

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***THAPTOMYS* THOMAS (1916) (RODENTIA,
CRICETIDAE): UM GÊNERO MONOTÍPICO? UMA
ABORDAGEM CITOGENÉTICA E MOLECULAR**

Victor Hugo Colombi

Vitória, ES
Fevereiro, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***THAPTOMYS* THOMAS (1916) (RODENTIA, CRICETIDAE): UM
GÊNERO MONOTÍPICO? UMA ABORDAGEM CITOGENÉTICA
E MOLECULAR**

Victor Hugo Colombi

Orientadora: Valéria Fagundes

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia
Animal**

**Vitória, ES
Fevereiro, 2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Colombi, Victor Hugo, 1987-
C718t *Thaptomys* Thomas (1916) (Rodentia, Cricetidae) : um gênero
monotípico? Uma abordagem citogenética e molecular / Victor Hugo
Colombi. – 2013.
52 f. : il.

Orientadora: Valéria Fagundes.
Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Roedor – Mata Atlântica. 2. Citogenética. 3. Diversidade
biológica. 4. Análise cladística. 5. Citocromo b. 6. Biologia -
Classificação. I. Fagundes, Valéria. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

AGRADECIMENTOS

Essa conquista sem dúvida foi um divisor de águas na minha vida pessoal e profissional e muitas pessoas contribuíram para que esse momento fosse possível.

Em primeiro lugar quero agradecer à Prof.^a Dr.^a Valéria Fagundes por ter me dado a oportunidade, há sete anos, de conhecer o DNA na forma de cromossomos, pela amizade e confiança ao longo desse período, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos, por ser um exemplo de profissional e por não medir esforços em ajudar seus alunos.

À CAPES pela disponibilidade da bolsa.

Meus agradecimentos aos professores e pesquisadores que doaram amostras fundamentais para que esse estudo pudesse ser realizado: ao Dr. Ulyses F. J. Pardinãs, pela doação dos tecidos da Argentina; à Dr.^a Leonora Costa e ao Dr. Yuri Leite, do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia da UFES, pela concessão de amostras de tecidos de *Thaptomys* de Minas Gerais; à Dr.^a Lena Geise, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, pela concessão de tecidos do Rio de Janeiro; à Dr.^a Renata Pardini, da Universidade de São Paulo, pela concessão de tecidos de amostras de São Paulo e da Bahia; à Dr.^a Raquel Teixeira Moura pela doação de tecidos da Bahia; ao Dr. João Alves Oliveira pela concessão de tecidos do Paraná.

Ao Prof. Dr. Marcelo Passamani e seu aluno Kassius Klay Santos, da Universidade Federal de Lavras, que foram fundamentais para a realização da coleta em Luminárias, Minas Gerais, e por disponibilizar três exemplares vivos para estudos de citogenética e molecular.

À Dr.^a Yatiyo Yonenaga-Yassuda, da Universidade de São Paulo, por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Citogenética de Vertebrados para a realização dos experimentos de Hibridação *in situ* Fluorescente.

À Dr.^a Karen Ventura por fornecer as sondas teloméricas e para pintura de cromossomos que, junto com a Camilla Di Nizzo, tiveram paciência em me ensinar os experimentos de Hibridação *in situ* Fluorescente.

À minha querida mãe, Nilza, pelo simples fato de poder chamá-la assim. Não tenho palavras para descrever como sou grato a você. Essa vitória com certeza também é sua! Amo você incondicionalmente!

Ao meu irmão, Eloilson, à minha cunhada, Regiane e ao Enzo, que mesmo não tendo nascido ainda, já é o querido do tio-padrinho! Obrigado por me incentivarem e estarem ao meu lado.

À minha segunda família: Tia Maria, Tio Zé Luiz, Tati, Rodney, Lôra, Pedro, a pequena Beatriz, Flávia, Anderson, a princesa Elisa e o Gonçalo, o Iuiú do titio! Obrigado por poder contar com o carinho e apoio de vocês. Amo todos vocês!

Aos amigos Ariel (vulgo PPGBAN e agora mestrando!), Rondnelly Marques (Rond) e Juliana Justino (Ju) pela paciência, almoços e cafés diários! A amizade e o apoio de vocês fizeram toda a diferença!

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal: Lucas Vianna, Mariana Azevedo, Fernanda Zaidan, Gabriel Dalbem, Eduardo Muhl, Yuri Marins e Marina Monjardim. Em especial à Cristina Dornelas, pela disponibilidade de sempre e por ser um exemplo de profissional; à Sílvia Lopes Caldara, pela amizade, pelas conversas esclarecedoras sobre cultura de células e biologia molecular e pelos momentos divertidos; à Rosana Nunes (Rorô, como ela prefere ser chamada!) por ser uma amiga singular, simples, engraçadíssima e pela sua experiência com citogenética de anfíbios; à Lorena Dinelli pela disponibilidade e ajuda na coleta em Luminárias! Muito obrigado mesmo, Lolô! À Marianna Machado pela amizade e sua experiência com citogenética; e ao Arturo Martinelli pelos sete anos de amizade, conversas e momentos compartilhados.

À Maíra Leone, do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia, pela disponibilidade em me acompanhar na coleta em Luminárias.

À querida amiga Rafaela Duda, e agora companheira de doutorado, pelo apoio, conversas divertidas, trocas de experiências e muitos cafés durante esses dois anos.

À Fernanda de Freitas pelos momentos de descontração e amizade construídos nesses dois anos! Quem diria, Fê!

Ao Fernando Colnago e Hananda Folli pela amizade e por entenderem minha ausência.

Ao Felipe Pedruzzi, à Danile Angeli e ao Víctor Maforte pela amizade e conversas, mesmo que virtuais, mas que fizeram toda a diferença.

Obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	1
Lista de Figuras.....	2
Resumo.....	4
I. INTRODUÇÃO.....	6
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
II.1. Análises citogenéticas.....	9
II.1.1. Amostra.....	9
II.1.2. Preparação citogenética e técnicas clássicas de bandejamento cromossômico.	9
II.1.3. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) com sondas teloméricas.....	9
II.1.4. Pintura de Cromossomos.....	9
II.1.5. Análise comparativa dos cariótipos.....	10
II.2. Análises moleculares	10
II.2.1. Amostra.....	10
II.2.2. Sequenciamento.....	10
II.2.3. Análises intrapopulacionais.....	11
II.2.4. Análises interpopulacionais.....	11
II.3. Análises filogenéticas.....	11
III. RESULTADOS.....	13
III.1. Diversidade cariotípica.....	13
III.2. Bandejamento C.....	18
III.3. Análise comparativa dos cariótipos.....	18
III.4. Análises filogenéticas moleculares.....	24
III.4.1 Citocromo b.....	24
III.4.2. IRBP.....	28
IV. DISCUSSÃO.....	30
IV.1. Evolução cariotípica em <i>Thaptomys</i>	30
IV.2. <i>Thaptomys</i> , um gênero monotípico? Uma visão sob diferentes critérios operacionais.	33
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
VI. APÊNDICE.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. História taxonômica de <i>Thaptomys</i>	07
Tabela 2. Procedência, número de indivíduos (n), número diploide (2n) e número de braços autossômicos (NFa) e número de haplótipos (nH) dos genes Citocromo b (Cit b) e <i>Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein</i> (IRBP) de <i>Thaptomys</i>	14
Tabela 3. Divergências genéticas (K2P) para o gene mitocondrial Citocromo b (801pb) entre os diferentes cariótipos descritos para <i>Thaptomys</i>	25
Tabela 4. Divergências genéticas (K2P) para o gene nuclear IRBP (1084pb) entre os diferentes haplótipos obtidos para <i>Thaptomys</i>	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localidades amostradas no presente trabalho. **ARG**=Argentina, **BA**=Bahia, **ES**=Espírito Santo, **MG**=Minas Gerais, **RJ**=Rio de Janeiro, **SP**=São Paulo, **PR**=Paraná, **RS**=Rio Grande do Sul. **1.** Una. **2.** Santa Teresa. **3.** Domingos Martins. **4.** Castelo. **5.** Dores do Rio Preto. **6.** Fervedouro. **7.** Ouro Preto. **8.** Luminárias. **9.** Monte Verde. **10.** Itamonte. **11.** Itatiaia. **12.** Passa Quatro. **13.** Delfim Moreira. **14.** São João da Boa Vista. **15.** Ribeirão Grande. **16.** Ibiúna. **17.** Cotia. **18.** Piedade. **19.** Tapiraí. **20.** Iguape. **21.** Capão Bonito. **22.** Boracéia. **23.** Piraquara. **24.** Maquiné. **25.** Arroio Cunã Pirú..... 12
- Figura 2.** Cariótipo de macho de *Thaptomys nigrita* com $2n=52$, $NFa=52$ (LGA 0305). 15
- Figura 3.** Cariótipos variantes de *Thaptomys*. **a.** macho com $2n=51/NFa=52$ (LGA 3825) **b.** macho com $2n=50a/NFa=48$ (UFMG 2181). **c.** fêmea com $2n=50b/NFa=52$ (LGA 3067). **d.** macho com $2n=49a/NFa=52$ (LGA 3819). **e.** macho com $2n=49b/NFa=52$ (LGA 3065). **f.** macho com $2n=48/NFa=52$ (LGA 3827). Os cariótipos apresentados em **a**, **c**, **d**, **e** e **f** são descritos pela primeira vez na literatura. 16
- Figura 4.** Cariótipos em bandeamento C. Observa-se bloco heterocromático nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e heteromorfismo no par 8 ou 7 (setas). **a.** $2n=51/NFa=52$ (LGA 3825). **b.** $2n=50b/NFa=52$ (LGA 3830). **c.** $2n=49a/NFa=52$ (LGA 3819). **d.** $2n=48/NFa=52$ (LGA 3836) 19
- Figura 5.** Cariótipo de *Thaptomys* com $2n=49a/NFa=52$ em bandeamento G, mostrando o rearranjo de fusão cêntrica em heterozigose. 20
- Figura 6.** Análise cromossômica comparativa de bandeamento G revelando homologia entre cromossomos de diferentes cariótipos de *Thaptomys*. **a.** Cromossomo submetacêntrico das carioformas com $2n=51$, $50b$, $49a$, $49b$ e 48 corresponde aos autossomos acrocêntricos 1 (braço longo) e 15 (braço curto) das carioformas com $2n=52$ e $50a$. **b.** Cromossomo metacêntrico das carioformas com $2n=51$, $50b$, $49a$, $49b$ e 48 corresponde aos cromossomos 3 e 4 das carioformas com $2n=52$ e $50a$. O número dos cromossomos sublinhado corresponde a cromossomos das carioformas com $2n=52$, e o número duplamente sublinhado corresponde a cromossomos do cariótipo $2n=50a$ extraído de Ventura *et al.* (2004). Círculos vermelhos ilustram a posição do centrômero e os verde, as marcações teloméricas intersticiais 20
- Figura 7.** Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sonda telomérica em quatro cariótipos de *Thaptomys*. **a.** $2n=52$. **b.** $2n=48$. **c.** $2n=50b$. **d.** $2n=51$. As setas indicam sinais teloméricos intersticiais no braço longo dos cromossomos grandes com dois braços..... 21

