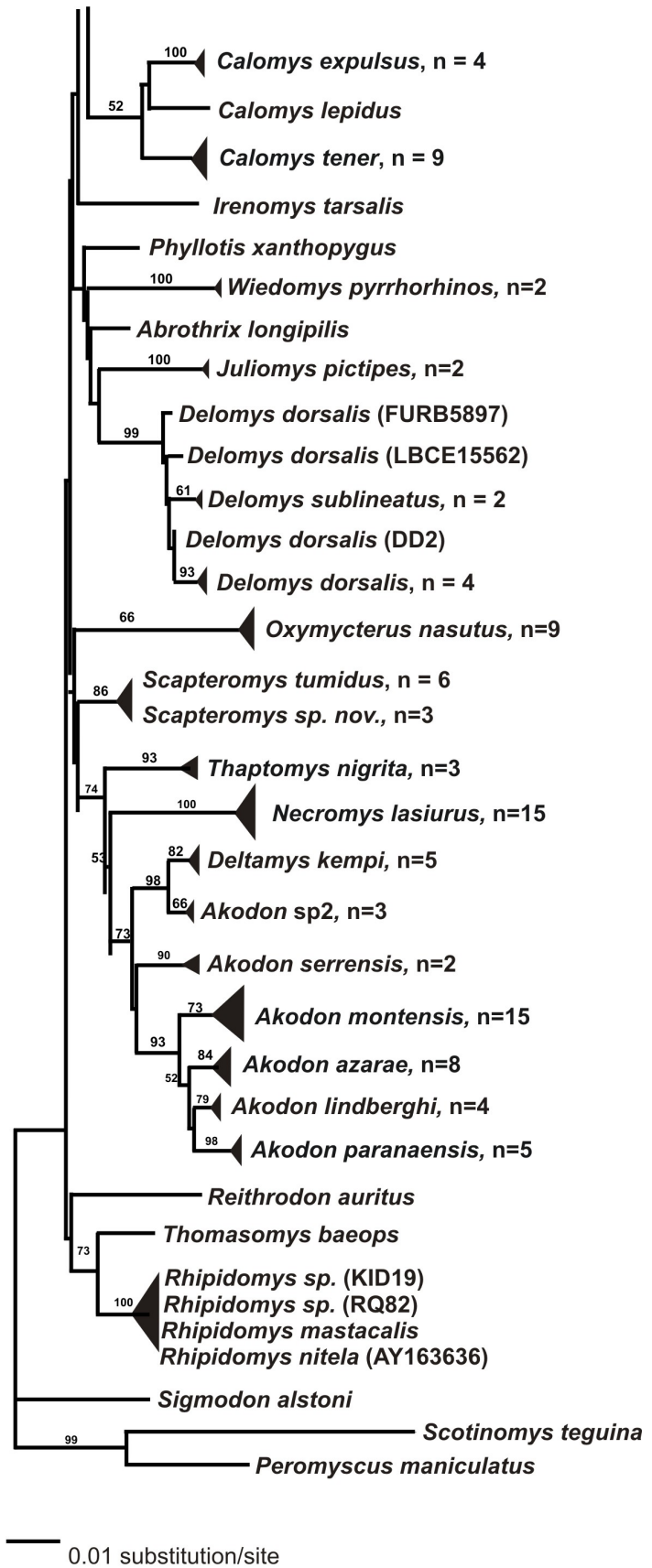
A1



A



A2

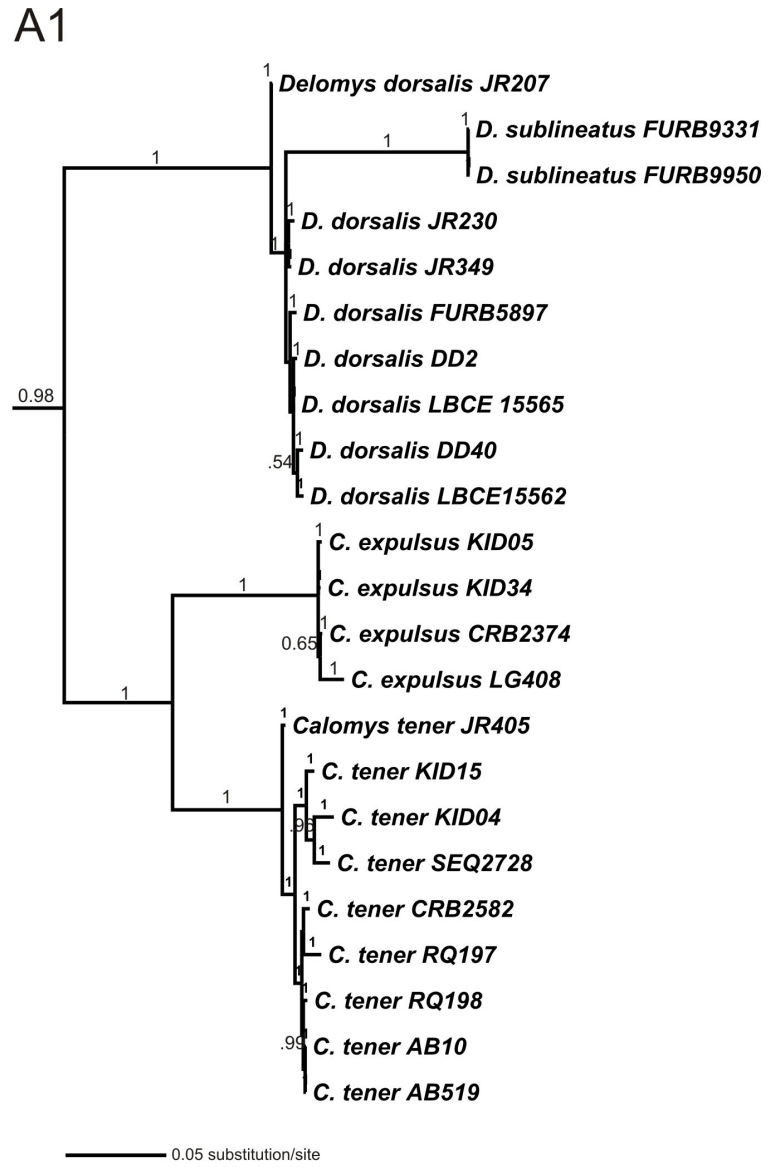
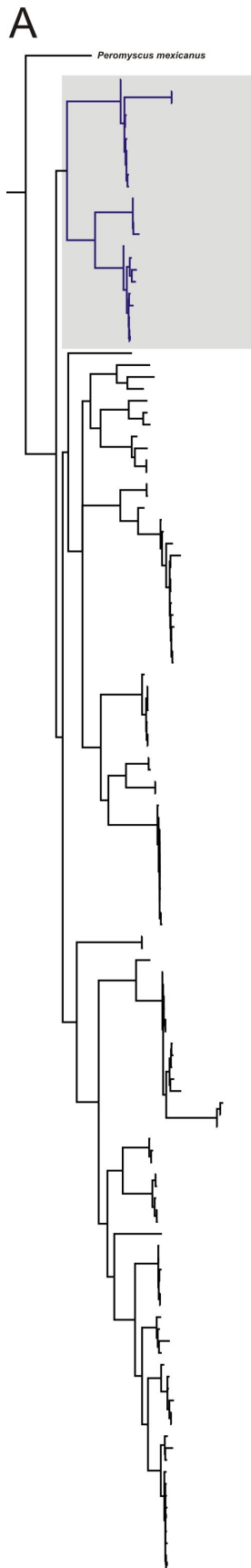




