



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA - PPG-MDB

**FILOGEOGRAFIA COMPARATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO
GÊNERO HYLAEAMYS (RODENTIA: SIGMODONTIDAE).**

MÁRIO DA SILVA NUNES

Manaus - Amazonas
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA - PPG-MDB**

**FILOGEOGRAFIA COMPARATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO
GÊNERO HYLAEAMYS (RODENTIA: SIGMODONTIDAE).**

MÁRIO DA SILVA NUNES

ORIENTADORA: IZENI PIRES FARIAS, DRA.

CO-ORIENTADORA: MARIA NAZARETH FERREIRA DA SILVA, PHD.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

**Manaus - Amazonas
2011**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N972f Nunes, Mário da Silva
Filogeografia comparativa e diversidade genética de espécies do gênero *Hylaeamys* (Rodentia: Sigmodontidae). / Mário da Silva Nunes. 2011
41 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Izeni Pires Farias
Coorientadora: Maria Nazareth Ferreira da Silva
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Filogeografia. 2. Roedores. 3. *Hylaeamys*. 4. Diversidade genética. I. Farias, Izeni Pires II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

SUMÁRIO

1	Introdução -----	1
1.1	<i>Hylaeamys megacephalus</i> (Fischer, 1814) -----	4
1.2	<i>Hylaeamys perenensis</i> (J.A. Allen, 1901) -----	4
1.3	<i>Hylaeamys yunganus</i> (Thomas, 1902) -----	5
1.4	Filogeografia e marcadores moleculares -----	5
2	Justificativa -----	8
3	Objetivos -----	10
4	Material e métodos -----	10
4.1	Amostras -----	10
4.2	Extração de DNA -----	13
4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) -----	13
4.4	Purificação e Sequenciamento automático de DNA -----	15
4.5	Alinhamento e análise de sequências -----	16
4.6	Análises filogenéticas e intraespecíficas -----	16
5	Resultados e discussão -----	17
5.1	Gênero <i>Hylaeamys</i> -----	17
5.2	<i>Hylaeamys perenensis</i> -----	18
5.3	<i>Hylaeamys yunganus</i> -----	22
5.4	<i>Hylaeamys megacephalus</i> -----	24
6	Referências -----	29

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Hylaeamys megacephalus</i> -----	4
Figura 2	Distribuição dos pontos amostrais -----	11
Figura 3	Árvore de ML com as três espécies do gênero <i>Hylaeamys</i> analisadas neste trabalho. Os números acima dos ramos representam os valores de suporte e os abaixo são as médias da distância genética intraespecífica (Kimura-2-parâmetros). -----	11
Figura 4	Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, para o citocromo b de <i>H. perenensis</i> -----	19
Figura 5	Topologia obtida pelo método de MV para <i>H. perenensis</i> , utilizando o modelo de substituição HKY85+Gama+I. Os valores acima dos ramos representam o suporte estatístico para os agrupamentos (somente valores acima de 50% são mostrados). Os valores em parênteses representam os pontos amostrais plotados no mapa da figura 2 -----	20
Figura 6	Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, para o citocromo b de <i>H. yunganus</i> .-----	22
Figura 7	Topologia obtida pelo método de MV para <i>H. yunganus</i> , utilizando o modelo de substituição HKY85+I. Os valores acima dos ramos representam o suporte estatístico e as porcentagens abaixo dos ramos representam a média da distância genética (Kimura-2- parâmetros) dentro dos grupos -----	23
Figura 8	Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, obtidos para 947 pb do citocromo b de <i>H. megacephalus</i> --	24
Figura 9	Topologia obtida pelo método de MV, utilizando o modelo de substituição HKY85+Gama+I. As barras coloridas representam os distintos clados em <i>H. megacephalus</i> : clado Norte (azul), Central (vermelho), Sudeste (verde) e Central 2 (amarelo), cuja distribuição se sobrepõe com a localidade 12 da região central (em vermelho). Os números em parênteses representam as localidades apresentadas no mapa (figura 2) -----	26
Figura 10	Distribuição das linhagens e valores de distância genética interlinhagens (modelo Kimura-2-parâmetros) observadas na distribuição de <i>H. megacephalus</i> -----	27

RESUMO

Estudos filogeográficos têm ajudado a esclarecer o contexto espacial e temporal da diversificação de organismos amazônicos. Em vista do atual estado de degradação ambiental e dos futuros impactos previstos com a implantação dos planos de desenvolvimento propostos para a Amazônia, faz-se necessário a compreensão da dinâmica evolutiva da biota da floresta da planície amazônica. Sendo assim, este trabalho teve como meta, fornecer informações que elevem o conhecimento taxonômico e biológico para as espécies do gênero *Hylaeamys* (*H.megacephalus*, *H.yunganus* e *H.perenensis*), que possuem distribuição predominantemente Amazônica, testando a existência de estrutura populacional para cada espécie e se o padrão filogeográfico possui concordância com sua distribuição geográfica. Foi utilizado um total de 254 indivíduos distribuídos por 43 localidades, sendo 151 indivíduos para *H. megacephalus*, provenientes de 35 localidades; 80 indivíduos de *H. perenensis* por 14 localidades e 23 indivíduos de *H. yunganus* de oito localidades. Os estudos moleculares foram baseados no sequenciamento de 947 pares de bases do gene mitocondrial citocromo b. As relações filogenéticas entre as populações foram avaliadas pela construção de árvores pelo método de máxima verossimilhança (MV) e a diferenciação genética através da análise de variância molecular (AMOVA) e das estimativas de F_{st} . Para *H.perenensis*, a análise de AMOVA, realizada para testar a estrutura populacional considerando o rio Juruá como barreira geográfica, revelou que a maior parte da variância (96,15%) foi dentro das populações e apenas 3,85% ($F_{st} = 0,03851$; $P=0,00366$) da variação pôde ser explicada por diferenças entre populações. Mesmo considerando um $N_m=12,48$, os valores de F_{st} foram significantes, indicando uma estruturação genética moderada. Para *H.yunganus*, considerando a baixa amostragem obtida, não foi possível abordar a questão dos rios como barreira através de uma análise genético-populacional. Considerando-se apenas a distribuição dos haplótipos, os resultados são semelhantes aos reportados por Patton e colaboradores (2000), onde a o rio Juruá não constitui barreira ao fluxo gênico. Para *H. megacephalus*, a topologia da árvore de MV evidenciou a presença de quatro clados distintos estruturados geograficamente, com elevado suporte e distância genética média entre eles de 4,8%, com variação de 0,2% a 9,6%. Nos trabalhos de Patton *et al.* (2000) e Costa (2003), os valores médios das distâncias genéticas (5,3% e 8,7%, respectivamente) foram similares aos encontrados no presente estudo (7% e 8%), para populações ao norte e ao sul do rio Amazonas. Neste cenário, a diversidade genética apresentada por *H. megacephalus* está de acordo com o modelo de especiação alopátrica, sendo o rio Amazonas uma barreira geográfica para o fluxo gênico. Os níveis de divergência genética, considerando-se os valores reportados para roedores, não permitem descartar totalmente a possível existência de um complexo de espécies no que hoje é reconhecido como *H. megacephalus*. Entretanto, para o estabelecimento do status taxonômico das quatro linhagens reconhecidas, seria necessário a realização de estudos adicionais sobre outros parâmetros desses organismos, como características morfológicas, ecológicas, e de sua história natural.

ABSTRACT

Phylogeographic studies have helped clarify the spatial and temporal context of the diversification of Amazonian organisms. Given the current state of environmental degradation and the future impacts expected from the implementation of developmental plans proposed for the Amazon region, it is necessary to understand the evolutionary dynamics of the biota of the Amazon lowland forest. Therefore, the goal of this study was to provide information that increases the taxonomic and biological knowledge for the species of the genus *Hylaeamys* (*H. megacephalus*, *H. yunganus* and *H. perenensis*), which have predominantly Amazonian distribution, testing the existence of population structure for each species and if this structure is concordant with their geographical distribution. We used a total of 254 individuals sampled over 43 locations; 151 individuals of *H. megacephalus* from 35 localities, 80 individuals of *H. perenensis* from 14 localities and 23 individuals of *H. yunganus* from 8 localities. Molecular studies were based on the sequencing of 947 base pairs of the mitochondrial cytochrome b gene. The phylogenetic relationships were assessed by the construction of trees by the method of maximum likelihood (ML) and genetic differentiation through analysis of molecular variance (AMOVA) and F_{st} estimates. For *H. perenensis*, AMOVA analysis performed to test the population structure considering the Juruá River as geographical barrier, revealed that most of the variance (96.15%) was within localities and only 3.85% ($F_{st} = 0.03851$, $P = 0.00366$) of the variation could be explained by differences between localities. Even considering an $N_m = 12.48$, F_{st} values were significant, indicating a moderate genetic structure. For *H. yunganus*, considering the low number of samples obtained, it was not possible to address the issue of the rivers as a barrier through a population-genetic analysis. Considering only the distribution of haplotypes, the results are similar to those reported by Patton and colleagues (2000), where the Juruá River is not a barrier to gene flow. For *H. megacephalus*, the ML tree topology revealed the presence of four structured, geographically distinct clades with high support and average genetic distance between them of 4.8%, ranging from 0.2% to 9.6%. In the work of Patton et al. (2000) and Costa (2003), the average values of genetic distances (5.3% and 8.7%, respectively) were similar to those found in this study (7% and 8%) for populations north and south Amazon River. In this scenario, the genetic diversity by *H. megacephalus* is consistent with the model of allopatric speciation, and the Amazon River acting as a geographical barrier to gene flow. The levels of genetic divergence, considering the values reported for rodents in the literature, do not allow completely to dismiss the possible existence of a complex of species in what is now recognized as *H. megacephalus*. However, to establish the taxonomic status of the four lineages recognized, it would be necessary to conduct additional analyses of morphological, ecological, and natural history data.