Figura 8. Metáfases parciais (abaixo) após pintura de cromossomos (acima) de *Thaptomys* (TNI) com $2n=49a/NFa=52$ a partir de FISH com sondas cromossomo-específicas de *Akodon paranaensis* (APA), revelando homologia de segmentos cromossômicos eucromáticos e confirmando a homologia dos cromossomos TNI 1+15 (a-c) e TNI 3+4 (d-f), resultado de fusão cêntrica. **a.** Homologia da sonda APA L na região distal do braço curto do submetacêntrico grande TNI 1+15. **b.** Homologia da sonda APA T com a região proximal do braço longo do submetacêntrico TNI 1+15, coincidindo com a região da marcação telomérica. **c.** Homologia da sonda APA 2 no braço longo do submetacêntrico TNI1+15. **d.** Homologia da sonda APA S com porções dos cromossomos TNI 3 e braço longo do metacêntrico TNI 3+4. O cromossomo 3 foi identificado por um banda G positiva intermediária ao braço longo (seta). **e.** Homologia da sonda APA K no braço longo do submetacêntrico TNI 3+4 com porções no cromossomo TNI 3. Não foi detectada homologia de porções heterocromáticas. **f.** Homologia da sonda APA N no braço curto (cromossomo TNI 4) do metacêntrico TNI 3+4..... 22

Figura 9. Esquema ilustrando os eventos que originaram os cromossomos com dois braços em *Thaptomys*. **a.** Quebras cromossômicos proximais nos 1 e 15 acrocêntricos (linha tracejada) e fusão dos cromossomos remanescentes com formação do submetacêntrico grande 1+15, manutenção de telômero proximal e centrômeros do autossomo 15 e perda do centrômero e telômero proximal do autossomo 1. **b.** Quebras cromossômicos proximais nos 3 e 4 acrocêntricos (linha tracejada) e fusão dos cromossomos remanescentes com formação do metacêntrico grande 3+4, manutenção de telômero proximal e centrômeros do autossomo 3 e perda do centrômero e telômero proximal do autossomo 4. Círculos vermelhos representam os centrômeros e os verde, os telômeros. 23

Figura 10. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com 1000 replicações gerada a partir de 112 sequências de citocromo b (801pb) de espécimes de *Thaptomys*..... 26

Figura 11: Árvores filogenéticas de Máxima Parcimônia (a) com 1000 replicações e Inferência Bayesiana (b) com 3 milhões de gerações obtidas a partir de 112 sequências de citocromo b (801 pb) de espécimes de *Thaptomys*..... 27

Figura 12. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com 1000 replicações gerada a partir de 65 sequências (1084pb) do gene nuclear IRBP de espécimes de *Thaptomys*..... 28

Figura 13. Esquema dos rearranjos envolvidos na evolução cariotípica em *Thaptomys* (FC= fusão cêntrica, FT= fusão em tandem, INVp= inversão pericêntrica)..... 31

Figura 14. Árvores Filogenéticas de Máxima Parcimônia com 1000 replicações do gene Citocromo b em que foi possível recuperar os clados Nordeste, correspondente ao 2n=50 da Bahia, e Sudeste, representado por amostras com 2n=52. **a.** Árvore retirada de Ventura *et al.* (2010). **b.** Árvore gerada a partir de uma sub-amostra do presente estudo mostrando que os dados de Ventura *et al.* (2010) estão influenciados pela pequena amostragem.

RESUMO

Thaptomys é um gênero endêmico da Mata Atlântica, com ocorrência da BA ao RS, leste do Paraguai e nordeste da Argentina. É considerado monotípico sendo *T. nigrita* a única espécie conhecida. Cromossomicamente, é caracterizado por dois números diploides: $2n=52/NFa=52$, observado na maior parte da distribuição geográfica do gênero, e $2n=50/NFa=48$, exclusivo da BA. Em trabalho prévio, análises filogenéticas recuperaram dois cladogramas congruentes com os cariótipos e foi proposto que cada um corresponderia a táxons distintos. Morfológicamente, amostras da BA apresentaram distinção sutil das demais localidades, mas não foi significativa. Alguns estudos abordam aspectos da sistemática e evolução de *T. nigrita*. A maioria não se concentrou em avaliar a variabilidade intragenérica utilizando amostragem representativa com dados cariotípicos e moleculares. Neste trabalho foram descritos e comparados cariótipos de *Thaptomys* de 25 localidades de sete Estados brasileiros e Argentina. Os cariótipos foram comparados pelas técnicas CBG, GTG, FISH com sondas teloméricas e pintura de cromossomos para propor os mecanismos envolvidos na diferenciação dos cariótipos. Também foram inferidas as relações filogenéticas a partir de sequências de Citocromo b e IRBP. Observaram-se cinco números diploides ($2n=48-52$) e dois Nfa (48 e 52), configurando sete cariótipos. Os $2n=48,49a,49b,50b$ e 51 são relatados pela primeira vez na literatura. Possuem cromossomos grandes de dois braços, originados por fusões cêntricas Robertsonianas entre cromossomos acrocêntricos inteiros correspondentes nas carioformas com $2n=52/2n=50a$. Assim existem dois padrões evolutivos cromossômicos em *Thaptomys*: um com eventos de fusão cêntrica ($2n=51-48$); e outro com evento de fusão em *tandem* e inversão pericêntrica ($2n=50a$). Esses rearranjos podem produzir efeitos meióticos deletérios, mas tem-se dificuldade em detectar híbridos e evidências de isolamento reprodutivo, sendo necessários cruzamentos experimentais. Do ponto de vista do Conceito Genotípico de Espécie pode-se propor três táxons: (I) $2n=52/NFa=52$; (II) $2n=50/NFa=48$; e (III) $2n=51,50,49$, e $48/NFa=52$. Nas análises filogenéticas, nenhum dos cariótipos foi recuperado como monofilético para ambos os genes, com baixa divergência entre os cariótipos (1,2-2,2%). Diferentes conjuntos de dados e métodos para delimitação das espécies podem resultar em conclusões ambíguas ou conflitantes. Neste estudo a análise de vários critérios operacionais levaram à falta de apoio estatístico nas divergências morfométricas. As evidências citogenéticas e moleculares mostraram que: não há descontinuidade genética entre populações com diferentes cariótipos; nenhum dos cariótipos foi recuperado como monofilético; há baixa divergência genética entre indivíduos com cariótipos distintos; e as formas cariotípicas variantes são derivadas de $2n=52$. Por isso, propomos que *Thaptomys* permaneça monotípico, representado por *T. nigrita*.

I. INTRODUÇÃO

Thaptomys Thomas, 1916 é um gênero de roedor endêmico da Mata Atlântica, com distribuição conhecida no Brasil desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, com registros no leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Musser e Carleton 2005). Na compilação mais recente de mamíferos do mundo, *Thaptomys* é considerado monotípico, sendo *T. nigrita* Lichtenstein, 1829 a única espécie reconhecida (Musser e Carleton 2005).

Ao longo da história taxonômica de *Thaptomys*, mais de uma espécie já foi reconhecida para o gênero (Tabela 1). Lichtenstein (1829) descreveu *Mus nigrita*, com localidade tipo nos arredores do Rio de Janeiro, que foi transferida para *Hesperomys* por Wagner em 1843. Hensel (1873) descreveu *H. subterraneus*, com a localidade tipo restrita à Taquara do Mundo Novo, Rio Grande do Sul. Mais tarde, Trouessart (1898) transferiu *H. nigrita* e *H. subterraneus* para o gênero *Akodon*.

Thaptomys foi mencionado pela primeira vez por Thomas (1916), com a descrição do gênero para acomodar a espécie *A. subterraneus* Hensel, 1873, tornando Taquara do Mundo Novo, no estado do Rio Grande do Sul, a localidade tipo de *Thaptomys*. Gyldenstolpe (1932) incluiu *A. nigrita* em *Thaptomys*, ficando o gênero representado por duas espécies: *T. subterraneus* e *T. nigrita*.

Contudo, Ellerman (1941) propôs *Thaptomys* como um subgênero de *Akodon*, embora destacasse que esse gênero caracterizava-se como “um grupo bem diferenciado” em Akodontini.

Posteriormente, Cabrera (1961) reconheceu somente uma espécie com duas subespécies: *Akodon (Thaptomys) nigrita nigrita*, com distribuição entre o sul da Bahia até o norte de Santa Catarina, e *Akodon (Thaptomys) nigrita subterraneus*, com distribuição do sul de São Paulo até o norte do Rio Grande do Sul, incluindo o leste do Paraguai e o nordeste da Argentina. No entanto, esta divisão subespecífica não foi citada em estudo realizado por Reig (1987) porque o autor considerou que a separação de *Thaptomys* de *Akodon* não era justificada, visto que a diferença observada em *Thaptomys* não representaria características além dos limites de variação já observados em *Akodon*.

Hershkovitz (1990, 1998) destacou que a peculiaridade da presença de um único par de glândulas prostáticas, em adição à cauda curta, unhas das mãos longas, crânio rígido, osso parietal rígido, rostró curto e grosso, com osso nasal longo, região interorbital larga, caixa craniana quadrada, molares relativamente pequenos, incisivos proodontes longos e fortes e o número diploide igual a 52 seriam características suficientes para distinguir *Thaptomys* de *Akodon*, considerando apenas *T. nigrita* como representante do gênero.