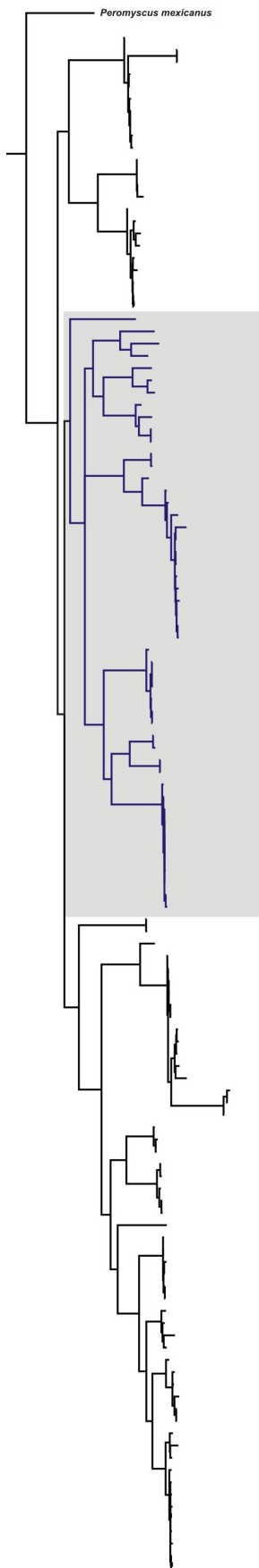
**Figura 10:** Árvore consenso (A) obtida pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de 609 pb do gene IRBP do alinhamento com redução no número de pares de base (IRBP-sítios) para 232 indivíduos, apresentada na forma de 2 sub-árvores (A1-A2). Os valores de *bootstrap* para cada clado estão indicados acima do respectivo ramo interno. Táxons em vermelho indicam agrupamentos não-esperado.

## **Análise filogenética concatenada**

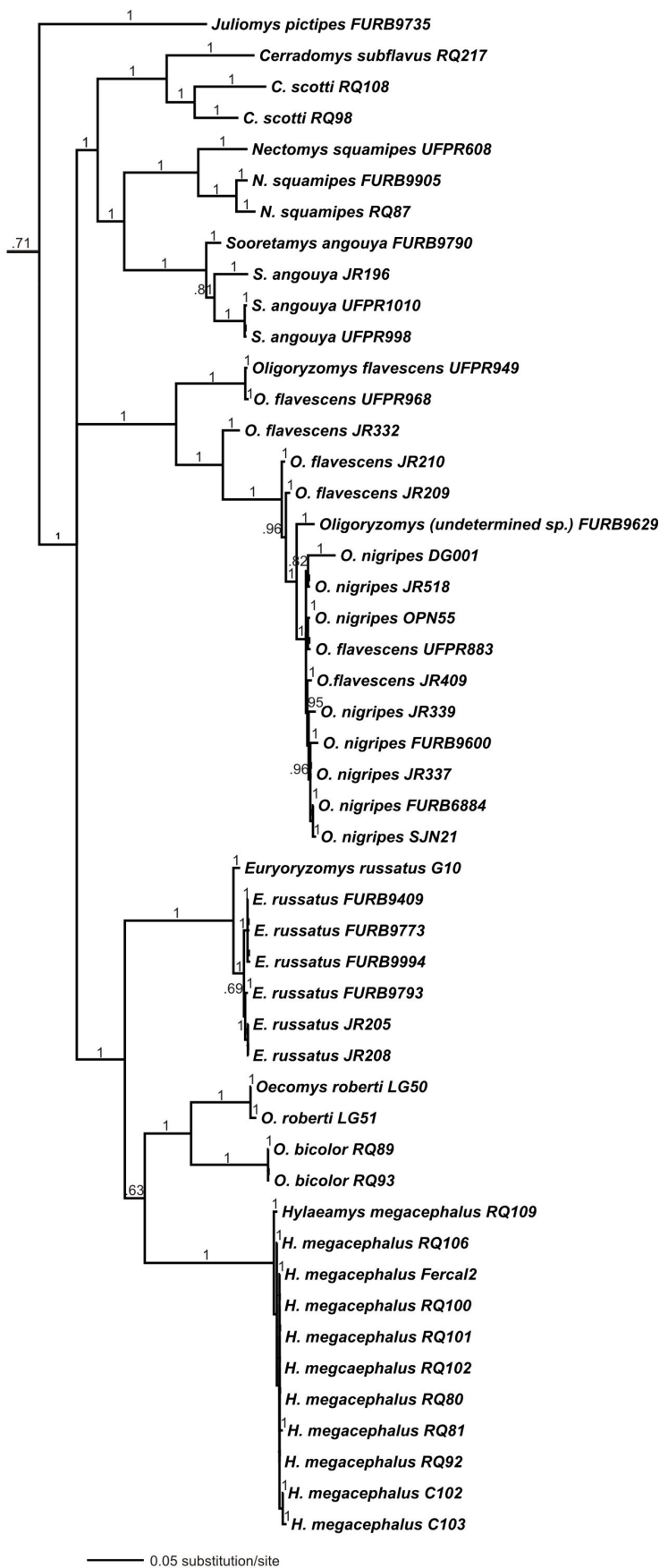
A árvore filogenética dos genes concatenados apresentou altos valores de probabilidade posterior (Fig. 11). Todas as espécies exceto *Oligoryzomys flavescens* e *Necromys lasiurus* foram recuperadas como monofiléticas (Fig. 11A2 e 11A3, respectivamente). O gênero *Akodon*, que nas análises de genes separados não apresentou monofilia, com os marcadores analisados conjuntamente confirma o agrupamento única, e com as seguintes relações: *Akodon* ((((*paranaensis*, *montensis*) *lindberghi*) *azarae*) *serrensis*) (Fig. 11A3). Em relação às tribos, Oryzomyini foi recuperada; Thomasomyini, representada pelo gênero *Rhipidomys*, posicionou-se basal aos akodontinos e *Calomys*, representante de Phyllotini, apresentou monofilia com *Delomys* sugerindo a inclusão do último gênero dentro da tribo (Fig. 11A1). *Juliomys pictipes* permanece como *incertae sedis* (Fig. 11A1). A espécie nova denominada *Akodon* sp.2 posiciona-se como grupo irmão de *Deltamys kempi*.