1 Introdução

A ordem Rodentia é a mais numerosa dentre os mamíferos, compreendendo aproximadamente 45% das espécies, e comportando diversas famílias características que configuram um importante componente da fauna da América do Sul (Michaux *et al.*, 2001), exercendo funções ecológicas importantes na manutenção de processos, como dispersão de sementes, polinização e base da alimentação de predadores de pequeno e médio porte (Samuels, 2009), como é o caso de Cuniculidae (paca), Dasyproctidae (cutia), Caviidae (capivara), Echimyidae (ratos-de-espinho) e Cricetidae. Esta última compreende a subfamília Sigmodontinae, o grupo mais diversificado e complexo dos mamíferos do Novo Mundo (*sensu* Reig, 1980), que representa 74 gêneros e 380 espécies de ratos e camundongos do novo mundo, especialmente da América do Sul (Musser e Carleton, 2005).

A filogenia deste grupo tem sido um dos problemas mais persistentes da mastozoologia (Michaux *et al.*, 2001), sendo que sua radiação presumivelmente rápida, deixa pouca oportunidade para a evolução de sinapomorfias, uma provável causa para esta situação (Steppan *et al.*, 2004). O primeiro autor a estabelecer a noção de tribos dentro da subfamília Sigmodontinae foi Vorontsov (1959), e somente em Voss e Carleton (1993) foram caracterizadas as sinapomorfias que definem o grupo, sendo essas: ausência de vesícula biliar, presença de um par peitoral de mamas, ausência de cobertura timpânica, ausência de barra do alisfenóide e um palato longo.

Recentemente, o advento da biologia molecular contribuiu extraordinariamente para a avaliação das relações filogenéticas entre os organismos, o que era realizado até então somente por meio de caracteres

morfológicos (Reig, 1987; Carleton, 1973). Diversos estudos foram realizados propondo novos padrões filogenéticos em diferentes níveis, através de dados obtidos com a utilização de marcadores moleculares, principalmente, o gene mitocondrial citocromo b e o primeiro *exon* do gene nuclear IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein*) (Steppan, 1995; D'Elia, 2003; Smith e Patton, 1999; Weksler, 2003, 2006) aumentando o nível de conhecimento taxonômico dentro do grupo e delimitando suas relações de parentesco.

Segundo a classificação atual (Musser e Carleton, 2005) os sigmodontíneos são divididos em sete tribos (Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini) sendo que Oryzomyini comporta cerca de 35% do total de espécies formalmente descritas, compreendendo 27 gêneros e cerca de 120 espécies. De acordo com Engel *et al.* (1998), devido a características morfológicas primitivas, Oryzomyini seria a tribo mais próxima à linhagem ancestral dos Sigmodontinae, que chegaram à região norte dos Andes, vindos da América Central. O posterior aumento da heterogeneidade dos ambientes andinos terciários, devido ao soerguimento da cordilheira, deve ter promovido a diferenciação da linhagem oryzomyina ancestral em adaptações aos distintos habitats das selvas montanhosas (Riddle, 1996).

Patton e da Silva (1995), em um estudo sobre o gênero *Scolomys*, utilizando o gene mitocondrial citocromo b, analisaram as relações filogenéticas entre uma nova espécie descrita para este gênero (*S. juruense*) e 16 outras espécies de Oryzomyini. A árvore obtida mostrou que as 17 espécies de Oryzomyini se comportaram de forma monofilética, mesmo padrão encontrado por Steppan (1995) analisando 98 caracteres morfológicos em mais de 50 espécies, do Velho e do Novo Mundo (três subfamílias: Tylomyinae, Neotominae e Sigmodontinae) e por Weksler (2006) analisando 99 caracteres morfológicos e 1266 pb do gene nuclear IRBP de 49 espécies da tribo Oryzomyini. Este padrão, no entanto não foi encontrado em

trabalhos (Myers *et al.*, 1995; Smith e Patton, 1999; Bonvicino e Moreira, 2001), onde através de análises filogenéticas com o gene citocromo b em diferentes táxons de Oryzomyini, não observaram a monofilia da tribo. A retenção das características morfológicas mais primitivas da tribo Oryzomyini é apontada como sendo a mais provável causa para a dificuldade em se estabelecer as relações da tribo com os demais Sigmodontinae, assim como as relações entre seus gêneros (Riddle, 1996).

O gênero *Hylaeamys* faz parte da reclassificação das espécies do antigo gênero *Oryzomys* proposto por Weksler *et al.* (2006), que compreendia 43 espécies separadas em seis grupos distintos (Musser e Carleton, 2005), considerado polifilético por diversos autores (Weksler 2003; D'Elia *et al.* 2006). A revisão de Weksler *et al.* (2006), teve como base estudos moleculares, morfológicos e em conjunto, que teve como critério de reclassificação a monofilia dos agrupamentos das espécies. Nesse estudo, de acordo com os clados emergentes, o gênero *Oryzomys* foi reclassificado em: *Aegialomys*, *Cerradomys*, *Eremoryzomys*, *Euryoryzomys*, *Mindomys*, *Nephelomys*, *Oreoryzomys*, *Sooretamys*, *Transandinomys* e *Hylaeamys*, este último objeto do presente estudo.

As espécies de *Hylaeamys* são encontradas desde o norte da América do Sul (Guianas) até o sul do Brasil e norte da Argentina; apresenta tamanho médio, cauda de comprimento maior ou similar ao do corpo, coloração do dorso variando de castanho-escura a castanho-amarelada com os pêlos mais claros nas laterais e limite geralmente bem definido com o ventre, que é esbranquiçado ou amarelado, cauda pouco pilosa, patas longas e estreitas, geralmente com a superfície superior recoberta de pêlos claros (Bonvicino *et al.*, 2008). Este gênero inclui sete espécies reconhecidas: *Hylaeamys acritus*, *H. laticeps*, *H. megacephalus*, *H. perenensis*, *H. seuanezi*, *H. tatei* e *H. yunganus* (Weksler *et al.* 2006; Musser e Carleton, 2005; Emmons e Patton, 2005). Sendo que três destas espécies (*H. megacephalus*, *H.*

perenensis, e *H. yunganus*) possuem distribuição geográfica que abrange predominantemente a região amazônica e serão estudadas quanto ao seu padrão filogeográfico no presente trabalho.

1. 1 *Hylaeamys megacephalus* (Fischer, 1814)

Além de ser considerada a espécie-tipo do gênero, descrita como *Mus megacephalus* por Fischer (1814), possui uma distribuição mais ampla no Brasil, presente em dois diferentes biomas (Amazônico e Cerrado) ocorrendo a leste do estado do Amazonas, Roraima, Pará, oeste do Amapá, Mato Grosso, sudoeste do Maranhão, Tocantins, Goiás e Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, oeste de Minas Gerais e norte de São Paulo (Costa, 2003).



Figura 1. *Hylaeamys megacephalus*

1.2 *Hylaeamys perenensis* (J.A. Allen, 1901).

Apresenta hábito noturno, terrestre e comportamento solitário, alimentando-se de frutas, sementes e insetos (Bonvicino *et al.*, 2008). Ocorre em praticamente todos os habitats da bacia amazônica, inclusive em áreas degradadas (Patton *et al.*, 2000), sendo que sua distribuição abrange regiões do Peru, Bolívia e Brasil, onde é

encontrado no estado do Acre e ao longo do rio Juruá no sudoeste amazônico (Patton *et al.*, 2000).

1.3 *Hylaeamys yunganus* (Thomas, 1902)

Apresenta tamanho corporal moderado, com aproximadamente 20 centímetros e cauda de comprimento similar ou menor do que o do corpo (Musser *et al.*, 1998), possui uma ampla distribuição pelas florestas perenes da Amazônia, ocorrendo desde as Guianas, sul da Venezuela, região central da Colômbia, leste do Equador e Peru, norte da Bolívia, e no Brasil, onde sua distribuição compreende os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Rondônia e Mato Grosso (Bonvicino *et al.* 2008).

1.4. Filogeografia e marcadores moleculares

A filogeografia compreende o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas dentro de uma espécie, ou em espécies filogeneticamente próximas (Avice, 1994; 2000). Esta disciplina utiliza informações provenientes de campos diversos como a biogeografia, genética de populações, filogenia e paleontologia no estudo dos polimorfismos de genes em populações naturais, fornecendo dados sobre os eventos evolutivos históricos que modelaram a composição da biodiversidade atual, assim como a evolução de diferenças moleculares, morfológicas, comportamentais e fisiológicas dos organismos (Mindell *et al.*, 1997). Muitos desses trabalhos utilizam metodologias baseadas nas informações contidas no DNA, tendo em vista que os avanços tecnológicos em biologia molecular e bioquímica levaram ao desenvolvimento de uma grande variedade de marcadores moleculares, possibilitando sua utilização como ferramentas úteis na conservação de espécies

biológicas (Avice, 1994). A utilização desses marcadores geram dados que podem ser usados na identificação de espécies crípticas e formulação de hipóteses filogenéticas, pois permitem acessar diretamente as diferenças nas sequências de DNA, causadas por eventos mutacionais, possibilitando assim, mensurar a variedade de alelos e genótipos dentro de uma população (Frankham *et al.*, 2002).

Um marcador molecular bastante utilizado na literatura tem sido o sequenciamento de genes do DNA mitocondrial (DNAm_t), pois devido às suas características únicas (ausência de recombinação, herança predominantemente materna e alta taxa de evolução) apresenta-se altamente informativo em estudos evolutivos, por sua capacidade de identificar espécies e populações e estimar relações filogenéticas (Avice, 1994), além de poder ser utilizado para traçar eventos históricos, como gargalo-de-garrafa e analisar a existência de zonas híbridas (Arbogast e Kenagy, 2001). O maior sucesso de obtenção de sequências mitocondriais, quando comparado aos genes nucleares, também é um fator considerável, especialmente em amostras diminutas ou degradadas, uma vez que as células possuem em geral, duas cópias de sequências nucleares e de 100 a 1000 cópias do genoma mitocondria (Avice *et al.* 1987). A metodologia do DNAm_t em estudos filogeográficos baseia-se em dois aspectos da sua variabilidade intraespecífica: estrutura hierárquica, ou seja, magnitude e padrão de sua divergência filogenética e partição geográfica, ou grau de subdivisão geográfica dos agrupamentos filogenéticos (Ditchfield e Burns, 1998). Geralmente, a localização de linhagens mitocondriais aparentadas na maioria das espécies reflete um fluxo gênico contemporâneo limitado, e a presença de quebras genéticas profundas pode ser evidência de uma separação e isolamento histórico entre as mesmas (Avice, 2000).