Posteriormente, dados moleculares utilizando o gene mitocondrial citocromo b (Smith e Patton, 1999) revelaram que *Thaptomys* e *Akodon* são grupos irmãos e que a divergência genética encontrada foi suficiente para separá-los e reafirmá-los como gêneros distintos.

Tabela 1. História taxonômica de *Thaptomys*.

Epíteto genérico	Subgênero	Epíteto específico	Subespécie	Referência
<i>Mus</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Lichtenstein, 1829
<i>Hesperomys</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Wagner, 1843
<i>Hesperomys</i>	-	<i>subterraneus</i>	-	Hensel, 1873
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	-	<i>subterraneus</i>	-	Trouessart, 1898
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Thaptomys</i>	-	<i>subterraneus</i>	-	Thomas, 1916
<i>Akodon</i>	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Thaptomys</i>	-	<i>subterraneus</i>	-	Gyldenstolpe, 1932
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	<i>Thaptomys</i>	<i>subterraneus</i>	-	Ellerman, 1941
		<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	<i>subterraneus</i> <i>nigrita</i>	Cabrera, 1961
<i>Thaptomys</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Herskovitz, 1990, 1998; Smith e Patton, 1999

Do ponto de vista cromossômico, durante muitos anos o único cariótipo associado à *Thaptomys nigrita* era caracterizado por $2n=52$ e número de braços autossômicos (NFa) igual a 52, com 24 pares de acrocêntricos e um par metacêntrico pequeno, observado em toda a distribuição geográfica da espécie no Brasil, nos estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Yonenaga 1975; Souza 1981; Fagundes 1993; 1997; Paresque 2001; Paresque *et al.* 2004).

Em 2004, foi descrito um cariótipo novo para *Thaptomys* com $2n=50$ e NFa=48, composto por 24 pares de acrocêntricos variando gradativamente de tamanho. Esse cariótipo só foi observado para uma localidade do sul da Bahia, representando o extremo norte da distribuição geográfica para o gênero (Ventura *et al.* 2004). As diferenças entre os cariótipos com $2n=52$ e $2n=50$ foram atribuídas a um evento de fusão em tandem do cromossomo 2, um acrocêntrico médio, com o cromossomo 24, acrocêntrico pequeno, do cariótipo com $2n=52$, formando o par 2 do cariótipo com $2n=50$; e uma inversão pericêntrica do par 25 (metacêntrico pequeno) do cariótipo com $2n=52$, sendo observado como acrocêntrico no cariótipo de $2n=50$ (Ventura *et al.* 2004).

A primeira proposta de filogenia molecular apresentada para *Thaptomys* foi baseada em sequências do gene mitocondrial citocromo b (1077 pb) de 18 indivíduos da Bahia, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (Ventura *et al.* 2010). Nesse estudo os autores recuperaram dois

clados congruentes com os cariótipos, tanto para Máxima Parcimônia (10.000 replicações), quanto para Máxima Verossimilhança (1000 replicações): o clado nordeste, representado por indivíduos com $2n=50$ e o clado sudeste, por espécimes com $2n=52$. Os autores sugeriram que a divergência cariotípica (Ventura *et al.* 2004) e molecular (1,9%-3,5%, Ventura *et al.* 2010) seriam compatíveis com a distinção interespecífica e sugeriram que o cariótipo com $2n=50$ representaria uma nova espécie.

Do ponto de vista morfológico, em um estudo envolvendo a análise de características morfológicas qualitativas e morfométricas, Moreira e Oliveira (2011) utilizaram 379 espécimes de *Thaptomys* com representatividade da distribuição geográfica do gênero no Brasil (da Bahia ao Rio Grande do Sul) e mostraram que as diferenças nos caracteres qualitativos externos e cranianos eram sutis e não significativas, independentemente da localidade geográfica dos exemplares, mesmo entre as amostras de Una (BA) e do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul.

Embora aspectos da sistemática e evolução de *T. nigrita* tenham sido abordados em vários trabalhos, a maioria dos estudos não se concentrou em avaliar a variabilidade molecular intragenérica utilizando uma amostragem representativa de sua distribuição geográfica com dados cariotípicos. Em roedores sigmodontinos, a análise de dados citogenéticos associados a filogenias moleculares tem sido bastante útil na identificação de táxons novos, principalmente pela grande similaridade morfológica observada em vários gêneros dessa subfamília (Fagundes *et al.* 2000; Bonvicino *et al.* 2010; Paresque 2010; Ventura *et al.* 2011).

Nesse sentido, no presente trabalho foram descritos e comparados os cariótipos de *Thaptomys*, utilizando uma amostra abrangente incluindo amostras de localidades dentro da área de distribuição da espécie ainda não utilizadas em estudos anteriores. Os cariótipos foram submetidos às técnicas de bandeamentos clássicos (CBG e GTG), de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas teloméricas e de pintura de cromossomos, para propor os mecanismos cromossômicos que estão envolvidos na diferenciação desses cariótipos. Além disso, foram inferidas as relações filogenéticas a partir de sequências de marcadores mitocondrial (Citocromo b - Cytb) e nuclear (*Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* - IRBP), para auxiliar no melhor entendimento da evolução cariotípica e molecular de *Thaptomys*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Análises citogenéticas

II.1.1. Amostra

Dos 112 indivíduos da amostra total, a caracterização da estrutura cariotípica foi realizada para 73 indivíduos de 14 localidades de sete estados brasileiros (Figura 1, Tabela 2).

II.1.2. Preparação citogenética e técnicas clássicas de bandeamento cromossômico

As metáfases foram obtidas a partir de células de medula óssea tratadas com solução de colchicina 0,1% (1ml por 100 g de peso do animal) e fixadas em solução Carnoy, segundo protocolo descrito por Fagundes *et al.* (1998). Pelo menos 20 metáfases por indivíduo foram analisadas para a determinação do número diploide (2n) e do número de braços autossômicos (NFa).

As metáfases foram submetidas ao bandeamento G e C seguindo os protocolos padronizados de Seabright (1971) e Sumner (1972), respectivamente. As metáfases foram fotodocumentadas com câmera digital monocromática Spectral Imaging em microscópio Nikon Eclipse 50i e editadas no programa Case Data Manager 6.0 (Bandview) para montagem dos cariogramas.

II.1.3. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas teloméricas

As regiões teloméricas foram identificadas nos cromossomos usando a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com dois kits comerciais distintos: “*All telomeres*” (Oncor Inc.) para os exemplares de 2n=52 (imagem retirada de Fagundes 1998) e “DAKO Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K 5326)” para exemplares utilizados no presente estudo. As imagens foram capturadas usando-se o software ISIS (MetaSystems) em microscópio Carl Zeiss.

II.1.4. Pintura de Cromossomos

Para a pintura de cromossomos utilizou-se sondas cromossomo específicas obtidas do genoma de *Akodon paranaensis* por citometria de fluxo, segundo Ventura *et al.* (2009). O procedimento de hibridação *in situ* foi realizado de acordo com Yang *et al.* (1995) com modificações. Para tanto, as lâminas foram desidratadas em série de etanol (70%, 90% e 100%), secas ao ar e levadas à estufa a 65 °C por uma hora. Após, as lâminas foram desnaturadas em solução 70% formamida/2xSSC a 65 °C por dois minutos, mergulhadas em etanol 70% gelado,

por quatro minutos, e novamente desidratadas em série de etanol (70%, 90% e 100%). As sondas foram desnaturadas a 75 °C por 10 minutos e renaturadas a 37 °C, aplicadas sobre as lâminas (14 µL). As lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas em câmara úmida por 2 dias a 37 °C. Para a detecção das sondas as lâminas foram lavadas duas vezes por cinco minutos em solução estrigente (para remover o excesso de sonda e de tampão de hibridação), duas vezes em 2xSSC por cinco minutos (para remover o DNA não específico e/ou repetitivo hibridado nas células e cromossomos) e uma vez em solução de 4xT por quatro minutos a 42 °C. Os anticorpos foram aplicados sobre as lâminas (200 µL), cobertas com Parafilm e incubadas em estufa a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes por três minutos em solução 4xT a 42 °C. As sondas biotinizadas foram detectadas com avidina-Cy3. As lâminas foram contracoloradas com DAPI diluído em Vectashield. As imagens foram capturadas usando-se o software ISIS (MetaSystems).

II.1.5. Análise comparativa dos cariótipos

A análise comparativa dos cariótipos foi baseada nos padrões de bandas G, na FISH com sondas teloméricas e na pintura de cromossomos. Nessa abordagem buscou-se identificar porções de DNA ou braços cromossômicos inteiros homólogos e descrever os mecanismos de diferenciação entre os cariótipos analisados.

II.2. Análises moleculares

II.2.1. Amostra

O DNA de 112 exemplares de 25 localidades (Figura 1; Tabela 2) foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo, conservadas em etanol PA a -20 °C, utilizando o protocolo de extração salina descrito por Bruford *et al.* (1992).

II.2.2. Sequenciamento

As análises foram baseadas em sequências parciais dos genes mitocondrial Citocromo b (Cit b - primers MVZ05 e MVZ 16 – 801pb) (Smith e Patton 1993) e nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP – primers IRBP +IRBP217 e -IRBP1531 – 1084pb) (Stanhope *et al.* 1992). Para ambos os genes, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSap e sequenciados em sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Inc.) no Núcleo de Genética Aplicada à Biodiversidade da Universidade Federal do Espírito Santo (NGACB-UFES) ou na Macrogen (Korea). As sequências obtidas foram

submetidas à ferramenta BLAST no software MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011), alinhadas e conferidas manualmente usando o mesmo programa.

II.2.3. Análises intrapopulacionais

O número de haplótipos (nH) foi determinado por meio do programa DnaSP 5 (Librado e Rozas 2009).

II.2.4. Análises interpopulacionais

Os cálculos de divergência genética foram feitos no software MEGA 5.05 por meio do modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980).