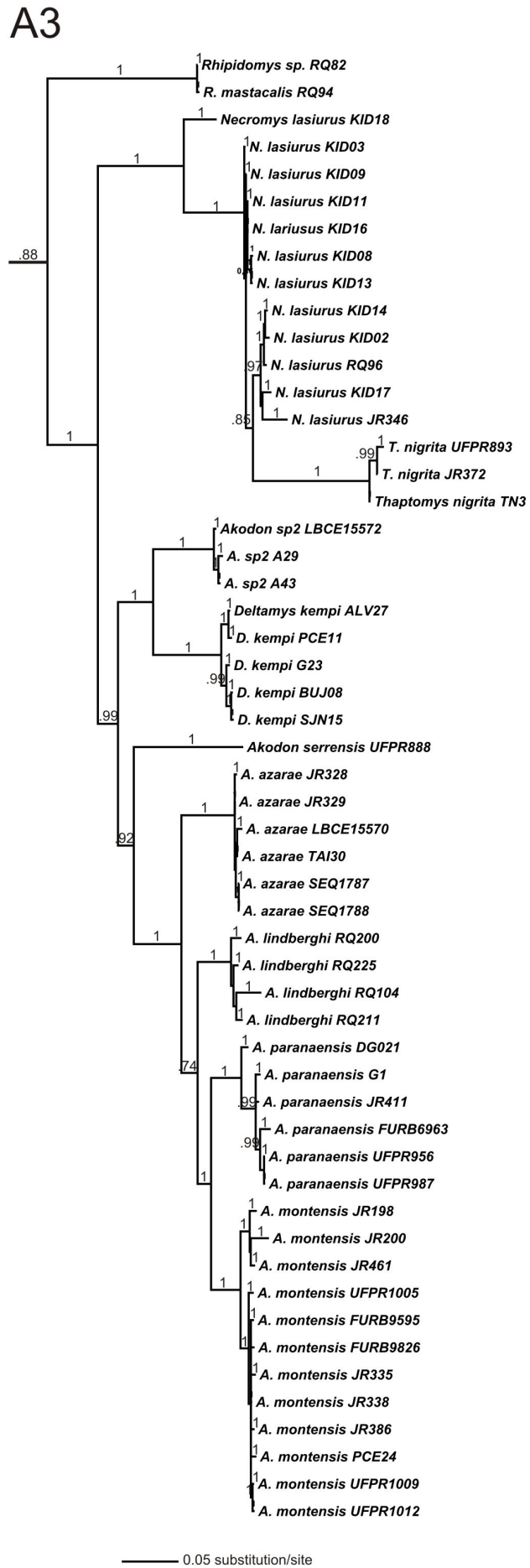
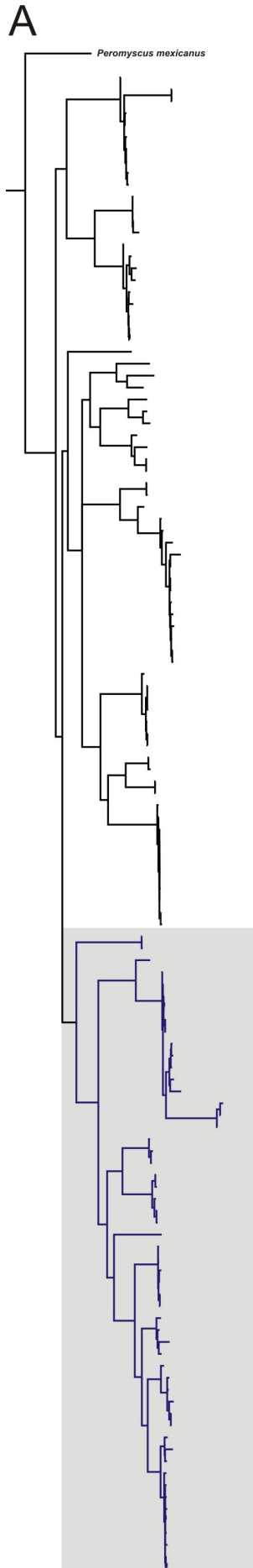


A



A2





**Figura 11:** Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana dos marcadores COI, CYTB e IRBP para 126 indivíduos. A probabilidade posterior de cada clado está indicada acima do respectivo ramo interno.