Na maioria dos genomas mitocondriais estudados, o conteúdo gênico é altamente conservado e consiste em dois genes que codificam as subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e 13 genes codificadores de enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa: as subunidades da citocromo oxidase (COI, COII e COIII), citocromo b, as subunidades 6 e 8 da ATPase e as sete subunidades da NADH desidrogenase, além de uma região rica em A+T (D-loop em vertebrados) que contém o controle da replicação e transcrição do genoma do DNAm (Wolstenholme, 1992).

Dentre os genes do DNAm, o citocromo b (cit b) está envolvido na cadeia transportadora de elétrons, sendo o único citocromo codificado por esse genoma (Lowe *et al.*, 2006) e mesmo evoluindo lentamente em termos de substituição não-sinônimas, a taxa de evolução em posições silenciosas é relativamente rápida (Irwin *et al.*, 1991). Com isso, este gene tem sido comumente utilizado em análises filogenéticas e filogeográficas, já que considera-se que ele seja suficientemente variável para resolver questões populacionais e conservado o bastante para esclarecer relações filogenéticas mais profundas (Avice, 1994).

A abordagem filogenética e filogeográfica a partir do citocromo b, têm sido realizada em várias espécies da ordem Rodentia e mesmo em algumas espécies da tribo Oryzomyini. Em trabalho com cinco gêneros da família Echimyidae da Bacia Amazônica (da Silva e Patton, 1993) e com cinco gêneros de marsupiais e dez gêneros de roedores (da Silva e Patton, 1998) encontraram padrões equivalentes entre a distribuição geográfica e o nível de diferenciação de cada uma das espécies, sugerindo uma história evolutiva comum para a diversificação do grupo. Matocq *et al.* (2000) analisaram a estrutura genética das populações de duas espécies do gênero *Proechimys* (*P. simonsi* e *P. steerei*) e Lara e Patton (2000) estudaram a diversificação evolutiva do gênero *Trinomys* na Mata Atlântica.

Esses estudos mostram complexas relações entre áreas dentro da Amazônia e evidências de que, embora algumas linhagens desses animais sejam recentes, a maioria delas possui uma história de diversificação antiga, sugerindo uma origem anterior ao Pleistoceno.

Com relação à tribo Oryzomyini, Chiappero *et al.* (1997), através de isozimas, analisaram o fluxo gênico de sete populações na Argentina de *Oligoryzomys flavescens*, observando um alto fluxo entre as populações, ocasionando uma baixa diferenciação genética entre elas. Além deste, outros trabalhos com espécies do gênero *Oligoryzomys* também apresentaram baixas diferenciações genéticas entre populações, tais como de Perini *et al.* (2004) analisando o polimorfismo em *O. flavescens* e *O. nigripes*, (Patton *et al.*, 1996) em estudos filogeográficos com *O. microtis* e (Palma *et al.*, 2005) utilizando *O. longicaudatus*.

2- Justificativa

Um dos grandes problemas quanto a conservação de pequenos mamíferos é a escassez de conhecimento científico básico, principalmente de taxonomia, sistemática, distribuição e história natural (Costa *et al.*, 2005), aliado a isso a perda e a fragmentação de habitat, resultantes de atividades humanas relacionadas ao desenvolvimento econômico através do crescimento de áreas cultivadas e urbanas, aumento da densidade populacional e aumento da malha rodoviária tornam o cenário ainda mais preocupante. Quando ocorre a fragmentação ambiental, populações pequenas e subdivididas ficam mais suscetíveis aos efeitos demográficos e genéticos, que parecem ser maiores em pequenos mamíferos devido às suas elevadas taxas naturais de flutuação populacional derivados de

suas limitadas habilidades de movimentação e sobrevivência fora das manchas de habitat, tendendo a criar populações isoladas.

Nos últimos anos, a pesquisa sobre filogeografia molecular nas regiões neotropicais tem dado uma contribuição substancial ao estudo da diversidade evolutiva (Brito, 2004). Vários trabalhos se propuseram em investigar os padrões filogeográficos em vertebrados, gerando hipóteses biogeográficas.

Apesar da importância da diversidade amazônica, poucos estudos filogeográficos estão disponíveis para os vários grupos taxonômicos existentes, sendo que os limites entre espécies de pequenos mamíferos são mal compreendidos e aparecem como um reflexo da escassez de amostragem disponível para análise (da Silva e Patton, 1998). O número de espécies de muitos gêneros que ocorrem na Amazônia é subestimado, em razão da dificuldade de distinção entre diferenciação geográfica e variações individuais, especialmente entre os marsupiais e roedores, visto que a identificação de muitas dessas espécies são dificultadas por sua complexidade, sendo necessárias análises complementares de morfologia, crânio ou de dentição (Costa *et al.*, 2005).

Em vista do atual estado de degradação ambiental e dos futuros impactos previstos com a implantação dos planos de desenvolvimento propostos para a Amazônia, faz-se necessário mais do que nunca a compreensão da dinâmica evolutiva da biota da floresta da planície amazônica (da Silva e Patton, 1998).

Sendo assim, este trabalho teve como meta, fornecer informações que elevem o conhecimento taxonômico e biológico para as espécies em questão, testando a existência de estrutura populacional para cada espécie e se o padrão filogeográfico possui concordância com sua distribuição geográfica. Essas informações fornecem um meio para avaliar áreas críticas para a conservação e na identificação de áreas de endemismo, e de linhagens evolutivas únicas.

3- Objetivos

3.1 Objetivo geral

Determinação do padrão filogeográfico de três espécies do gênero *Hylaeamys* (*H. perenensis*, *H. yunganus* e *H. megacephalus*) usando como marcador molecular o gene mitocondrial citocromo b.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar as relações filogenéticas existentes e verificar a existência de mais de uma linhagem evolutiva dentro das espécies *H. perenensis*, *H. yunganus* e *H. megacephalus* coletados em várias localidades da bacia amazônica;
- Comparar os padrões filogeográficos observados;
- Determinar, através da variabilidade genética destas espécies, a presença ou ausência de estrutura geográfica associada a linhagens mitocondriais.

Material e Métodos

4.1. Amostras

Foi utilizado um total de 207 indivíduos distribuídos por 43 localidades (Tabela 1) sendo: 126 indivíduos para *H. megacephalus*, provenientes de 35 localidades; 66 indivíduos de *H. perenensis* por 14 localidades e 15 indivíduos de *H. yunganus* de oito localidades. As amostras foram obtidas através de consulta aos acervos da Coleção de mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e da Coleção zoológica do instituto de biociências da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). Esse material é proveniente de coletas realizadas utilizando armadilhas dos tipos *Sherman* e *Tomahawk* e posteriormente preparados segundo procedimentos específicos de utilizados em coleções mastozoológicas (*Animal Care and Use Committee*, 1995). A amostragem

foi complementada com a adição de 20 seqüências nucleotídicas do depositadas no banco de dados públicos do *National Center Information* (Genebank) e 27 seqüências provenientes dos bancos de seqüências das coleções de mamíferos do INPA e MVZ (Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, EUA).

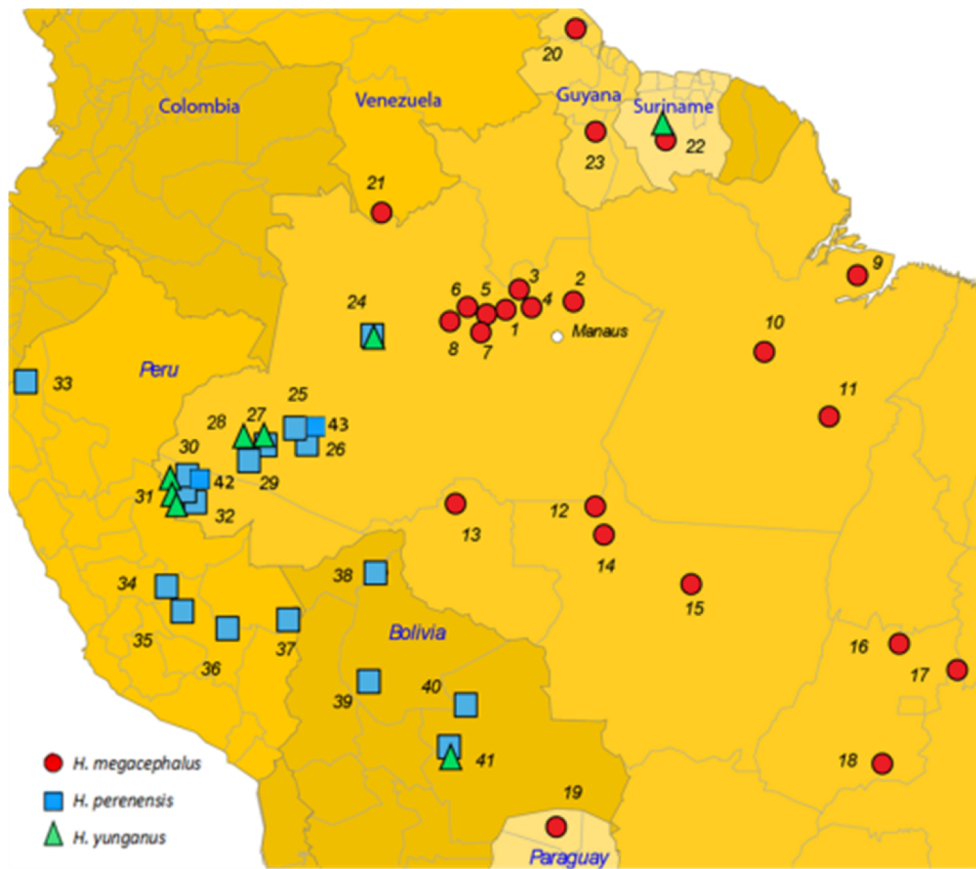


Figura 2. Distribuição dos pontos amostrais

Tabela 1 – Listagem dos espécimes utilizados e suas localidades.