II.3. Análises filogenéticas

Para as inferências filogenéticas foram gerados cladogramas utilizando três critérios de otimização: Máxima Parcimônia (MP), com 1000 replicações, realizada no MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011), Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 replicações, na plataforma online PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010) e Inferência Bayesiana (IB) no programa Mr. Bayes 3.1 (Huelsenbeck e Ronquist 2001). O melhor modelo de substituição nucleotídica para as inferências de ML e IB foi obtido no programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Foram considerados clados confiáveis apenas aqueles que apresentaram valores de *bootstrap* acima de 50 (MP) e 75 (ML) e probabilidades posteriores acima de 95 (IB). Como grupos externos nas filogenias de Citocromo b foram usadas sequências de “*Akodon*” *serrensis* (obtida no presente estudo), *Brucepattersonius soricinus* e *Necomys lasiurus* (retiradas do GenBank – acessos AY277486 e EF622509, respectivamente) e nas filogenias de IRBP, *A. azarae*, *A. montensis* e *Oecomys bicolor* (acessos AY1635781, AY277436 e AY163604, respectivamente).

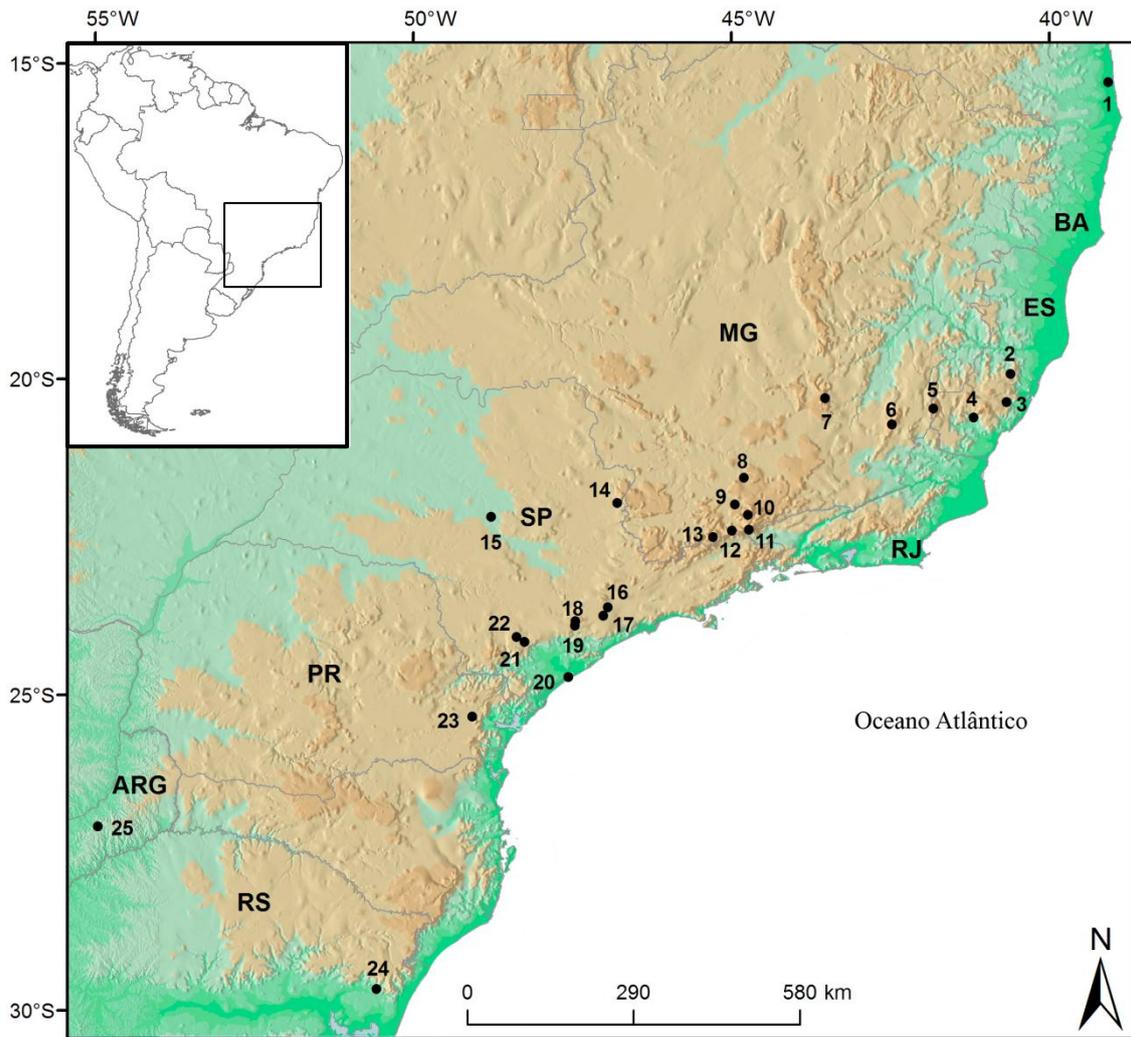


Figura 1. Localidades amostradas no presente trabalho. **ARG**=Argentina, **BA**=Bahia, **ES**=Espírito Santo, **MG**=Minas Gerais, **RJ**=Rio de Janeiro, **SP**=São Paulo, **PR**=Paraná, **RS**=Rio Grande do Sul. **1.** Una. **2.** Santa Teresa. **3:**Domingos Martins. **4:** Castelo. **5:** Dolores do Rio Preto. **6.** Fervedouro. **7.** Ouro Preto. **8.** Luminárias. **9.** Monte Verde. **10.** Itamonte. **11.** Itatiaia. **12.** Passa Quatro. **13.** Delfim Moreira. **14.** São João da Boa Vista. **15.** Ribeirão Grande. **16.** Ibiúna. **17.** Cotia. **18.** Piedade. **19.** Tapiraí. **20.** Iguape. **21.** Capão Bonito. **22.** Boracéia. **23.** Piraquara. **24.** Maquiné. **25.** Arroio Cunã Pirú.

III. RESULTADOS

III.1. Diversidade cariotípica

Dos 73 indivíduos foram obtidos sete cariótipos distintos, compreendendo cinco números diploides ($2n=48, 49, 50, 51$ e 52) e dois números de braços autossômicos ($NFa=48$ e 52). Dos sete cariótipos, os que possuem $2n=48, 49a, 49b, 50b$ e 51 são relatados pela primeira vez na literatura. Os cromossomos sexuais são conservados em todos os cariótipos, sendo o X acrocêntrico médio e o Y submetacêntrico pequeno.

As variações cromossômicas observadas envolveram apenas os cromossomos autossômicos (Figuras 2 e 3; Tabela 2).

$2n=52, NFa=52$ (Figura 2): é o cariótipo mais frequente (58 espécimes, 79%) da amostra e observado na maior parte da sua distribuição geográfica. É formado por 24 pares acrocêntricos (pares 1-24), com variação gradativa de tamanho, e um par metacêntrico pequeno (par 25).

$2n=51, NFa=52$ (Figura 3a): foi observado em dois indivíduos de Luminárias, MG, formado por um cromossomo submetacêntrico grande, dois acrocêntricos médios de tamanhos diferentes, similares em tamanho aos braços curto e longo do cromossomo submetacêntrico, 21 pares de acrocêntricos (pares 2-22) com variação gradativa de tamanho e um par metacêntrico pequeno (par 25).

$2n=50a, NFa=48$ (Figura 3b): apresenta 24 pares acrocêntricos com variação gradativa de tamanho.

$2n=50b, NFa=52$ (Figura 3c): contém um cromossomo submetacêntrico grande e um metacêntrico grande, distintos entre si em forma e tamanho, 4 cromossomos acrocêntricos de tamanho distintos, similares aos braços curto e longo dos cromossomos metacêntrico e submetacêntrico grandes, 20 pares acrocêntricos (pares 3-22), com variação gradativa de tamanho, e um par metacêntrico pequeno (par 25).

$2n=49a, NFa=52$ (Figura 3d): contém um par de submetacêntricos grandes, um cromossomo metacêntrico grande e dois cromossomos acrocêntricos médios, de tamanhos distintos, similares em tamanho ao braço curto e longo do cromossomo metacêntrico, 20 pares acrocêntricos (pares 3-22), com variação gradativa de tamanho, um par metacêntrico pequeno (par 25).

$2n=49b, NFa=52$ (Figura 3e): apresenta um par de cromossomos metacêntricos grandes, um cromossomo submetacêntrico e dois cromossomos acrocêntricos médios, de tamanhos distintos, similares em tamanho ao braço curto e longo do cromossomo submetacêntrico, 20 pares de acrocêntricos (3-22), com variação gradativa de tamanho e um par de metacêntricos pequenos (par 25).

$2n=48, NFa=52$ (Figura 3f): apresenta um par de cromossomos submetacêntricos grandes e um par de metacêntricos grandes, 20 pares de acrocêntricos (pares 3-22), com variação gradativa de tamanho, e um par de metacêntricos pequenos (par 25).

Tabela 2. Procedência, número de indivíduos (n), número diploide (2n) e número de braços autossômicos (NFa) e número de haplótipos (nH) dos genes Citocromo b (Cit b) e *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) de *Thaptomys*.