## Distâncias genéticas

As espécies *Akodon azarae* (n = 2), *A. cursor* (n = 5), *A. lindberghi* (n = 3), *A. paranaensis* (n = 7), *A. serrensis* (n = 2), *Thaptomys nigrata* (n = 5), *Euryoryzomys nitidus* (n = 2), *Cerradomys subflavus* (n = 3), *Neacomys guianae* (n = 6), *N. paracou* (n = 5), *Oecomys auyantepui* (n = 5), *Rhipidomys nitela* (n = 3), *Rhagomys rufescens* (n = 2) e *Transandinomys talamancae* (n = 2) apresentaram distância igual ou menor a 2% entre os indivíduos amostrados. Os três indivíduos de *Necromys lasiurus* apresentaram 2,26% de diferença, *Rhipidomys wetzeli* (n = 2) apresentou 2,2%, e as amostras de *Oryzomys couesi* (n = 2) tiveram 2,4% de diferença.

A espécie *Akodon montensis* apresentou menos de 3% de diferença entre os 23 indivíduos amostrados, exceto a amostra G23 que possui 0% de distância com *Deltamys kempi*.

Os doze indivíduos de *Akodon reigi* apresentaram dois grupos de sequências e uma discrepante. O grupo A contém os indivíduos TAI25, 23, 31, 34 e 35 com distância aproximada de 0,1% e o grupo B compreende os indivíduos TAI24, 26, 28, 32, 33 e 39 que distam 22% do primeiro grupo e estão mais próximos de *Thaptomys nigrata* com de cerca de 4% de distância. A sequência TAI30 dista 9,5% do grupo A e 22,5% do grupo B, apresentando aproximadamente 0% de distância das amostras de *Akodon azarae*.

Os 15 indivíduos identificados como *Akodon* sp. foram comparados com as demais espécies e localizada a sequência mais próxima de cada uma delas, ou seja, a sequência com a menor distância. As amostras RIB01, 03, 05, 10, 21 e 26 distam 0% entre elas e 0% do grupo A de *Akodon reigi*. As amostras G1 e G2 distam 0% entre elas e menos de 1% de *Akodon paranaensis*. As amostras PCE24, UFRGS6872, UFRGS6899, UFRGS7243 e UFRGS6443 distam menos de 1% de *Akodon montensis*. A amostra LBCE15570 dista 0% de A17 e *Akodon azarae*. A amostra LBCE15562 dista 0% de *Delomys dorsalis*.

A espécie *Akodon* sp.2 apresentou 8 de seus 9 indivíduos com distância inferior a 1%, entretanto a amostra A17 apresentou distância superior a 15%. Quando comparada com as demais sequências apresenta 0% de distância com *Akodon azarae*.

A espécie *Deltamys kemp* apresentou menos de 1% de divergência, exceto duas sequências, SJN15 e BUJ08, com diferença de 1,9 a 3,2% das demais. Quando comparadas com as demais sequências elas são mais próximas das demais da mesma espécie.

*Calomys expulsus* apresentou distância menor que 2% entre 8 dos 9 indivíduos amostrados, entretanto CRB2582 apresentou 11% de diferença. Essa amostra está a 0,15% de distância de *Calomys tener*. Os indivíduos RQ197 e RQ198 identificados como *Calomys* sp diferem 0,92% entre elas e 0% de *C. tener*. Dentro de *C. tener* as amostras distam 0% entre elas, exceto JR405 que apresenta diferença de 2,4%.

A espécie *Hylaeamys megacephalus* apresentou dois grupos, um com as amostras deste estudo com distância de 0,8% e outro com as amostras do Genbank que diferem 7% das primeiras. *Hylaeamys yunganus*, com quatro indivíduos amostrados, apresenta 1,1% de diferença, entretanto a sequência EU095472 possui mais de 5% de distância em relação aos demais e quando comparada com as demais sequências é mais próxima das demais da mesma espécie.

As duas amostras de *Nephelomys albigularis* diferem 3,4% e a sequência mais próxima é *Euryoryzomys macconnelli* com 14% de diferença.

A espécie *Oecomys bicolor* apresentou dois grupos, um contendo as sequências do Genbank com distância menor que 1% e outro com as duas deste estudo com 0% de diferença. Entre os dois grupos há 13% de distância. O segundo grupo apresenta como espécie mais próxima *O. rutilus* com 9% de diferença. A espécie *O. roberti* também apresentou dois grupos: um com as amostras LG50 e LG51 com 0.16% de diferença e outro com as duas amostras do Genbank que diferem 4% do primeiro grupo. Os dois grupos são mais próximos entre si do que com as demais amostras. As duas amostras de *O. rutilus* divergem 1% entre elas e 8% de EU095453, cujas sequências mais próximas são as demais de *O. rutilus*.

A espécie *Oligoryzomys flavescens* apresentou dois grupos: A, com os indivíduos UFPR949, 952 e 968, e B, com as demais amostras exceto JR332 que difere do grupo B em 4,2%. O grupo B apresentou distância menor que 2% entre eles e 20% com o grupo A que tem menos de 1% de distância entre suas amostras. A amostra JR332, coletada no Alegrete, Rio Grande do Sul, dista 2,9%



das demais amostras de *O. flavescens* do mesmo estado não apresentando maior semelhança com nenhuma outra espécie. O grupo A é mais próximo de *O. fulvescens* e *O. vegetus* com cerca de 10% de diferença. As 27 amostras de *O. nigripes* apresentam 1,6% de distância entre elas. As duas amostras de *O. fulvescens* divergem 10,2%.

Entre as amostras de *Euryoryzomys russatus* há 0,9% de divergência exceto UFPR667 que apresenta cerca de 20%. Essa sequência é mais próxima de *Akodon montensis* com menos de 1% de diferença.

Os três indivíduos de *Sooretamys angouya* apresentaram distâncias entre 8 e 17%.