Ponto	Localidade	Longitude/Latitude
1	Margem direita rio Jaú (acima da foz), AM	61W 28' 59", 1S 57'
2	ReBio do Uatumã, Balbina, AM	59W 24' 32", 1S 47' 44"
3	Lago Meduini, margem esquerda rio Negro, AM	61W 22' 59", 1S 46' 00"
4	Lago Meduini, margem esquerda rio Negro (igapó)	61W 22' 59", 1S 46' 59"
5	Macaco, margem direita do rio Jaú, AM	62W 06', 2S 04' 00"
6	Macaco, margem esquerda do rio Jaú (ponto 1), AM	62W 07' 59", 2S 04' 59"
7	Macaco, margem esquerda do rio Jaú (ponto 2), AM	62W 07' 00", 2S 04' 59"
8	Tambor, esquerda rio Jaú, AM	62W 25' 59", 2S 13' 00"
9	Ilha de Marajó, PA	49W 34' 00", 0S 58' 00"
10	Rio Xingu, Altamira, PA	52W 45', 3S 40' 00"
11	Floresta Nacional Tapirapé-Aquiri, Carajás, PA	50W 30', 5S 48'
12	Rio São João da Barra, Nova Bandeirantes, MT	58W 32' 51", 8S 55' 58"
13	Rio Jamari, RO	63W 28' 00", 8S 45'
14	Fazenda São Nicolau, Cotriguaçu, MT	58W 14' 54", 9S 51' 18"
15	Fazenda Continental, Cláudia, MT	55W 17' 35", 11S 35'
16	Serra da Mesa, GO	48W 13' 00", 13S 30'
17	Mambai, GO	46W 06', 14S 28' 59"
18	Ipameri, GO	48W 37' 00", 17S 43'
19	Paraguay	55W 42', 24S 30' 59"
20	Rupununi, Guyana	59W 09', 7N 34' 00"
21	Rio Mawarinuma, Amazonas, Venezuela	60W 57', 5N 01' 59"
22	Geyskes creek, Saramacca, Suriname	56W 10' 00", 3N 55' 59"
23	Surama, Guyana	58W 51', 4N 19' 59"
24	Vira-Volta, margem esquerda rio Juruá, AM	66W 13' 59", 3S 16' 59"
25	Boa Esperança, margem direita do rio Juruá, AM	68W 55' 00", 6S 31' 59"
26	Barro Vermelho, rio Juruá, AM	68W 46' 00", 6S 28' 00"
27	Penedo, margem direita do rio Juruá, AM	70W 13' 00", 6S 43' 59"
28	Seringal Condor esquerda do Rio Juruá, AM	70W 51', 6S 45'
29	Penedo, margem esquerda rio Juruá, AM	70W 45', 6S 49' 59"
30	Nova Vida direita rio Juruá, AC	72W 49' 00", 8S 22' 00"
31	Igarape Porongaba, esquerda do rio Juruá, AC	72W 46' 59", 8S 36'
32	Igarape Porongaba, margem direita do rio Juruá, AC	72W 46' 59", 8S 40' 00"
33	Rio Cenepa, Huampami, Peru	78W 10' 00", 4S 28' 00"
34	Rio Pangoreni, Depto.Cusco, Peru	73W 20' 27", 11S 46'
35	Rio Urubamba, Cusco (Kiteni), Peru	72W 49' 59", 12S 19'
36	Rio Madre de Dios (alto), Peru,	71W 12', 12S 54'
37	Rio Madre de Dios (Baixo), Peru,	69W 03', 12S 33'
38	Rio Beni, Hamburgo, Bolivia	66W 06', 11S 01' 00"
39	Estação Biológica de Beni, Bolivia	66W 21', 14S 51'
40	Ascension, Santa Cruz, Bolivia	63W 04' 59", 15S 42'
41	San Rafael de Amboro, Santa Cruz, Bolivia	63W 04' 59", 15S 42'
42	Sobral, margem esquerda rio do Juruá, AC	72W 49', 8S 22'
43	Jainú, margem direita do rio Juruá,	68W 46', 6S 28'

4.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi obtida através do método de CTAB (Doyle e Doyle, 1987), este procedimento tem como objetivo a separação dos ácidos nucleicos através da remoção de proteínas e outros componentes celulares e consiste na adição de 500 µL da solução de CTAB 2% (NaCl, EDTA 0,5M, Tris HCL 1M, PVP polivinil), 10 µL proteinase K e aproximadamente 100mg de tecido muscular, com posterior aquecimento da solução em banho-maria à 60°C até o material ser totalmente dissolvido. Após essa etapa adicionou-se 300 µl de clorofórmio centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o DNA precipitado com 300 µl isopropanol absoluto, centrifugando-se à 10.000 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Fez-se duas lavagens com 250 µl Etanol 70%, com centrifugações de 10 minutos à 10.000 rpm em cada lavagem. O pellet foi seco em temperatura ambiente e suspenso em 50 µl de água destilada e deionizada (ddH₂O) e guardado em freezer à -20°C.

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), consiste na utilização de uma polimerase resistente a altas temperaturas, retiradas da bactéria *Thermus aquaticus*. A Taq DNA polimerase é utilizada para catalizar a produção das fitas de DNA a partir de seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), sendo que um deles liga-se na extremidade 5'-3' da fita dupla de DNA e o outro funciona no sentido oposto. Após ciclos repetidos de desnaturação (provocado pelo aumento de temperatura) e síntese (em temperaturas mais baixas, permitindo que a polimerase se ligue a fita molde)

resultam em um aumento exponencial do número de fragmentos replicados, podendo ser prontamente obtidas ampliações de até um milhão de vezes (Mullis e Faloona,1987). A reação em cadeia da polimerase possui várias utilidades em biologia molecular, baseados em sua propriedade de amplificar segmentos específicos de DNA a partir de pequenas quantidades de amostra e por ser uma técnica de baixo custo, rápida e de fácil reprodução.

O gene mitocondrial citocromo b de cada amostra foi amplificado utilizando iniciadores específicos, desenvolvidos a partir de sequências depositadas no GeneBank. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 13 μ L, contendo: 5,2 μ L de ddH₂O; 1,5 μ L de MgCl₂ (25mM); 1,25 μ L de dNTP (2,5 mM); 1,25 μ L de 10X Tampão (100mM Tris-HCl, 500mM KCl); 1 μ L do *primer* OryzCytbF1 (5' CATYTCMTATGATGRAACTT 3') (0,2 μ M); 1 μ L do *primer* OryzCytbR1 (5' TGG TTG ROC TCC RAT TCA TG 3') (0,2 μ M); 0,8 μ L de Taq DNA Polimerase (5 U/ μ l) e 1 μ l de DNA genômico. O perfil de amplificação consistiu de 30 ciclos compostos dos seguintes passos: 1 minuto a 94°C; 1 minuto e 30 segundos a 57°C; e 1 minuto a 72°C, sendo estes precedidos por um passo inicial de 5 minutos a 94°C para a homogeneização da temperatura do bloco e seguidos por um passo final de 10 minutos, a 72°C para polimerização de eventuais moléculas das quais a polimerase tenha se dissociado antes do final da síntese total do fragmento. O tamanho e a concentração dos produtos da amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando 2 μ L do volume final da reação e 2 μ L de corante fluorescente GelRed (Uniscience) e observado sob luz ultravioleta, com a utilização do transiluminador Image Master (Pharmacia Biotech).

4.4 Purificação e Sequenciamento automático de DNA

A purificação dos fragmentos de DNA obtidos foi realizada com a adição de Polietilenoglicol (PEG; 1 g/mL), misturado, incubado a 37°C por 15 minutos, centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, adicionados 125 µL de etanol 80% gelado, centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos, em seguida sobrenadante foi descartado e ao final foram adicionados 10 µL de água milli-Q.

Uma vez que as moléculas de DNA foram purificadas, deu-se seguimento a etapa de seqüenciamento, para se obter a ordem correta das bases nitrogenadas (nucleotídeos) que compõem o seguimento de DNA. O método de seqüenciamento utilizado foi desenvolvido por Fred Sanger, e baseia-se na síntese de DNA unifilamentar, na presença de nucleotídeos didesoxi (ddNTPs), que não possuem o grupamento 3'-hidroxila, impedindo a ligação com outros nucleotídeos. Os ddNTPs, podem ser incorporados a uma cadeia nucleotídica em crescimento, mas terminam sua síntese, pois não tem a região 3'-hidroxila (Sanger *et al.*, 1977). Os produtos purificados de amplificação foram utilizados como moldes para as reações de sequenciamento utilizando 2 µL desses produtos, 3,2 µL de ddH₂O, 0,3 µL de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 2,5µl de tampão do Big Dye e 2 µL de *primer* (10 µM). As reações foram colocadas no termociclador nas seguintes condições: 96 °C por 1 minuto, 30 ciclos de: 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Nas espécies representantes do gênero *Hylaeamys*, o citocromo b apresenta um total de 1143 pares de bases de comprimento (Smith and Patton, 1999), e para se conseguir uma maior sequência nucleotídica final, todas as amostras foram submetidas a duas reações de sequenciamento, sendo uma com o *primer*

OryzCytbR2 (5' GGGTGGGAATGGRATTTTRTC 3') e outra utilizando o primer OryzCytbF2 (5' CGATTYTTYGCMTTYCACTT 3)'.

Após a precipitação por Etanol 100%/EDTA as amostras foram aplicadas no sequenciador automático de DNA ABI 3130xl *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*), de acordo com as especificações do fabricante.