PAÍS	ESTADO	MUNÍCIPIO	SIGLA	Cariótipo ¹			Cit b			IRBP		
				n	2n	NFa	n	nH	Haplótipos	n	nH	haplótipos
BRASIL	Bahia	Una	UNA	7	50	48	7	5	C1-C5	7	3	I2, I8-I9
		Santa Teresa	STE	17	52	52	19	14	C6-12, C20-C21	16	2	I2, I5
	Espírito Santo	Domingos Martins	DMA	4	52	52	4	4	C9, C13-C15	3	1	I2
		Dores do Rio Preto	DRP	5	52	52	6	5	C6, C16-C19	6	2	I2-I3
		Castelo	CAS	-	-	-	1	1	C22	1	1	I2
		Delfim Moreira	DMR	-	-	-	1	1	C33	-	-	-
		Luminárias	LUM	8	48-51	52	17	5	C25, C29-C32	8	3	I2, I7, I15
	Minas Gerais	Itamonte	ITM	-	-	-	3	3	C29, C30, C32; C34	2	2	I2, I6
		Passa Quatro	PSQ	-	-	-	1	1	C34	1	1	I2
		Ouro Preto	OPR	-	-	-	1	1	C28	-	-	-
		Fervedouro	FER	-	-	-	6	4	C11, C15, C26-C27	4	1	I2
		Monte Verde	MTV	-	-	-	1	1	C6	-	-	-
	Rio de Janeiro	Itatiaia	ITA	2	52	52	2	2	C23-C24	1	1	I2
		Tapiraí	TAP	3	52	52	5	4	C32, C37-C39	2	1	I2
		Piedade	PIE	1	52	52	2	2	C30, C40	-	-	-
		Ribeirão Grande	RIB	1	-	-	3	3	C32, C41-C42	-	-	-
	São Paulo	S. João da Boa Vista	SJB	-	52	52	1	1	C35	1	1	I13
		Ibiúna	IBI	1	52	52	2	2	C27, C34	-	-	-
		Cotia	COT	3	52	52	5	4	C32, C34, C44-C45	-	-	-
		Iguape	IGU	6	52	52	7	3	C36, C39, C43	4	4	I1, I3-I4, I10-I11
		Capão Bonito	CBO	1	52	52	1	1	C36	1	1	I1
		Boracéia	BOR	-	-	-	1	1	C53	-	-	-
	Paraná	Piraquara	PIR	6	52	52	6	4	C39, C46-C48	5		I2-I3, I12
Rio Grande do Sul	Maquiné	MAQ	8	52	52	8	3	C49-C51	1	1	I4	
ARGENTINA	Misiones	Arroio Cunã Pirú	ACP	-	-	-	2	2	C39, C52	2	1	I2
TOTAL				73			112			65		

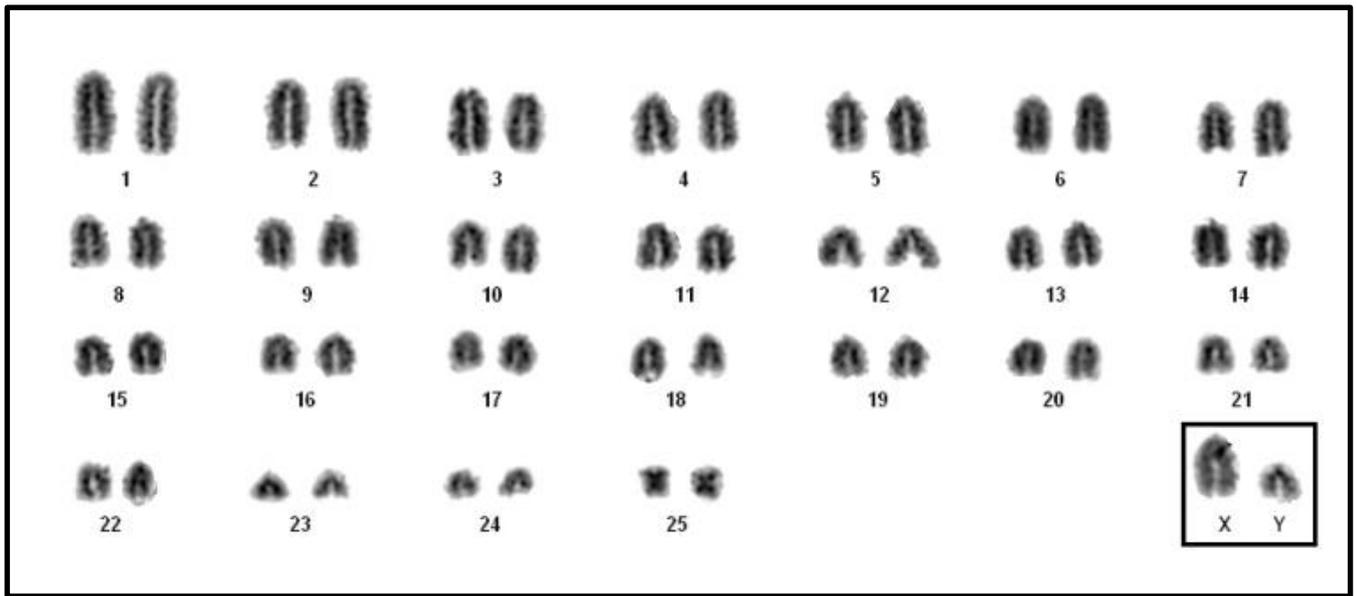


Figura 2. Cariótipo de macho de *Thaptomys nigrita* com $2n=52$, $NFa=52$ (LGA 0305).

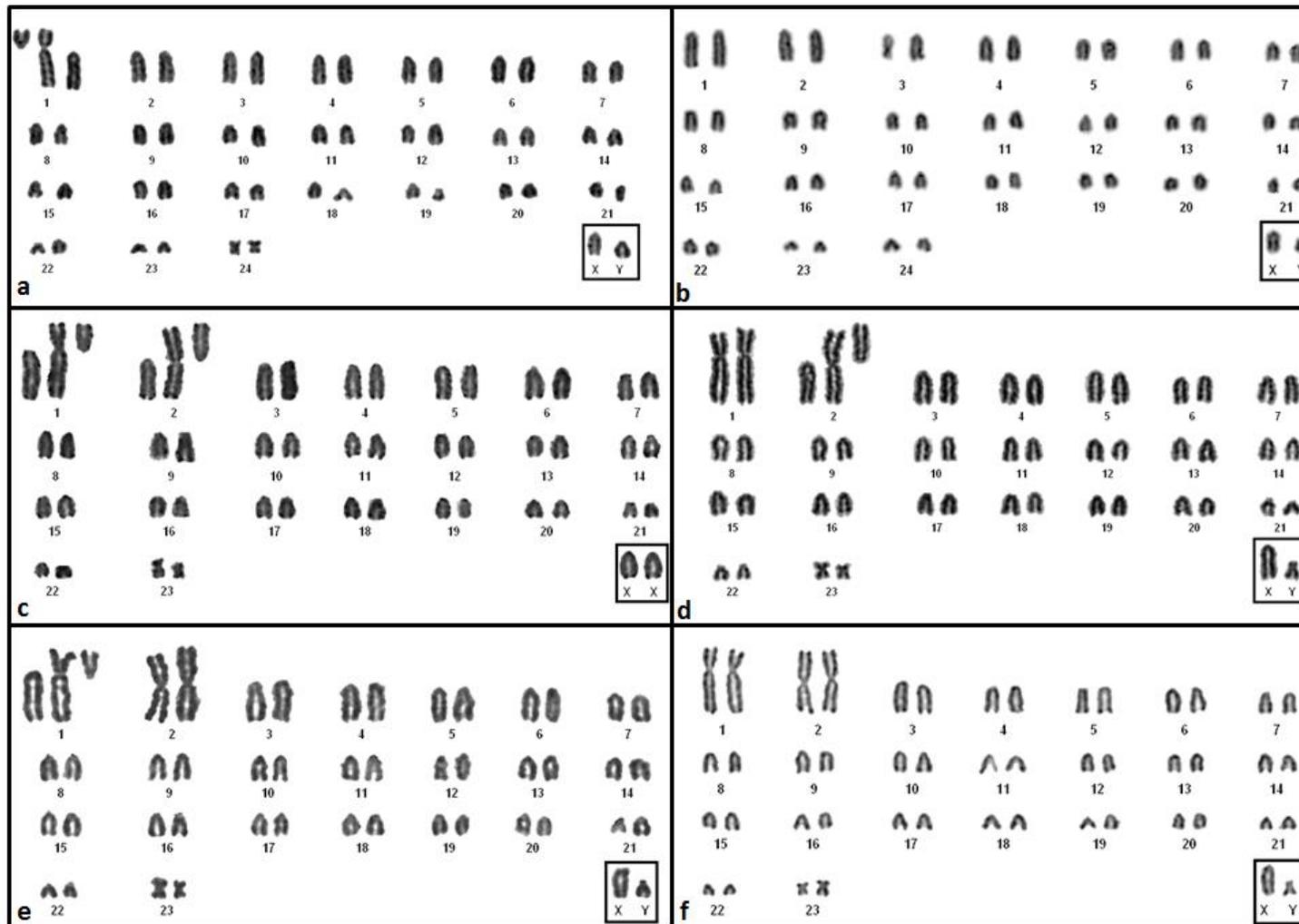


Figura 3. Cariótipos variantes de *Thaptomys*. **a.** macho com $2n=51/NFa=52$ (LGA 3825) **b.** macho com $2n=50a/NFa=48$ (UFMG 2181). **c.** fêmea com $2n=50b/NFa=52$ (LGA 3067). **d.** macho com $2n=49a/NFa=52$ (LGA 3819). **e.** macho com $2n=49b/NFa=52$ (LGA 3065). **f.** macho com $2n=48/NFa=52$ (LGA 3827). Os cariótipos apresentados em **a**, **c**, **d**, **e** e **f** são descritos pela primeira vez na literatura.

III.2. Bandeamento C

Em todos os cariótipos observou-se um pequeno bloco heterocromático pericentromérico nos autossomos (Figura 4). O cromossomo Y mostrou-se heterocromático no braço longo. O tamanho do bloco heterocromático centromérico dos submetacêntricos grandes ($2n=51$, 50b, 49a e 48) sempre foi menor que o observado no par metacêntrico grande ($2n=48$, 49a e 50b). Verificou-se um polimorfismo de tamanho do bloco heterocromático no par 8 ($2n=51$ e 52) e 7 ($2n= 50b$, 49a e 48).

III.3. Análise comparativa dos cariótipos

O heteromorfismo de bandamento C detectado nos pares 8 ($2n=51$ e 52) e 7 ($2n= 50b$, 49a e 48) são similares aos observados no par 9 do $2n=50a$ da Bahia (Ventura *et al.* 2004).

A partir da observação dos cariótipos em bandeamento G foi possível identificar os cromossomos homólogos (Figura 5). A análise comparativa dos cromossomos envolvidos nos rearranjos (Figura 6) revelou a homologia total de braços inteiros, com rearranjos envolvendo fusão de braços inteiros, perdas de centrômeros e telômeros, típicas de rearranjos do tipo Robertsoniano ou fusão cêntrica.