Três das seis amostras de *Nectomys squamipes* apresentaram menos de 1% de diferença, porém altas distâncias foram observadas: FURB9790 dista 10% das demais e 7,4% de *Sooretamys angouya* JR196, UFPR608 dista 8% e RQ87 difere 2,5%, porém ambas são mais próximos das sequências de *N. squamipes* que das demais espécies amostradas.

As 16 amostras de *Delomys dorsalis* distam 0,6% entre elas, exceto FURB9954 que dista 17%. Essa sequência apresenta 0% de diferença com *Euryoryzomys russatus*. Na espécie *D. sublineatus* duas das três sequências distam menos de 1% entre si, entretanto FURB9994 apresenta 15% de diferença das demais e 0% de *E. russatus*.

Entre as amostras sem identificação taxonômica em nenhum nível a amostra SEQ1788 difere 0,46% de *Akodon azarae* JR328. As sequências SEQ2728 e SEQ2731 diferem 0,15% entre si e 0,45% de *Calomys tener*. KID15 difere em 0,2% de *C. tener* AB519 e AB10. KID04 é mais próximo de SEQ2731 pela distância de 1,1%. KID05 e KID34 diferem 0,4 e 0,15% respectivamente de *C. expulsus* CRB2733. KID02, 03, 08, 09, 11, 13, 14, 16, 17 e 18 diferem entre 0,6 até 1,2% de *Necomys lasiurus* RQ97 e RQ96. LBCE15565 difere 0% de *Delomys dorsalis* JR229 e JR290. LBCE15572 difere 0,1% de *Akodon sp2*. KID23 dista 10,7% de KID60 e esse cerca de 10% das espécies *Oligoryzomys fulvescens* e *O. flavescens*. KID37 dista 14,5% de *Cerradomys subflavus* e B201 difere 18,3% das sequências de *Oecomys roberti* provenientes genbank.

## 6.4 Discussão

Neste estudo foram comparadas as árvores probabilísticas e de distância genética de três marcadores moleculares e as árvores do gene COI com a distância genética dentro das espécies. De forma geral os métodos recuperaram as mesmas espécies com monofilia e os ramos terminais das árvores apresentaram altos valores de suporte e probabilidade posterior, concordando na maior parte das relações já descritas na literatura. Entretanto, verificou-se agrupamentos distintos e inéditos cujo suporte é proveniente do uso de marcadores concatenados, que serão descritos a seguir.

Os genes analisados separadamente por métodos que geram árvores mostraram adequada resolução para as tribos de sigmodontíneos, porém, na maioria das vezes com baixo valor de suporte. A reduzida amostragem nas tribos Thomasomyini e Phyllotini (um gênero nos marcadores mitocondriais e dois no nuclear) inviabilizou uma avaliação sobre as mesmas. Oryzomyini foi recuperada em todas as árvores de todos os genes apesar do baixo suporte em algumas delas. Por outro lado, a tribo Akodontini não demonstrou os mesmos resultados apresentando parafilia especialmente nas árvores de COI, exceto na de MV.

Diversos estudos anteriores recuperaram as tribos através de dados moleculares: Smith & Patton (1999) em seu estudo com CYTB através da análise de máxima parcimônia (MP) recuperou todas as tribos, porém também com baixo suporte (*bootstrap* <50%). D'Elía *et al.* (2003) também utilizaram o marcador CYTB e através de análise de MP obtiveram como resultado a tribo Akodontini com suporte moderado. Weksler (2003) utilizou o gene IRBP e com análises de parcimônia e MV encontrou Akodontini, Abrothrichini, Thomasomyini e Phyllotini monofiléticas, porém fracamente suportadas, exceto Oryzomyini. D'Elía *et al.* (2006) utilizaram o IRBP nas análises de MP e ML e observaram as tribos bem suportadas, e Weksler *et al.* (2006) na análise de MP do gene IRBP mais 99 caracteres morfológicos encontraram também tribo Oryzomyini bem suportada. O primeiro estudo a combinar dados de marcadores mitocondriais e nucleares de sigmodontíneos, CYTB e IRBP, utilizou o método de MP com foco na tribo Akodontini (D'Elía 2003). As tribos foram recuperadas com altos valores de suporte exceto a tribo Phyllotini, porém poucos gêneros além dos akodontinos foram amostrados. O estudo falhou em recuperar Oryzomyini, pois *Scolomys*

ficou externo ao clado da tribo, e não reconheceu Thomasomyini, pois *Thomasomys* não agrupou com *Rhipidomys*.

As espécies posicionadas como *incertae sedis* permanecem sem relação com nenhuma tribo neste estudo, exceto *Delomys* que parece ser um phyllotino baseado na análise dos dados concatenados, relação já encontrada em outros estudos com IRBP (D'Elía *et al.*, 2006; Weksler, 2003). A espécie *Rhagomys rufescens* atribuída à tribo Thomasomyini por D'Elía *et al.* (2006) agrupou com *Rhipidomys* nas análises com o gene CYTB e apenas na IB apresentou alto valor de probabilidade posterior. As relações entre as tribos permanecem não esclarecidas devido aos baixos suportes e resolução das árvores, o que é atribuído a radiação adaptativa ocorrida no grupo (Engel *et al.*, 1998; Smith & Patton, 1999; Weksler, 2003).

Neste estudo o gênero *Akodon*, apesar de parafilético nas análises com marcadores mitocondriais devido à posição de *A. serrensis* junto a *Thaptomys nigrita*, é monofilético com base na maioria das árvores de IRBP e de dados concatenados. A mesma topologia de *A. serrensis* fora do gênero e relacionado a *T. nigrita* com baixo suporte foi encontrada na análise de MP com o gene CYTB com 27 espécies de *Akodon* (D'Elía *et al.* 2003) e na MP de CYTB e IRBP com 11 espécies de *Akodon* (D'Elía 2003), o que evidencia a necessidade de revisão taxonômica do grupo.