4.5 Alinhamento e Análise de seqüências

As seqüências obtidas foram editadas e alinhadas no programa BioEdit 7.0 (Hall, 1999) com o auxílio do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) sendo a base para a construção da matriz de dados contendo todas as seqüências nucleotídicas. Estes programas podem importar arquivos diretamente no formato FASTA, que é o formato digital disponível em bancos de dados internacionais como o *GenBank*, ou podem carregar diretamente seqüências geradas pelo sequenciador automático, tanto no formato gráfico como no formato de texto.

Para verificar a possível amplificação de pseudogenes através da presença de códons de parada na matriz de leitura, os nucleotídeos foram traduzidos em seqüências de aminoácidos com auxílio do programa MEGA 5.0.5 (Tamura *et al.*, 2011).

4.6 Análises filogenéticas e intraespecíficas

A análise filogenética foi baseada no método de reconstrução de máxima verossimilhança (ML – Felsenstein, 1981) realizada através do programa Treefinder (Jobb, 2008). Como teste de consistência da árvore, foi utilizado o método de bootstrap com 1000 pseudoreplicações de amostragem. A escolha do modelo evolutivo que melhor representou a matriz de dados foi obtido através do programa JModeltest (Posada, 2008). O Gráfico de saturação das seqüências nucleotídicas

quanto às transições e transversões foi obtida pelo programa DAMBE (Xia e Xi, 2001).

A composição média de nucleotídeos, proporção de transições pelo número total de substituições de bases e distâncias genéticas, foram obtidas nos programas MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) e DnaSP v.5 (Librado e Rozas, 2009). Estas estimativas foram utilizadas para investigar o histórico demográfico, onde altos valores de diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica podem sugerir recente crescimento populacional, enquanto que altos valores de diversidade haplotípica e altos valores de diversidade nucleotídica são indicativos de populações estáveis.

Para testar a presença de estrutura populacional foi utilizada a AMOVA (Análise de Variância Molecular) (Excoffier *et al.*, 1992), e a comparação do FST (Weir e Cockerham, 1984), implementados no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), assim como os índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva de mutações através das análises dos testes de Tajima (Tajima, 1989) e F estatístico de Fu (Fu, 1997).

5. Resultados e Discussão

5.1 Gênero *Hylaeamys*

A monofilia das três espécies em estudo do gênero *Hylaeamys*, *H. perenensis*, *H. megacephalus* e *H. yunganus* foi avaliada por meio de análises de *maximum likelihood* (ML) em 178 haplótipos com 947 pb do gene mitocondrial do citocromo b. Para a formação do grupo externo, foram utilizados indivíduos de *Euryoryzomys macconnelli*. A topologia obtida pelo método de ML confirmou os resultados obtidos por Weksler *et al.*, 2006, para a monofilia do gênero, com alto valor de suporte dos ramos (figura 3).



Figura 3. Árvore de ML com as três espécies do gênero *Hylaeamys* analisadas neste trabalho. Os números acima dos ramos representam os valores de suporte e os abaixo são as médias da distância genética intraespecífica (Kimura-2-parâmetros).

5.2 *Hylaeamys perenensis*

Para *H. perenensis*, foram analisadas 80 sequências de 947 pb, sendo 66 indivíduos sequenciados pela primeira vez no presente estudo e 14 provenientes dos bancos de sequências das coleções de mamíferos do INPA e MVZ (Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, EUA). Essas últimas foram originalmente geradas para os estudos de Patton e colaboradores (Patton *et al.* 1996, 2000; Costa 2003

entre outros). A composição nucleotídica apresentou 27,48% de citosina, 30,97% de timina, 27,98% de adenina e 13,57% de guanina. No total das bases analisadas foram observados 837 sítios conservados, 110 variáveis e 56 informativos para parcimônia. O gráfico de saturação das seqüências pode ser visualizado na figura 4. Este padrão foi encontrado também nas demais espécies do grupo (figuras 6 e 8).

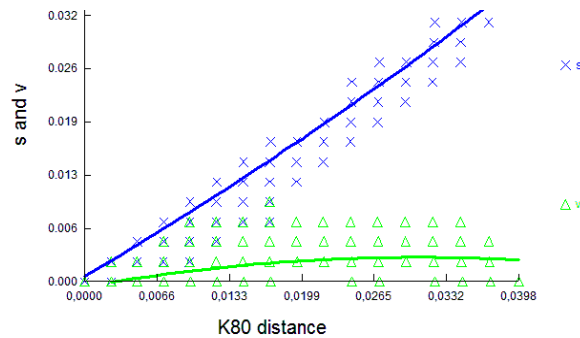


Figura 4. Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, para o citocromo b de *H. perenensis*.

A topologia obtida para *H. perenensis* evidenciou a presença de três clados distintos, porém, somente dois com um valor considerável de suporte (figura 5), sendo que o clado A (com 69,07% de suporte) inclui indivíduos das localidades ao longo do rio Juruá e do Peru e o clado B (com 82,47% de suporte) compreende as localidades da Bolívia. As distâncias genéticas médias intraclado encontradas foram ,8% no clado da Bolívia, com uma distância de 2,7% entre eles.

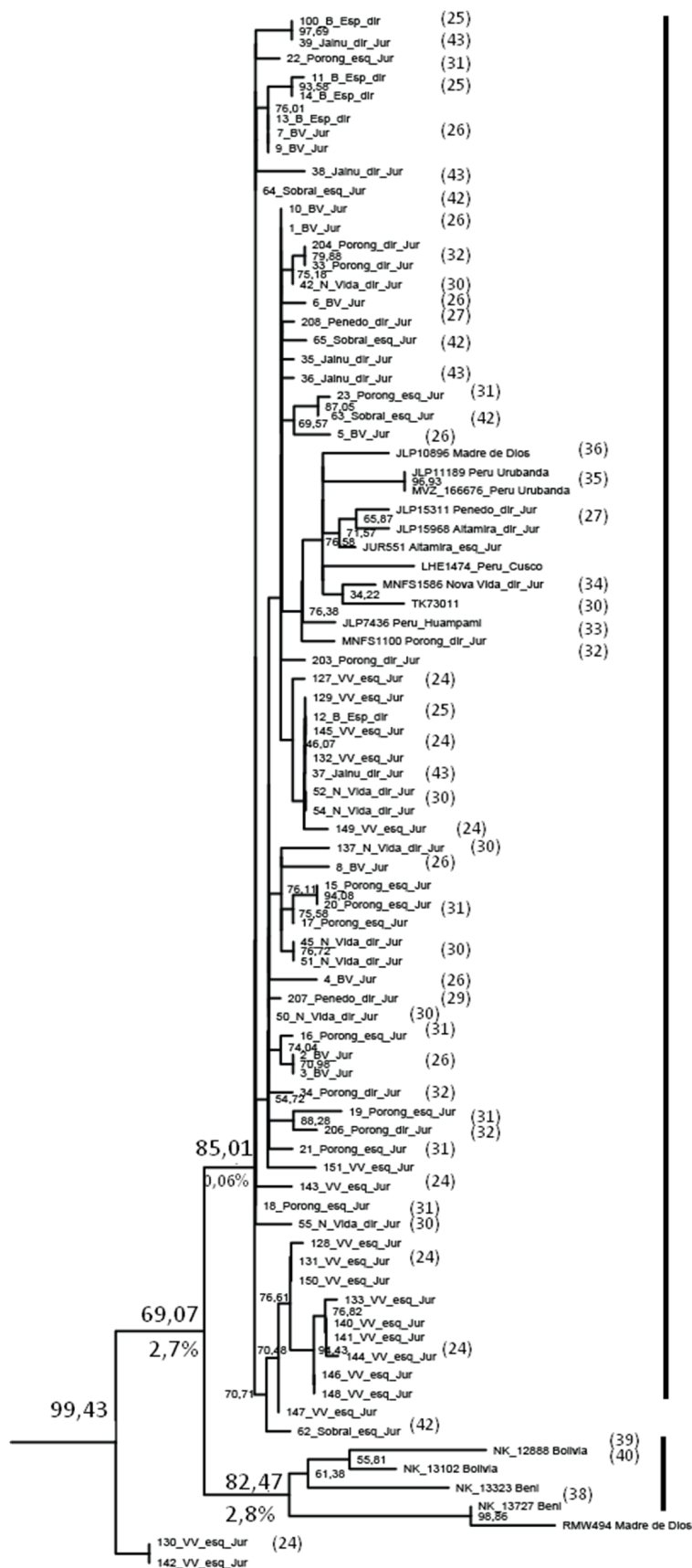


Figura 5. Topologia obtida pelo método de MV para *H. perenensis*, utilizando o modelo de substituição HKY85+Gama+I. Os valores acima dos ramos representam o suporte estatístico para os agrupamentos (somente valores acima de 50% são mostrados). Os valores em parênteses representam os pontos amostrais plotados no mapa da figura 2.

A análise de AMOVA, realizada para testar a estrutura populacional considerando o rio Juruá como barreira geográfica, foi composta por 29 indivíduos da margem direita e 43 da margem esquerda. Esta análise revelou que a maior parte da variância (96,15%) foi dentro das populações e apenas 3,85% ($F_{st} = 0,03851$; $P=0,00366$) da variação pôde ser explicada por diferenças entre populações. Mesmo considerando um $N_m=12,48$, os valores de F_{st} foram significantes, indicando uma estruturação genética moderada de acordo com a classificação de Wright (1951). Esses resultados foram similares ao encontrado por Patton *et al.*, (1996), onde os valores foram de 89,20% dentro das populações e apenas uma pequena fração desta variação pôde ser atribuída a diferenças entre localidades dentro de uma mesma região (6,60%). No referido trabalho, foi encontrado que para *Hylaeamys perenensis* (chamado de *Oryzomys capito* por Patton *et al.* 1996), não houve efeito regional ou entre populações no padrão de diversidade haplotípica, e constatou-se altos níveis de fluxo gênico para essa espécie.