Os braços longo e curto do submetacêntrico grande ($2n=48$, 49a, 49b, 50b, 51) correspondem aos acrocêntrico 1 e 15 ($2n=52$ e 50a), respectivamente (Figura 6a). Da mesma forma, os braços curto e longo do metacêntrico grande correspondem, respectivamente, aos autossomos 3 e 4 (Figura 6b).

Os segmentos teloméricos detectados pela técnica de Híbridação *in situ* Fluorescente (Figura 7) foram localizados nas porções terminais de todos os cromossomos (Figura 7a). Adicionalmente, nos cariótipos com $2n=51$, 50b e 48 (Figuras 7b-7d) observou-se marcação intersticial proximal no braço longo dos submetacêntricos e metacêntricos (seta), coincidente com o possível ponto de fusão decorrente do rearranjo Robertsoniano.

Através da pintura de cromossomos usando sondas cromossomo-específicas de *A. paranaensis* (APA) foi possível confirmar as homologias entre cromossomos inteiros e braços dos cromossomos submetacêntricos e metacêntricos de *T. nigrita* (TNI), visto que apresentaram as mesmas marcações com a utilização de diferentes sondas (Figura 8). A sonda APA L (Figura 8a) marcou a região distal do braço curto do submetacêntrico grande TNI 1+15, o que corresponderia à mesma porção do cromossomo TNI 15. A sonda APA T (Figura 8b) e APA 2 (Figura 8c) marcaram as regiões proximal e distal, respectivamente, do braço longo do submetacêntrico TNI 1+15, o que corresponderia à mesma porção do cromossomo TNI 1. A sonda APA S marcou porções dos cromossomos TNI 3 e o braço longo do metacêntrico TNI 3+4, correspondendo ao cromossomo TNI 3. O cromossomo 3 foi identificado por um banda G positiva intermediária ao braço longo (seta). A sonda APA K marcou no cromossomo TNI 3 e

no braço longo do submetacêntrico TNI 3+4, ambas em em porções distintas da sonda APA S. Não foi detectada homologia de porções heterocromáticas. A sonda APA N marcou no cromossomo TNI 4 e no braço curto do metacêntrico TNI 3+4, correspondendo ao cromossomo TNI 4.

No rearranjo envolvendo os cromossomos 1 e 15 em que são formados o submetacêntricos grandes (1+15), a marcação telomérica intersticial se localiza proximal no braço longo, correspondente ao cromossomo 1. Assim, provavelmente no mecanismo que gerou os cromossomos no processo de fusão cêntrica houve a quebra cromossômica após o telômero do acrocêntrico 15 e antes do centrômero no acrocêntrico 1 (Figura 9), com conseqüente fusão dos segmentos gerando um cromossomo submetacêntrico grande, com um centrômero, dois telômeros terminais e um telômero intersticial e um pequeno fragmento formado pelo centrômero e telômero do autossomo 1, que provavelmente se perdeu. Assim, o submetacêntrico 1+15 possui o centrômero e de telômero intersticial derivado do cromossomo 15, este último correspondendo ao sinal intersticial.

Na formação do metacêntrico grande 3+4, originado da fusão dos cromossomos acrocêntricos 3 e 4, também se observou marcação telomérica intersticial proximal ao braço longo, correspondente ao cromossomo 3. Dessa maneira, para a formação desse cromossomo houve a quebra após o telômero no acrocêntrico 3 e antes do centrômero do acrocêntrico 4, com fusão dos segmentos gerando um cromossomo metacêntrico grande e perda do telômero e centrômero do cromossomo 4 com manutenção de centrômero e telômero do 3.

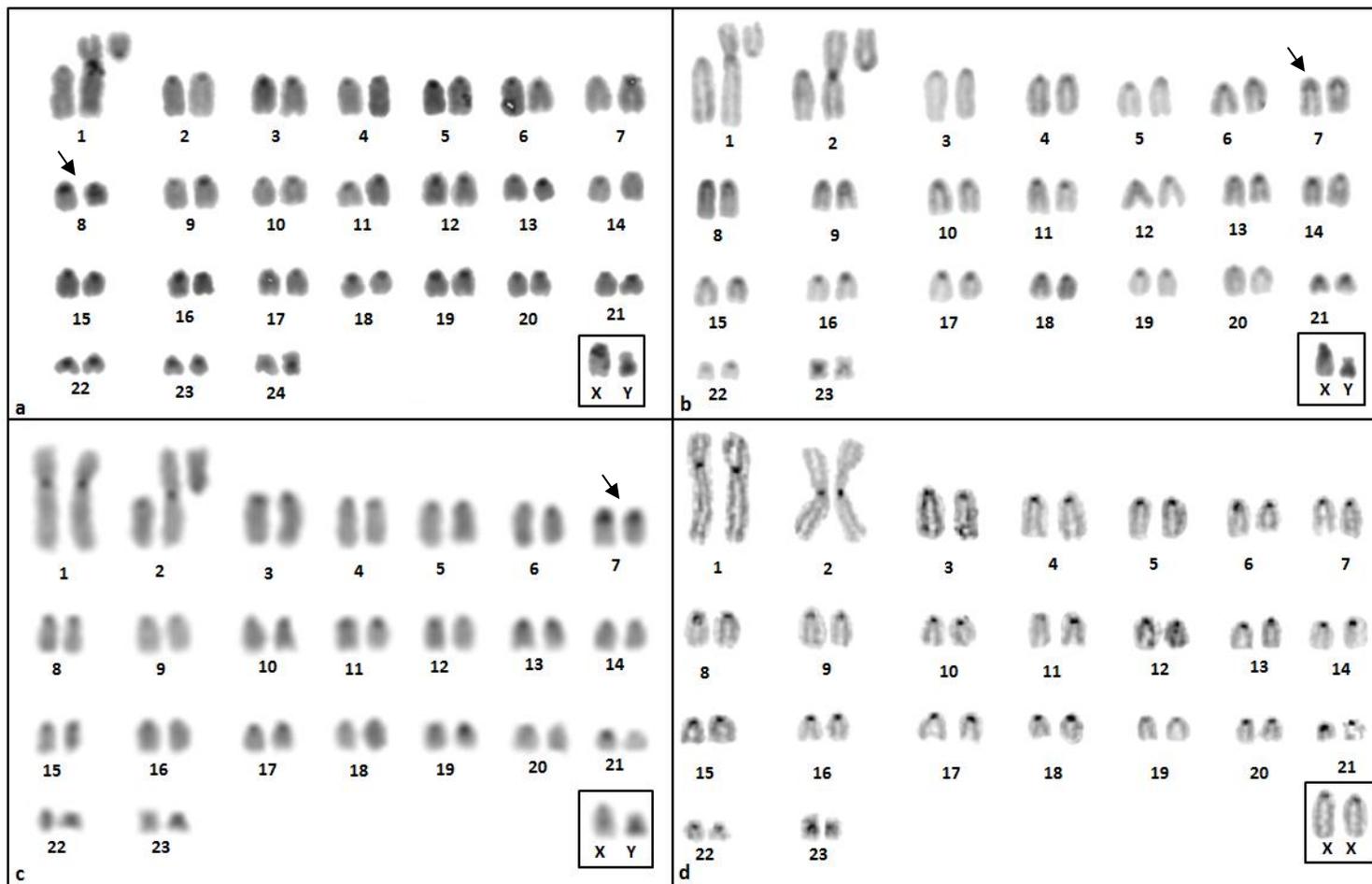


Figura 4. Cariótipos em bandeamento C. Observa-se bloco heterocromático nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e heteromorfismo no par 8 ou 7 (setas). **a.** $2n=51/NFa=52$ (LGA 3825). **b.** $2n=50b/NFa=52$ (LGA 3830). **c.** $2n=49a/NFa=52$ (LGA 3819). **d.** $2n=48/NFa=52$ (LGA 3836)

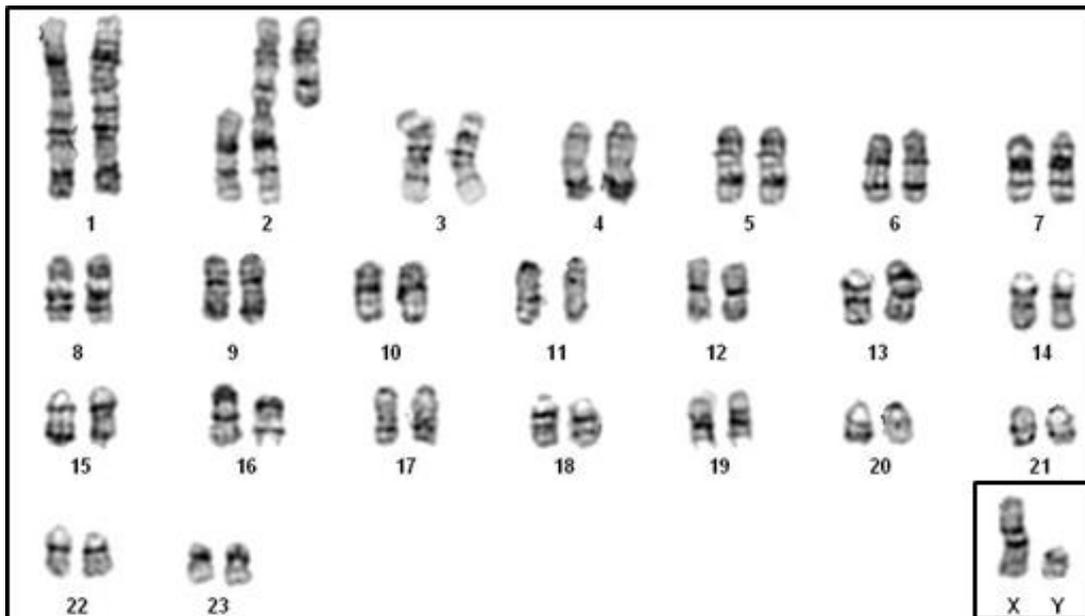


Figura 5. Cariótipo de *Thaptomys* com $2n=49a/NFa=52$ em bandejamento G, mostrando o rearranjo de fusão cêntrica em heterozigose.