Em todas as análises filogenéticas apresentadas neste estudo a espécie inicialmente denominada *Akodon* sp.2 posicionou-se como grupo irmão de *Deltamys kempii*, gênero endêmico da Planície Costeira no Uruguai e no Estado do Rio Grande do Sul. Tal relação sugere redefini-la como *Deltamys* sp.nov, coletada no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul.

Recentemente Ventura *et al.* (2011) identificaram um nova espécie de *Deltamys* através da análise de quatro indivíduos coletados no município de Esmeralda, cerca de 230 km de distância do local onde *Deltamys* sp.nov foi coletado. *Deltamys* sp apresenta  $2n = 40$  e distância genética de 12% em relação a *D. kempii* (1.140pb do CYTB, modelo de Kumura 2P) e *Deltamys* sp.nov possui  $2n = 34$  e diverge de 10 a 11% de *D. kempii*. As amostras deste estudo necessitam de revisão taxonômica por especialista para definir sua inclusão no gênero *Deltamys* ou potencial *status* de novo gênero.

As duas espécies *Oligoryzomys nigripes* e *O. flavescens* foram monofiléticas apenas nas análises com o marcador COI. Essas espécies ocorrem em simpatria em muitos dos locais onde foram coletadas e são de difícil distinção apenas por morfologia externa, portanto não se pode descartar identificações errôneas em campo. Análises moleculares são eficazes na separação dessas duas espécies que não são irmãs (Weksler, 2003; Weksler *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2009; González-Iltig *et al.*, 2010). González-Iltig *et al.* (2010) avaliaram os marcadores mitocondriais CYTB e região controladora das espécies de *Oligoryzomys* presentes na Argentina e identificaram o complexo *flavescens* que compreende quatro clados: Oeste da Argentina, Leste da Argentina, *O. fornesi* e Brasil. Os autores ressaltam *O. fornesi* como uma espécie válida e salientam a necessidade de revisão taxonômica de *O. flavescens*. No Brasil a espécie ocorre numa ampla distribuição geográfica que compreende os biomas Cerrado e sul da Mata Atlântica (Weksler & Bonvicino, 2005), sendo importante uma avaliação da diversidade e monofilia do clado brasileiro. Neste estudo o indivíduo JR332, coletado em Alegrete, dista 2,9% das demais amostras de *O. flavescens* e pode pertencer ao clado Leste da Argentina, que compreende os indivíduos do Uruguai e leste da Argentina. O município de Alegrete no Estado do Rio Grande do Sul está situado próximo desses países e está dentro do bioma Pampa, o mesmo tipo de vegetação encontrada onde ocorre o clado descrito por González-Iltig *et al.* (2010).

Esse estudo foi o primeiro a unir três marcadores moleculares para avaliar as relações filogenéticas de Sigmodontinae. A vantagem da concatenação de marcadores é evitar uma árvore que retrate apenas a história evolutiva de um gene. A árvore obtida a partir da junção dos três loci é bem suportada e confirma a monofilia das espécies e tribos.

A espécie *Necromys lasiurus* apresentou monofilia em todas as análises, exceto na concatenação onde é parafilética. Os dois clados da árvore de dados concatenados correspondem aos grupos de sequências formados nas análises de CYTB, onde são irmãos. As mesmas amostras nas demais análises não formam nenhuma estruturação. A revisão do gênero foi sugerida por D'Elia (2003) que em seu estudo encontrou politomia no gênero *Necromys*, única politomia do estudo. As relações apresentadas nas árvores podem ser enviesadas pela amostragem incompleta tanto de espécies quanto de indivíduos

dentro da distribuição geográfica da espécie, pois o grupo em estudo é bastante diverso. As distâncias auxiliam a identificar uma provável falta de táxons intermediários quando duas espécies irmãs na árvore apresentam alta distância genética entre elas ou quando um indivíduo dentro de um clado da árvore possui uma alta distância genética em relação aos demais, mas não é próximo de nenhuma outra amostra do estudo. Também, auxiliam a determinar indivíduos identificados erroneamente do ponto de vista taxonômico, ou que possam representar uma nova espécie ou gênero. As distâncias genéticas do COI dentro das espécies amostradas concordam com as árvores filogenéticas obtidas, inclusive na identificação de sequências com distância discrepante, suportando as reidentificações realizadas pelos métodos filogenéticos e de NJ.

A identificação de espécies de roedores sigmodontíneos é complexa, embora muitas vezes seja tratada como simples. Os caracteres morfológicos comumente usados para distinguir as espécies não são estáveis, isto é, diversas similaridades morfológicas existentes facilmente confundem coletores com pouca, ou nenhuma, experiência no grupo. Além disso, os diferentes estágios do desenvolvimento, plasticidade fenotípica e espécies crípticas (.e.g. *Akodon* spp.) aumentam a chance de identificações errôneas. Os marcadores moleculares oferecem um método testável de identificação sem necessidade de experiência prévia neste grupo taxonômico, pois é possível comparar e quantificar a diferença entre indivíduos, e que pode ser utilizado por qualquer profissional, desde que existam protocolos de laboratório definidos, uma metodologia estabelecida e uma base de dados confiável.

Neste estudo foi possível verificar que o gene COI distingue a maioria das espécies amostradas, todavia a utilização apenas de distância genética e NJ não é a melhor metodologia, visto que a identificação de espécies foi mais convincente quando métodos baseados em caracteres foram utilizados. Além disso, estabelecer um limiar de distância genética de um marcador molecular para definir o que é intraespecífico quando grupos são comparados desconsidera a história evolutiva de cada linhagem.

Os *primers* universais LCO1420 e HCO2198 não amplificam todas as espécies da subfamília e não podem ser exclusivamente utilizados em avaliações de biodiversidade de roedores. As relações filogenéticas são pouco recuperadas pelo COI, portanto ele não é indicado para relacionar uma amostra dentro de um

nível taxonômico mais elevado que espécie. Em relação a diagnose de novas espécies é possível verificar amostras que necessitam de análises (tanto genética quanto morfológica) mais refinada, pois o uso do DNA *barcoding* não substitui a análise taxonômica.