Para a fauna de roedores e marsupiais, o rio Juruá propriamente dito, historicamente, não representa uma barreira geográfica substancial. Entretanto, Patton *et al.* (1996; 2000) constataram que a distribuição de clados de pequenos mamíferos correspondem a antigas bacias sedimentares do alto e baixo rio Juruá, sendo a área de contato entre esses grupos correspondentes à localização do arco estrutural de Iquitos, que delimita a borda oeste da Bacia do Solimões, separando-a das bacias do Acre e de Pastaza, no Peru (Rossetti *et al.*, 2005). Entretanto, para as populações de *Hylaeamys perenensis* no rio Juruá, tal padrão não foi observado. Estudos adicionais seriam necessários para avaliar se esta espécie chegou há relativamente pouco tempo e expandiu sua distribuição ao longo do rio Juruá ou se a

falta de estruturação geográfica seria em resposta a altas taxas de fluxo gênico entre suas populações conforme os dados atuais parecem sugerir.

5.3 *Hylaeamys yunganus*

Em *H. yunganus*, foram analisados 23 indivíduos, sendo 15 seqüenciados pela primeira vez no presente estudo, quatro cujas seqüências foram obtidas do Genebank e quatro provenientes do acervo de seqüências da coleção de mamíferos do INPA e do MVZ. De um total de 947 pb do gene mitocondrial citocromo b, 731 apresentaram-se conservados, 216 variáveis e 129 informativos para a parcimônia. A composição nucleotídica foi de 29,11% de citosina, 28,92% de timina, 28,97% de adenina e 13,00% de guanina. O número de transições foi de 158 e 75 transversões. O padrão de saturação obtido para *H. yunganus* pode ser visualizado na figura 9, onde não se observa saturação para as seqüências de citocromo b analisadas.

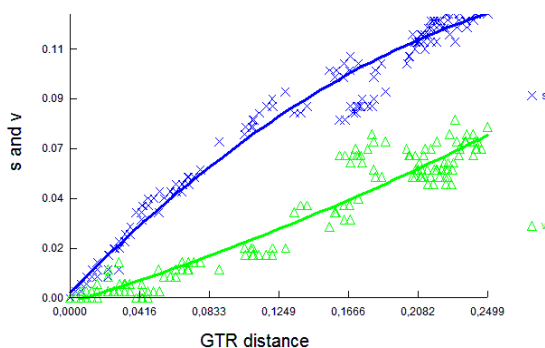


Figura 6. Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, para o citocromo b de *H. yunganus*.

Observando-se a topologia da árvore de ML (figura 7), têm-se três clados principais: um representado pelo indivíduo da Bolívia, que se posiciona basalmente como grupo-irmão de todos os demais indivíduos de *H. yunganus* aqui analisados; um segundo clado formado pelos indivíduos do Suriname, que se associa e outro

clado formado pelos indivíduos do rio Juruá, com baixo suporte (55,14%) nas análises de MV.

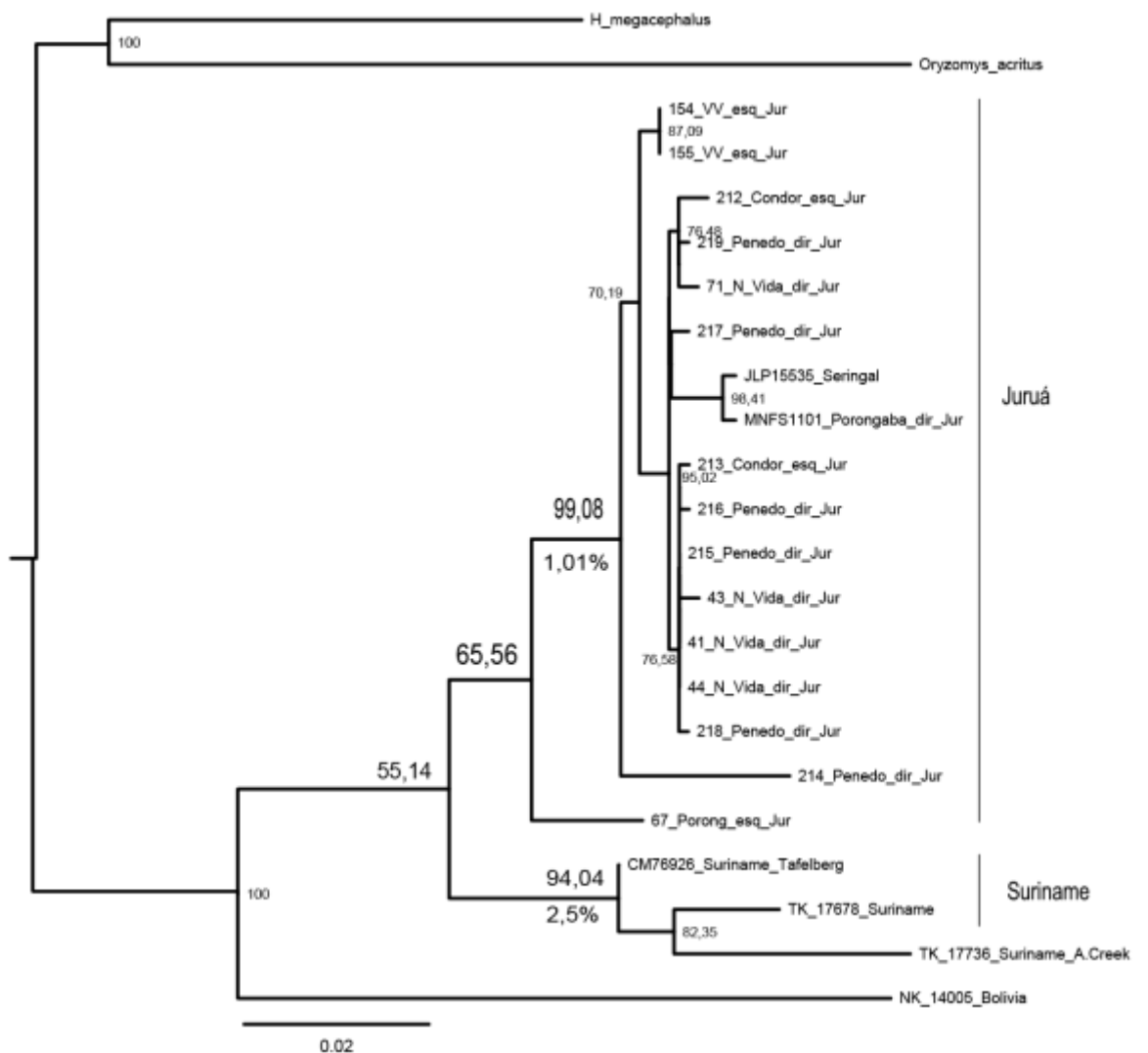


Figura 7. Topologia obtida pelo método de MV para *H. yunganus*, utilizando o modelo de substituição HKY85+I. Os valores acima dos ramos representam o suporte estatístico e as porcentagens abaixo dos ramos representam a média da distância genética (Kimura-2-parâmetros) dentro dos grupos.

Os valores de distância genética entre linhagens foram os mais altos encontrados em nossa amostragem, com 10% entre Bolívia e Suriname, 11% entre Bolívia e Juruá e 6% entre Juruá e Suriname. A distância intra-clado média para as localidades do rio Juruá foi de 1% (variando de 0,02 a 3%). Para as amostras do Juruá, considerando a baixa amostragem obtida, não foi possível abordar a questão

dos rios como barreira através de uma análise genético-populacional. Considerando-se apenas a distribuição dos haplótipos, os resultados são semelhantes aos reportados por Patton e colaboradores (2000), onde a distribuição dos haplótipos sugeriu que o rio Juruá não constitui barreira ao fluxo gênico.

5.4 *Hylaeamys megacephalus*

Para *H. megacephalus*, foram analisadas um total de 151 seqüências parciais do gene citocromo b com 947 pares de base (pb), sendo 126 obtidas pela primeira vez no presente trabalho, 16 no Genbank e nove no banco de seqüências da coleção de mamíferos do INPA. A composição de bases nucleotídicas foi definida com 27,46% de citosina, 30,63% de timina, 28,56% de adenina e 13,36% de guanina. Com a análise da matriz de dados, verificou-se 641 sítios conservados, 256 polimórficos e 183 informativos para parcimônia. Os sítios variáveis corresponderam a 195 mutações do tipo transição e 86 transversões.

O gráfico das transições e transversões contra a distância genética não evidenciou saturação no conjunto de dados utilizados, ou seja, os valores de transições e transversões mantiveram uma tendência de aumento linear com o aumento da divergência entre as seqüências (figura 8).

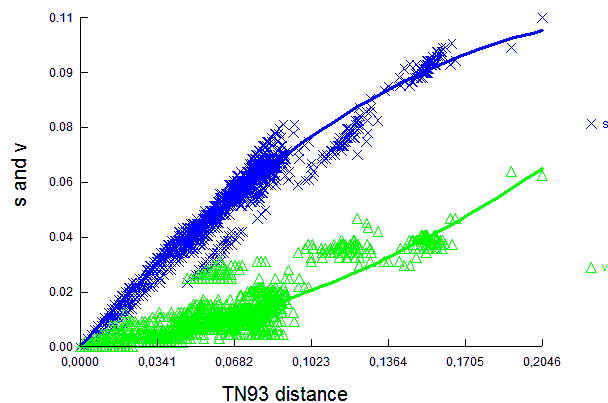


Figura 8. Gráfico de saturação – número absoluto de transições (X) e transversões (Δ) em função da divergência genética entre as seqüências, obtidos para 947 pb do citocromo b de *H. megacephalus*.