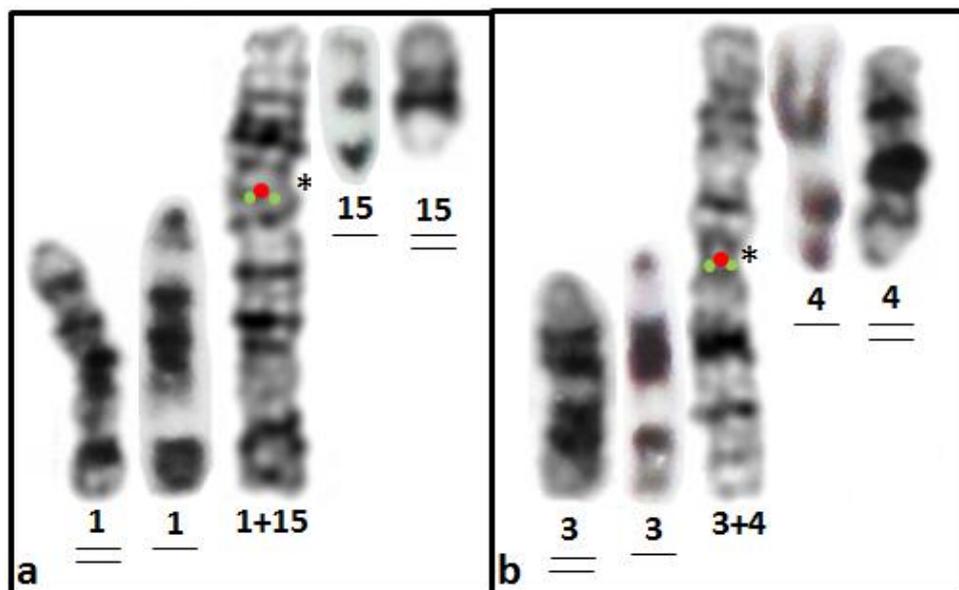


Figura 6. Análise cromossômica comparativa de bandejamento G revelando homologia entre cromossomos de diferentes cariótipos de *Thaptomys*. **a.** Cromossomo submetacêntrico das carioformas com $2n=51$, $50b$, $49a$, $49b$ e 48 corresponde aos cromossomos 1 (braço longo) e 15 (braço curto) das carioformas com $2n=52$ e $50a$. **b.** Cromossomo metacêntrico das carioformas com $2n=51$, $50b$, $49a$, $49b$ e 48 corresponde aos cromossomos 3 e 4 das carioformas com $2n=52$ e $50a$. O número dos cromossomos sublinhado corresponde a cromossomos das carioformas com $2n=52$, e o número duplamente sublinhado corresponde a cromossomos do cariótipo $2n=50a$ extraído de Ventura *et al.* (2004). Círculos vermelhos ilustram a posição do centrômero, os verde, as marcações teloméricas intersticiais e os asteriscos a posição do centrômero (vide Figura 7).

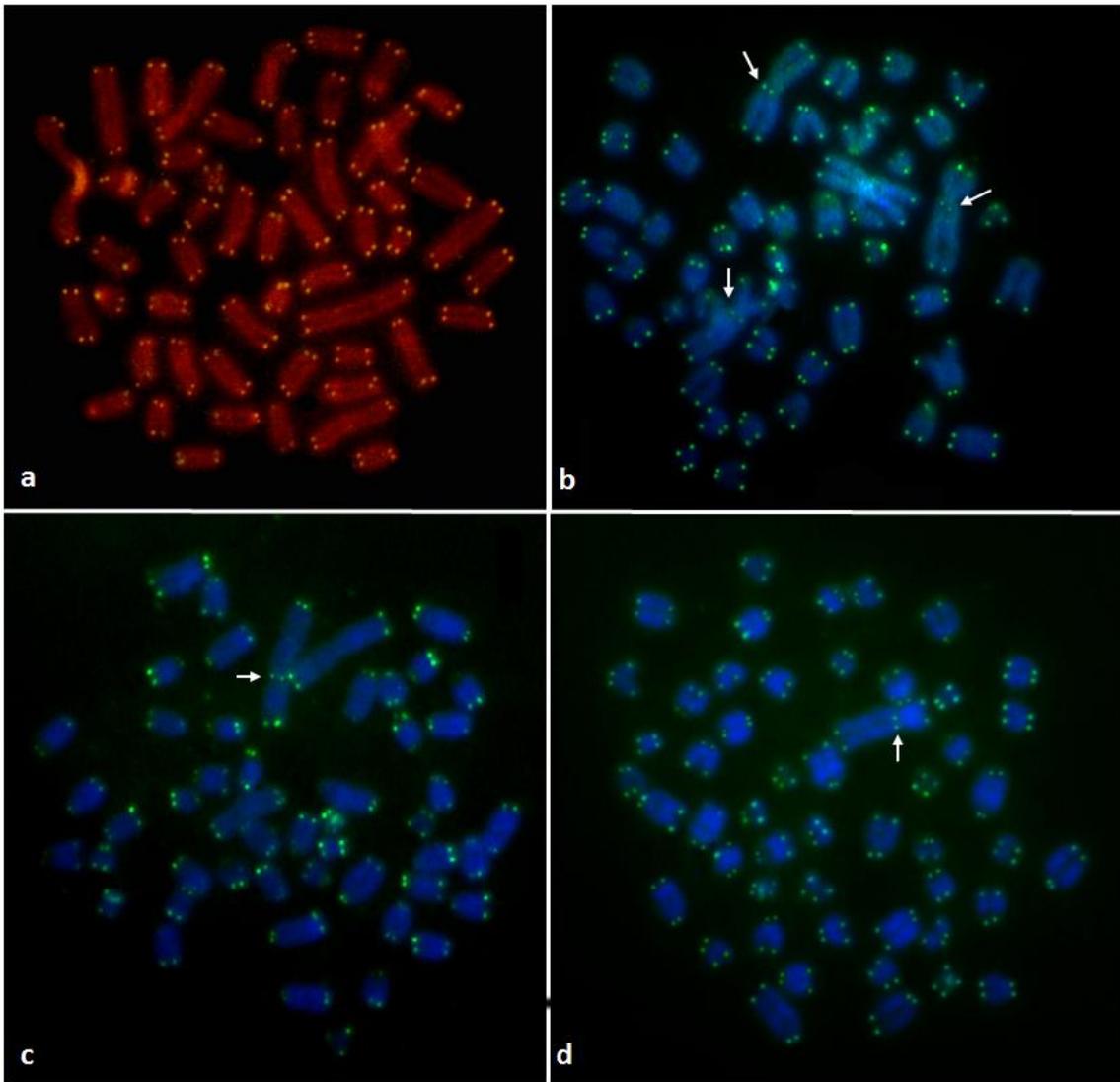


Figura 7. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sonda telomérica em quatro kariótipos de *Thaptomys*. **a.** $2n=52$. **b.** $2n=48$. **c.** $2n=50b$. **d.** $2n=51$. As setas indicam sinais teloméricos intersticiais no braço longo dos cromossomos grandes com dois braços.