Embora com amostragem ampla, esse estudo provê um banco de dados inicial para o uso do DNA *barcoding* como ferramenta de identificação de espécies de sigmodontíneos. É necessário incrementar o número de espécies e de indivíduos nas espécies pouco amostradas e utilizar outros conjuntos de *primers* para gerar dados que representem a diversidade do grupo e permitam a utilização do DNA *barcoding* amplamente. De acordo com Golsdstein & DeSalle (2011): “o que resta é reconciliar o mecanismo preciso da análise por *barcoding* com o rigor empírico e filosófico da sistemática”.

## 6.5 Referências bibliográficas

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.

D'Elía, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-32.

D'Elía, G., González, E.M., Pardiñas, U.F.J., 2003. Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammal. Biol.* 68, 351–364

D'Elía, G., Luna, L., González, E.M., Patterson, B.D., 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 558-564.

Engel, S.R., Hogan, K.M., Taylor, J.F., Davis, S.K., 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents. *Mol. Biol. Evol.* 15, 35–49.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.

Goldstein, P.Z., De Salle, R., 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* 33: 135-147.

González-Ittig, R.E; Salazar-Bravo, J., Barquez, R.M., Gardenal, C.N., 2010. Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South América. *Zoologica Scripta*, 39(6):511-526.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology*, 59(3):307-21.

Miranda, G.B., Oliveira, L.F.B., Andrades-Miranda, J., Langguth, A., Callegari-Jacque, S.M., Mattevi, M.S., 2009. Phylogenetic and Phylogeographic Patterns in Sigmodontine Rodents of the Genus *Oligoryzomys*. *J Hered.* 100 (3): 309-321

Nylander, J.A.A., 2004. MrAIC.pl. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Palma, R.E., Rivera-Milla, E., Salazar-Bravo, J., Torres-Pérez, F., Pardiñas, U.F.J., Marquet, P.A., Spotorno, A., Meynard, A.P., Yates, T.L., 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy*, 86:191–200.

Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008. Available from: <http://www.R-project.org>.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572-1574.

Smith, M.F., Patton, J.L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 149-177.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J. Mammal. Evol.* 6, 89–128.

Steppan, S.J., 1995. Revision of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae), with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. *Fieldiana: Zool. (new ser.)* 80, 1–112.

Swofford, D.L. 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Ventura, K., Fagundes, V., D'Elía, G., Christoff, A.U., Yonenaga-Yassuda, Y., 2011. A New Allopatric Lineage of the Rodent *Deltamys* (Rodentia:Sigmodontinae) and the Chromosomal Evolution in *Deltamys kempi* and *Deltamys* sp. *Cytogenet Genome Res.* 135(2):126-34.

Weksler, M., 2003. Phylogeny of neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 331–349.

Weksler, M., Bonvicino, C.R., 2005. Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado with the description of two new species. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 63, 113–130.

Weksler, M., Percequillo, A.R., Voss, R.S., 2006. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *Am. Mus. Nov.* 3537: 1-29.

Xia, X., Xie. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.



## 7. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo é o primeiro a unir três marcadores moleculares para avaliar as relações filogenéticas de Sigmodontinae. Foram avaliadas as relações filogenéticas e o uso de sequências do COI para identificação taxonômica de roedores sigmodontíneos a partir de métodos baseados em distância e probabilísticos de inferência filogenética.

Os diferentes métodos empregados recuperaram a maioria dos gêneros e espécies como grupos monofiléticos apresentando altos valores de suporte nos ramos terminais das árvores. As tribos descritas na literatura foram reconhecidas, todavia a maioria das vezes apresentaram baixo suporte. Os resultados também apóiam o reconhecimento de uma nova espécie de akodontino no sul do Brasil, *Deltamys* sp.nov. A descrição formal dessa espécie e sua inclusão no gênero *Deltamys* ou status de novo gênero depende de revisão taxonômica dos espécimes por especialista.

O DNA barcoding é uma boa ferramenta para discriminar entre a maioria das espécies de sigmodontíneos ou pelo menos como parte do processo de identificação. As identificações errôneas são detectadas tanto pela posição filogenética na árvore quando nos valores discrepantes de distância intra-específica. Até estudos com amostragem mais ampla serem realizados, o COI não é indicado para relacionar uma amostra dentro de um nível taxonômico mais elevado que espécie.

O sucesso na identificação de espécimes sob consulta de forma confiável é possível apenas se o banco de dados possuir sequências de DNA com correta identificação taxonômica. Uma forma de aprimorar o método é a inclusão de sequências de tipos ou parátipos quando possível e a utilização de acervos de museu completos como referência para apoiar os estudos de DNA barcoding e clarificar os resultados duvidosos. Além disso, é indispensável a pesquisa básica realizada por taxonomista, pois a identificação de classificações erradas requer conhecimentos prévios como distribuição dos táxons e posição filogenética.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., Marshall, C., McGuire, J.L., Lindsey, E.L., Maguire, K.C., Mersey, B., Ferrer, E.A., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*. 471:51-57.
- Blaxter, M.L., 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 359:669 – 679.
- Bonvicino, C.R., de Oliveira, J.A., Gentile, R., 2010. A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Eastern Brazil. *Zootaxa* 2336: 19-25.
- Borisenko, A.V., Lim, B.K., Ivanova, N.V., Hebert, P.D.N., 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 471-479.
- Brum, F.T., Duarte, L. da S., Hartz, S.M., 2010. Seed removal patterns by vertebrates in different successional stages of Araucaria forest advancing over southern Brazilian grasslands. *Community Ecology* 11(1): 35-40.
- Carroll, D.S., Mills, J.N., Montgomery, J.M., Bausch, D.G., Blair, P.J., Burans, J.P., Felices, V., Gianella, A., Iihoshi, N., Nichol, S.T., Olson, J.G., Rogers, D.S., Salazar, M., Ksiazek, T.G., 2005. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 42–44.
- Costa, L.P., Pavan, S.E., Leite, Y.L.R., Fagundes, V., 2007. A new species of *Juliomys* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from the Atlantic forest of southeastern Brazil. *Zootaxa* 1463: 21-37.
- D'Elía, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19: 307-32.
- D'Elía, G., González, E.M., Pardiñas, U.F.J., 2003. Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammal. Biol.* 68, 351–364
- D'Elía, G., Luna, L., González, E.M., Patterson, B.D., 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 558-564.
- Eisenberg, J.F., 1999. Biodiversity reconsidered. In J.F. Eisenberg and K.H. Redford (editors), *Mammals of the Neotropics*, vol, 3. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil: 527–548. Chicago: University of Chicago Press.
- Ekrem, T., Willassen, E., Stur, E., 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Mol Phylogenet Evol* 43: 530-542.
- Emmons, L.H., Patton, J.L., 2005. A New Species of *Oryzomys* (Rodentia: Muridae) from Eastern Bolivia. *Am. Mus. Nov.* 3478: 1-26.