A árvore de ML foi construída utilizando o modelo de substituição nucleotídica HKY85+Gama+I (Hasegawa *et al.* 1985), (-lnL=1614,008) como indicado pelo teste de taxa de verossimilhança implementado no programa JModeltest (Figura 8). A monofilia de *H. megacephalus* é suportada por altos valores (86,06%) nas análises de máxima verossimilhança e a topologia obtida apresentou quatro clados distintos, representados pelas barras coloridas na árvore e referidos como linhagem Norte (em azul), Central (em vermelho) e Sudeste (verde). A quarta linhagem, denominada Central 2, se sobrepõe geograficamente à Central, e está representada na figura em amarelo.

Para a mensuração da distância genética entre as linhagens, aplicou-se o modelo de evolução Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980), onde foi observado 7% entre os grupos Norte e Central, 1,4% entre região Central e Sudeste, e 8% entre Norte e Sudeste. A distância média intraclado no clado Norte foi de 1,4%, (variando de 0,02 a 8,1%) e 2,1% (0,07 – 5,2%) no clado Sudeste.

Quanto à região central da distribuição de *H. megacephalus*, os indivíduos provenientes da localidade do rio São João da Barra (MT) (localidade 12; Figura 9), de acordo com as análises de reconstrução filogenética, foram associados a dois clados distintos: um com alguns indivíduos mais proximamente relacionados às demais localidades da distribuição central, com as quais formam o clado Central (em vermelho, Figura 8) com suporte de 74,29% e 1,7% de divergência genética média entre os indivíduos (0,08 – 7,1%), e outro com quatro indivíduos, todos provenientes da localidade do rio São João da Barra, que se associam formando o clado Central 2 com suporte de 84,29% (em amarelo, Figura 9) e distância genética média de 2,5%, (1,9 – 4%), indicando assim, a presença de vários haplótipos divergentes que se estruturam em duas linhagens geneticamente distintas nessa localidade.

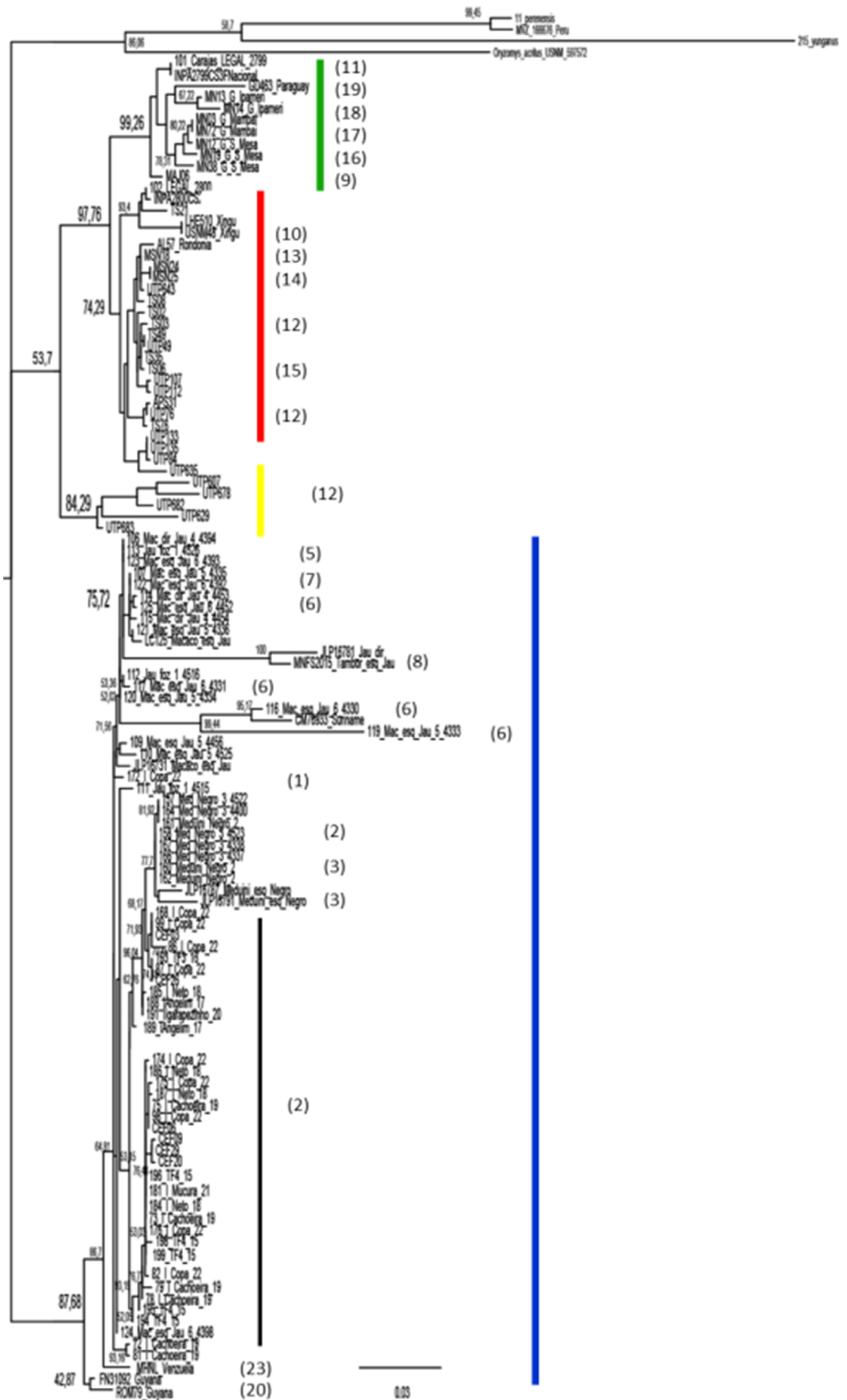


Figura 9 - Topologia obtida pelo método de MV, utilizando o modelo de substituição HKY85+Gama+I. As barras coloridas representam os distintos clados em *H. megalcephalus*: clado Norte (azul), Central (vermelho), Sudeste (verde) e Central 2 (amarelo), cuja distribuição se sobrepõe com a localidade 12 da região central (em vermelho). Os números em parênteses representam as localidades apresentadas no mapa (figura 2).

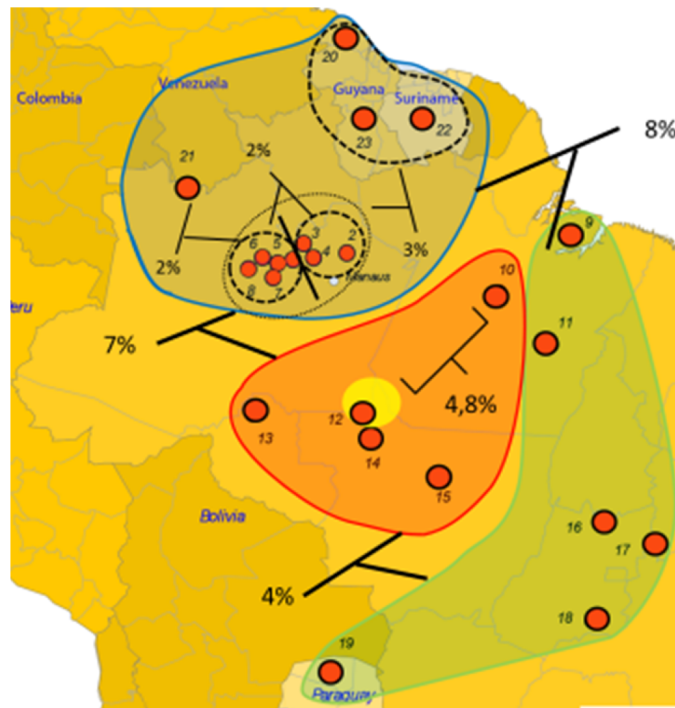


Figura 10. Distribuição das linhagens e valores de distância genética inter-linhagens (modelo Kimura-2-parâmetros) observadas na distribuição de *H. megacephalus*.

Com relação aos agrupamentos observados entre os indivíduos do clado Norte (azul), encontrou-se uma divergência de 3% separando Guyana e Suriname da Amazônia central e de 2% entre esta última e a região sul da Venezuela (Figura 10). Esses valores foram menores do que o encontrado por Patton *et al.* (2000), que relatou 5,3% de distância genética média entre esses indivíduos. Os indivíduos da Amazônia central se separaram em dois grupos (nas margens direita e esquerda do rio Negro) com uma divergência média de 2% (Figura 10).

Para as análises populacionais foram considerados apenas os indivíduos provenientes das margens do rio Negro (linhagem Norte), uma vez que a maior parte dos haplótipos encontrados neste trabalho são de localidades da Amazônia central. Com isso, a análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para testar a significância da variabilidade genética em *H. megacephalus*, testando o rio Negro como barreira ao fluxo gênico, utilizando 24 indivíduos da margem esquerda e 80

indivíduos da margem direita desse rio. Neste caso, a variação encontrada foi de 38,95% entre as populações e 61,05% dentro das populações, ($F_{st} = 0,3851$; $P = 0$), com um número de migrantes (N_m) de 0,78368. Considerando-se que tal resultado poderia ser um artefato de amostragem uma vez que o lado direito do rio Negro possui um maior número amostral, reduzimos o banco de dados para esta localidade de forma aleatória. Os resultados, considerando 24 indivíduos da margem esquerda e 36 indivíduos da margem direita do rio, permaneceram similares, ou seja, a variação encontrada foi de 31,22% entre as populações e 68,78% dentro das populações, ($F_{st} = 0,31225$; $P = 0$).

Bradley e Baker (2001) e Baker e Bradley (2006) indicam valores referenciais médios (e limites mínimos e máximos) de divergência intraespecífica para seqüências de citocromo b de roedores de 2,09% (0,00 - 6,29%) e para seqüências entre espécies irmãs de 9,55% (2,70 - 19,23%), e concluem conservadoramente que valores entre 2% e 11% mereceriam estudos adicionais visando-se determinar o status específico dos táxons em questão.

Em uma amostra de 151 indivíduos de *Hylaeamys megacephalus*, encontramos neste estudo 89 haplótipos, que por meio de análises de MV, apresentaram quatro clados distintos estruturados geograficamente, com elevado suporte e distância genética média entre eles de 4,8%, com variação de 0,2% a 9,6%. Nos trabalhos de Patton *et al.* (2000) e Costa (2003), os valores médios das distâncias genéticas (5,3% e 8,7%, respectivamente) foram similares aos encontrados no presente estudo (7% e 8%), para populações ao norte e ao sul do rio Amazonas. Neste cenário, a diversidade genética apresentada por *H. megacephalus* está de acordo com o modelo de especiação alopátrica, sendo o rio Amazonas uma barreira geográfica para o fluxo gênico.

Tais níveis de divergência genética, considerando-se os valores reportados por Bradley e Baker (2001) e Baker e Bradley (2006) para roedores, não permitem descartar totalmente a possível existência de um complexo de espécies no que hoje é reconhecido como *H. megacephalus*. Entretanto, conforme sugerido por esses autores, para o estabelecimento do status taxonômico das quatro linhagens reconhecidas, seria necessário a realização de estudos adicionais sobre outros parâmetros desses organismos, como características morfológicas, ecológicas, e de sua história natural.

Hylaeamys megacephalus é uma espécie com ampla distribuição, que se estende desde a Amazônia passando pelo Cerrado e tendo seu limite sul no leste do Paraguai. A separação desta espécie nos agrupamentos relatados também pode ser reflexo de sua grande área de distribuição e do mosaico de ecossistemas que esta espécie habita. Devido à alta variação genética encontrada entre os indivíduos, aliada a uma estruturação geográfica bem definida, a manutenção desta diversidade genética está fortemente associada à preservação das áreas de ocorrência dos clados, que poderiam ser considerados como unidades evolutivas significantes (Moritz, 1994; Frankham *et al.*, 2003; Avise, 2004).

6. Referências

Animal Care and Committee 1998. Guidelines for the capture, handling and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists.

Arbogast, B. S., Kenagy, G. J. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28:819-825.

Avise JC, Arnold J, Ball RM *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.

- Avise, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York, Chapman e Hall.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Baker RJ and Bradley RD (2006) Speciation in Mammals and the genetic species concept. *J Mammal* 87:643-662.
- Bonvicino, C.R., Moreira, M.A.M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogeny and Evolution* 18: 282–292.
- Bonvicino, J. A. Oliveira, P. S. D'Andrea. 2008. *Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos* /C. R. Bonvicino, J. A. Oliveira, P. S. D'Andrea. - Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS.
- Bradley RD and Baker RJ (2001) A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and Mammals. *J Mammal* 82:960-973.
154
- Brito, D. 2004. Lack of adequate taxonomic knowledge may hinder endemic mammal conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 13: 2135-2144.
- Carleton, M.D. 1973. A survey of gross stomach morphology in New World Cricetinae (Rodentia, Muroidea), with comments on functional interpretation. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan* 146: 1–43.
- Chiappero MB, Calderón GE and Gardenal CN (1997) *Oligoryzomys flavescens* (Rodentia, Muridae): gene flow among populations from central-eastern Argentina. *Genetica* 101:105-113.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71-86.
- Costa, L.P., Leite, Y.L., Mendes, S.L, Ditchfield, A.D. 2005. *Conservação de mamíferos no Brasil*. Megadiversidade.
- D'Elia G, Luna L, González EM; Patterson BD. 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): an appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Mol Phylogenet Evol* 38:558-564.
- D'Elia G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with Special Reference to the akodont group, and with Additional Comments on Historical Biogeography. *Cladistics* 19:307-323.

- Da Silva, M.; Patton J.L. 1993. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2:343-355.
- Da Silva, Maria Nazareth F., Patton, James L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*. 475-486
- Ditchfield, A.D.; Burns, K. 1998. DNA Sequences Reveal Phylogeographic Similarities of Neotropical Bats and Birds." *Journal of Comparative Biology* 3(2): 165- 170.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12.
- Emmons, L.H.; Patton, J.L. 2005. A New Species of *Oryzomys* (Rodentia: Muridae) from Eastern Bolivia. N 3478, 26 pp. *American Museum Novitates* .
- Engel, Stacia R., Hogan, Kelly M., Taylor, Jeremy F., Davis, Scott K. 1998. Molecular Systematics and Paleobiogeography of the South American Sigmodontine Rodents. *Mol. Biol. Evol.* 15(1):35–49.
- Excoffier, L., Lischer, H.E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17 368-376.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA .2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, pp xxii+617.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- Hasegawa, M., Kishino, H.; Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D.; Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128–144.
- Jobb, G., Haeseler, A., Strimmer, K. 2008. Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 1-9.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111–120

- Lara, M.C., Patton, J.L., 2000. Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society* 130, 661–686.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lowe. A, Harriss S, Ashton. P.2006. *Ecological genetics: design, analysis, and application*. Blackwell, Oxford.
- Matocq, M. D.; Patton, J. L.; da Silva, M. N. F. 2000. Population genetic structure of two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution*, 54(4): 1423-1432.
- Michaux, Johan, Reyes, Aurelio, and Catzeflis, François. 2001 *Evolutionary History of the Most Speciose Mammals: Molecular Phylogeny of Muroid Rodents*. *Mol. Biol. Evol.* 18(11):2017–2031.
- Mindell, D. P., Sorenson, M. D., Huddleston, C. J., Miranda, Jr., H. C., Knight, A., Sawchuk, S. J. & Yuri, T. 1997. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. In: Mindell, D. P. (ed)., *Avian Molecular Evolution and Systematics*, 214-247.
- Miranda, G.B, Andrades-Miranda, Oliveira , J. L.F. B., Langguth,A. Mattevi , M. S. 2007. Geographic Patterns of Genetic Variation and Conservation Consequences in Three South American Rodents. *Biochem Genet.* 45:839–856.
- Moritz, C., 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9, 373–375
- Mullis, K.; Faloona, F.1987. Specific Synthesis of DNA in vitro via Polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:335-350.
- Musser, G.G., Carleton, M.D., 2005. Super Family Muroidea, in: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 894-1531.
- Musser, G.G., M.D. Carleton, E.M. Brothers,A.L. Gardner. 1998. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): diagnoses and distributions of species formerly assigned to *Oryzomys* "capito". *Bulletin of the American Museum of Natural History* 236: 1–376.
- Myers, P., Lundrigan, B., Tucker, P.K., 1995. Molecular phylogenetics of Oryzomyine rodents: the genus *Oligoryzomys*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 372-382.
- Palma R.E., Rivera-Milla E., Salazar-Bravo J., Torres-Perez F., Pardiñas U.F.J., Marquet P.A., Spotorno A.E., Meynard A.P. and Yates T.L. (2005) Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Sigmodontinae) in temperate South America. *J Mammal* 86:191-200.
- Patterson, B.D. 1994. Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on Neotropical mammals. *Biodiversity Letters* 2: 79-86.

- Patterson, B.D. 2000. Patterns and trends in the discovery of new Neotropical mammals. *Diversity and Distributions* 6:145-151.
- Patton, J.L.; da Silva, M.N.F.; Malcolm, J.R. 1996. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. *Mol Ecol.*, 5: 229-238
- Patton, J.L., Da Silva, M. N., & Malcolm, J. R. (2000). Mammals of the rio jurua evolutionary and ecological diversification of amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, (244).
- Patton, J.L., M.N.F. da Silva. 1995. A review of the spiny mouse genus *Scolomys* (Rodentia: Muridae: Sigmodontinae) with the description of a new species from the western Amazon of Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 108: 319–337.
- Perini, M.V., Weimer, TA., Callegari-Jacques, S. M; Mattevi, MS., 2004. Biochemical polymorphisms and genetic relationships in rodents of the genera *Oryzomys* and *Oligoryzomys* (Sigmodontinae) from Brazil. *Biochemical Genetics*, vol. 42, no. 9-10, p. 317-329.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Reig, O. A., 1980. A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. *J. Zool.*, vol. 192, p. 257.
- Reig, O. A., 1986. Diversity Patterns and Differentiation of High Andean Rodents. (In: *High Altitude Tropical Biogeography*: 404-440. F. Vuilleumier and M. Monasteiro, eds.) Oxford Univ. Press, New York. 649p.
- Reig O. A (1987) An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Field Zool* 39:347-399.
- Riddle, B.R. 1996. The molecular phylogeographic bridge between deep and shallow history in continental biotas. *Trends Ecol Evol* 11:207–211
- Rossetti DF, Toledo PM, Góes AM. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* 63, 78–89.
- Samuels, J.X. ,2009. Cranial morphology and dietary habits of rodents. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2009, 156, 864–888.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 5463–5467.
- Smith, M. F., Patton, J. L. 1999. Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution*, 6 (2), 89-128.

- Steppan, S.J. 1995. Revision of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae), with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. *Fieldiana Zoology, New Series* 80: 1–112.
- Steppan, S.J., R.M. Adkins, and J. Anderson. 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Systematic Biology* 53: 533–553.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- 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* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 22, 4673–4680.
- Vorontsov, N.N., 1959. Sistema khomiakov (Cricetinae) mirovoi fauny i ikh filogeneticheskie sviazi. *Biuletén. Moskovskogo Obschestva Ispytateley Prirody Otdel Biologicheskii* 64, 134– 137.
- Voss, R.S., Carleton, M.D., 1993. A new genus for *Hesperomys molitor* Winge and *Holochilus magnus* Hershkovitz (Mammalia, Muridae) with analysis of its phylogenetic relationships. *Am. Mus. Novitates* 3085, 1–39.
- Weir, B.S. e Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- 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 of morphological and molecular data. *Bull Am Mus Nat Hist* 296:1–149
- Weksler M, Percequillo AR, Voss RS.2006. Ten new genera of oryzomyine rodents (Cricetidae; Sigmodontinae). *Am Mus Novit* 3537:1–29
- Wolstenholme, D.R.; Jeon, K.W. 1992. Mitochondrial genomes. San Diego: Academic Press.
- Wright, S. (1951) The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Xia, X., Xie, Z.2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92:371–373.