- Engel, S.R., Hogan, K.M., Taylor, J.F., Davis, S.K., 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents. *Mol. Biol. Evol.* 15, 35–49.
- Goldstein, P.Z., De Salle, R., 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* 33: 135-147.
- Gonçalves, P.R., Almeida, F.C., Bonvicino, C.R., 2005. A new species of *Wiedomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Brazilian Cerrado. *Mamm. Biol.* 70: 46-50.
- Hajibabaei, M., Singer, G., Hickey, D., 2006. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49: 851-854.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A., Hebert, P.D., Hickey, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23(4):167-72.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: S96-S99.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M., 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 10: 1657-1663.
- Levis, S., Garcia, J., Pini, N., Calderon, G., Ramirez, J., Bravo, D., St Jeor, S., Ripoll, C., Bego, M., Lozano, E., Barquez, R., Ksiazek, T.G., 2004. Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 658–663.
- Lefort, M.-C., Boyer, S., Worner, S.P., Armstrong, K., 2011. Noninvasive molecular methods to identify live scarab larvae: an example of sympatric pest and nonpest species in New Zealand. *Molecular Ecology Resources*.
- Little DP, Stevenson DW. 2007. A comparison of algorithms for the identification of specimens using DNA barcodes: examples from gymnosperms. *Cladistics* 23: 1–21.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., McKee, K.T., Ksiazek, T.G., Oro, J.G., Maiztegui, J.I., Calderón, G.E., Peters, C.J., Childs, J.E., 1991. Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 589–597.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., McKee, K.T., Calderón, G.E., Maiztegui, J.I., Nelson, G.O., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Childs, J.E., 1992. A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 749–763.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., Childs, J.E., McKee, K.T., Maiztegui, J.I., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Jahrling, P.B., 1994. Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 554–562.

- Nei, M., Kumar, S., 2000; Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333pp.
- Pardiñas, U.F.J., D'Elía, G., Cirignoli, S., Suarez, P., 2005. A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from northern campos grasslands of Argentina. *J. Mamm.* 86: 462-474.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., 2011. On the taxonomic status of the Brazilian mouse *Calomys anoblepas* Winge, 1887 (Mammalia, Rodentia, Cricetidae). *Zootaxa* 2788: 38-44.
- Percequillo, A.R., Carmignotto, A.P.J., Silva, M.J., 2005. A new species of *Neusticomys* (Ichthyomyini, Sigmodontinae) from central Brazilian Amazonia. *J. Mamm.* 86: 873-880.
- Percequillo, A.R., Hingst-Zaher, E., Bonvicino, C.R., 2008. Systematic Review of Genus *Cerradomys* Weksler, Percequillo and Voss, 2006 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with Description of Two New Species from Eastern Brazil. *Am. Mus. Nov.* 3622: 1-46.
- Percequillo, A.R., Weksler, M., Costa, L.P., 2011. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. *Zool. J. Linn. Soc.* 161: 357-390.
- Rocha, R.G., Ferreira, E., Costa, B.M.A., Martins, I.C.M., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Fonseca, C., 2011. Small mammals of the mid-Araguaia River in central Brazil, with the description of a new species of climbing rat. *Zootaxa* 2789: 1-34.
- Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W., Bowen, M.D., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Yates, T.L., 2002. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1: 191-199.
- Smith, M.F., Patton, J.L., 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J. Mammal. Evol.* 6, 89–128.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 3657-3662.
- Steppan, S.J., 1995. Revision of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae), with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. *Fieldiana: Zool. (new ser.)* 80, 1–112.
- Steppan, S.J., Adkins, R.M., Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst. Biol.* 53, 533–553.
- Sutou, M., Kato, T. Ito, M., 2011. Recent discoveries of armyworms in Japan and their species identification using DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 11: 992–1001.
- Videla, C., Kajon, A., Carballal, G., Weissenbacher, M., 1989. *Calomys callidus* as a potential Junin virus reservoir. *J. Med. Virol.* 27, 238–243.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1847-1857.

- Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*. 29:188-197.
- Weksler, M., 2003. Phylogeny of neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 331–349.
- Wiemers, M., Fiedler, K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4: 1-16.
- Will KW, Rubinoff D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20: 47–55.
- Williams, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Palma, R.E., Vera, I., Velasquez, F.D., Baez, E., Schmidt, W.E., Figueroa, R.E., Peters, C.J., Zaki, S.R., Khan, A.S., Ksiazek, T.G., 1997. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 274–282.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press.
- Witt, J.D.S., Threlloff, D.L., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.* 15: 3073-3082.
- Xia, Y., Gu, H.-F., Peng, R., Chen, Q., Zheng, Y.-C., Murphy, R. W. and Zeng, X.-M., 2012. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Molecular Ecology Resources*, 12: 48–56.
- Yahnke, C.J., Meserve, P.L., Ksiazek, T.G., Mills, J.N., 2001. Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan chaco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 768–776.
- Yassin A, Markow TA, Narechania A, O'Grady PM, et al. 2010. The Genus *Drosophila* as a model for testing tree and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Mol Phylogenet Evol* 56: 1–10