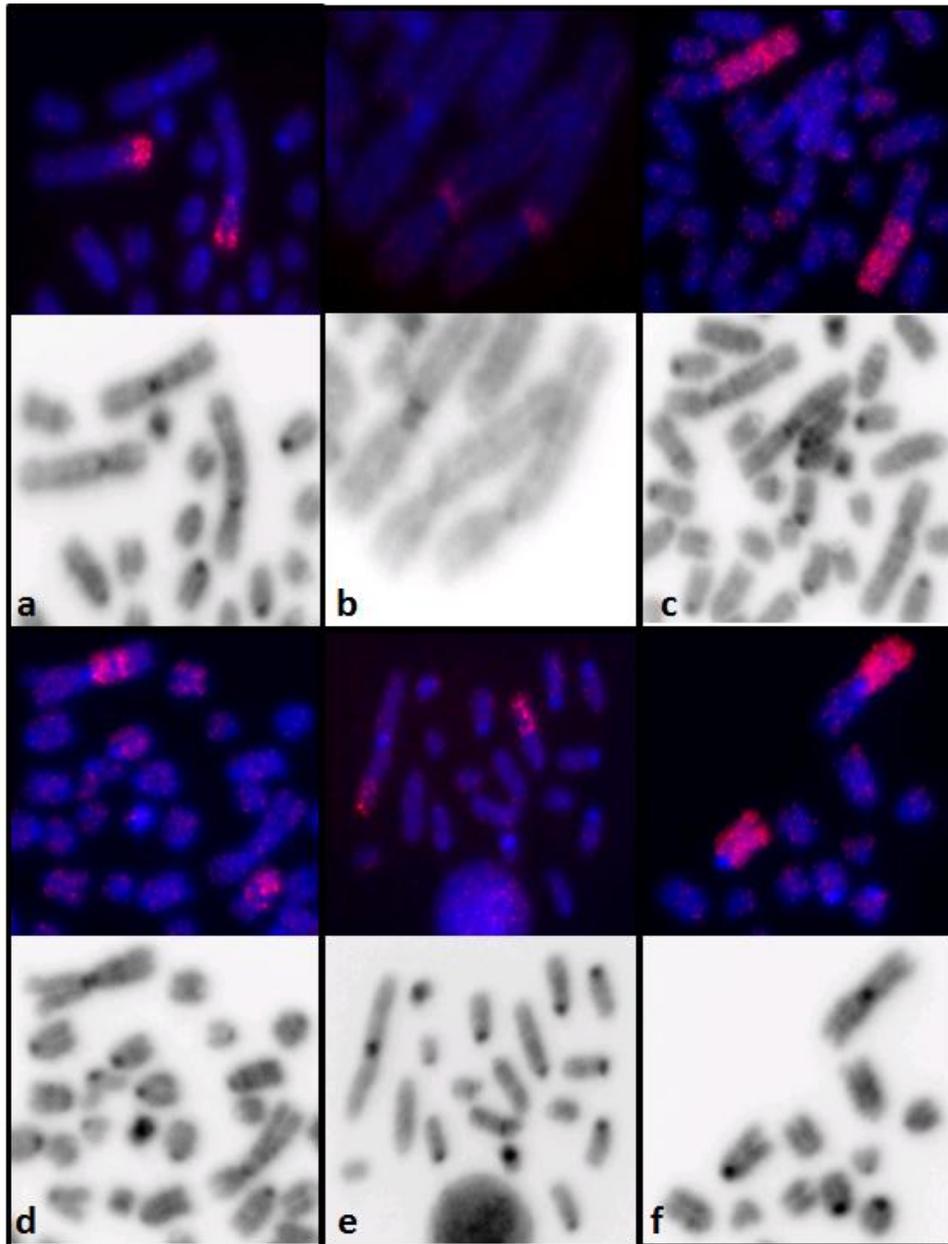


Figura 8. Metáfases parciais (abaixo) após pintura de cromossomos (acima) de *Thaptomys nigrita* (TNI) com $2n=49a/NFa=52$ a partir de FISH com sondas cromossomo-específicas de *Akodon paranaensis* (APA), revelando homologia de segmentos cromossômicos eucromáticos e confirmando a homologia dos cromossomos TNI 1+15 (a-c) e TNI 3+4 (d-f), resultado de fusão cêntrica. **a.** Homologia da sonda APA L na região distal do braço curto do submetacêntrico grande TNI 1+15. **b.** Homologia da sonda APA T com a região proximal do braço longo do submetacêntrico TNI 1+15, coincidindo com a região da marcação telomérica. **c.** Homologia da sonda APA 2 no braço longo do submetacêntrico TNI 1+15. **d.** Homologia da sonda APA S com porções dos cromossomos TNI 3 e braço longo do metacêntrico TNI 3+4. O cromossomo 3 foi identificado por um banda G positiva intermediária ao braço longo (seta). **e.** Homologia da sonda APA K no braço longo do submetacêntrico TNI 3+4 com porções no cromossomo TNI 3. Não foi detectada homologia de porções heterocromáticas. **f.** Homologia da sonda APA N no braço curto (cromossomo TNI 4) do metacêntrico TNI 3+4.

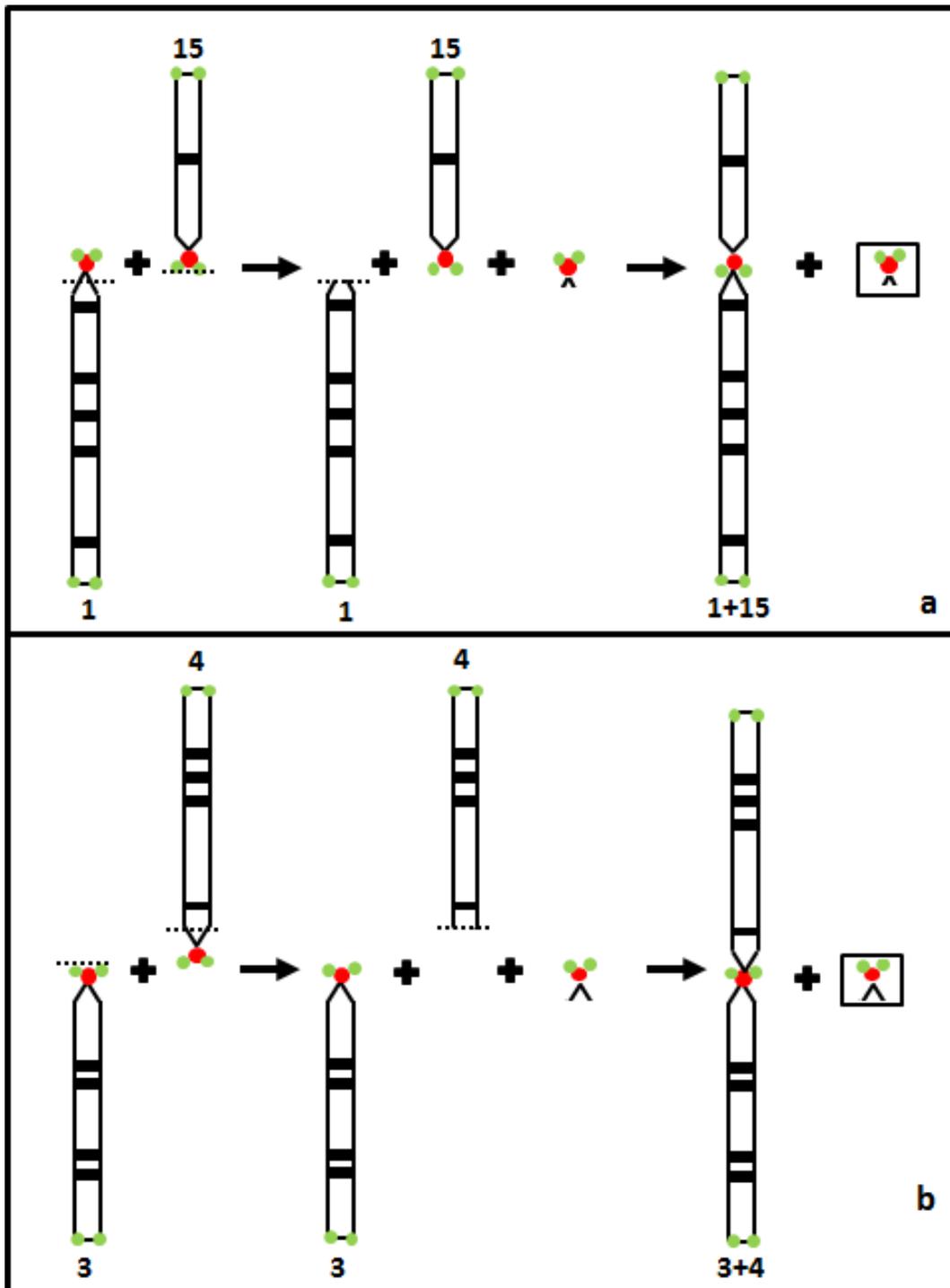


Figura 9. Esquema ilustrando os eventos que originaram os cromossomos com dois braços em *Thaptomys*. **a.** Quebras cromossômicos proximais nos 1 e 15 acrocêntricos (linha tracejada) e fusão dos cromossomos remanescentes com formação do submetacêntrico grande 1+15, manutenção de telômero proximal e centrômeros do autossomo 15 e perda do centrômero e telômero proximal do autossomo 1. **b.** Quebras cromossômicos proximais nos 3 e 4 acrocêntricos (linha tracejada) e fusão dos cromossomos remanescentes com formação do metacêntrico grande 3+4, manutenção de telômero proximal e centrômeros do autossomo 3 e perda do centrômero e telômero proximal do autossomo 4. Círculos vermelhos representam os centrômeros e os verde, os telômeros.

III.4. Análises filogenéticas moleculares

III.4.1. Citocromo b

Das 112 sequências geradas foram obtidos 53 haplótipos (Tabela 2). O melhor modelo evolutivo para as inferências filogenéticas de ML e IB foram GTR +I +G (I=0.3640; G=0.6070) e HKY +I +G (I=0.4330; G=0.7330), respectivamente. Em todos os três critérios de otimização utilizados (MP, ML e IB) *Thaptomys* foi recuperado como grupo monofilético com alto suporte (99, 100 e 1, respectivamente; Figura 10 e 11).

Nenhum dos sete cariótipos (2n=52, 51, 50a, 50b, 49a, 49b e 48) foi recuperado como monofilético em nenhum dos critérios de otimização utilizados, com divergência genética variando de 0,1%, entre as formas com 2n=51 e 2n=49b, a 2,2%, entre as formas com 2n=50a e 2n=49b (Tabela 3).

Em todas as inferências filogenéticas observou-se a formação de um grupo “Central” na distribuição de *Thaptomys* com suporte de 87, 78 e 0,99 (MP, ML e IB, respectivamente). Esse grupo é formado por 8 haplótipos de amostras de Minas Gerais (Ibiúna, Itamonte, Luminárias e Passa Quatro) e São Paulo (Boracéia, Cotia, Piedade, Ribeirão e Tapiraí). Dos 27 indivíduos desse grupo (C29, C32, C33, C34, C37, C40, C45, C53), 11 foram cariotipados e apresentaram 2n=52, 51, 49b e 48/NFa=52.

Observou-se a tendência de formação de um clado com 12 haplótipos representando amostras do sul da distribuição geográfica conhecida para *Thaptomys* (grupo “Sul”), apenas na análise de ML (*bootstrap*=74), abrangendo espécimes de São Paulo (Capão Bonito, Iguape, Ribeirão e Tapiraí), Paraná (Piraquara), Rio Grande do Sul (Maquiné) e Argentina (Arroio Cunã Pirú). Nesse grupo todos os exemplares cariotipados (24 de 29 espécimes, Tabela 2) apresentaram 2n=52/NFa=52.

As demais amostras representam exemplares de todas as outras localidades, incluindo os cinco haplótipos (em sete indivíduos) de Una/BA, com 2n=50a/NFa=48, que não se organizaram como grupo monofilético em nenhuma das três análises realizadas, e exemplares com 2n=52, 50b, 49a e 48/NFa=52.

As divergências genéticas entre os haplótipos variaram de 0,1% entre os haplótipos C25 (Luminárias/Minas Gerais) e C6 (Santa Teresa/Dores do Rio Preto-ES/Monte Verde-MG), distantes entre si por 468 km, até 3,8% entre os haplótipos C50 (Maquiné-RS) e C52 (Boracéia-SP), distantes entre si por cerca de 850 km. As divergências genéticas entre as amostras de Una-BA com qualquer outro haplótipo variou de 3,4% (Maquiné-RS) a 1,2% (Santa Teresa-ES).

Tabela 3. Divergências genéticas (K2P) para o gene mitocondrial Citocromo b (801pb) entre os diferentes cariótipos descritos para *Thaptomys*.

	2n=50a	2n=52	2n=49b	2n=51	2n=48	2n=49a
2n=50a	-	-	-	-	-	-
2n=52	0.019	-	-	-	-	-
2n=49b	0.022	0.013	-	-	-	-
2n=51	0.021	0.013	0.001	-	-	-
2n=48	0.016	0.012	0.008	0.007	-	-
2n=49a	0.013	0.011	0.013	0.012	0.008	-
2n=50b	0.012	0.013	0.014	0.014	0.006	0.004

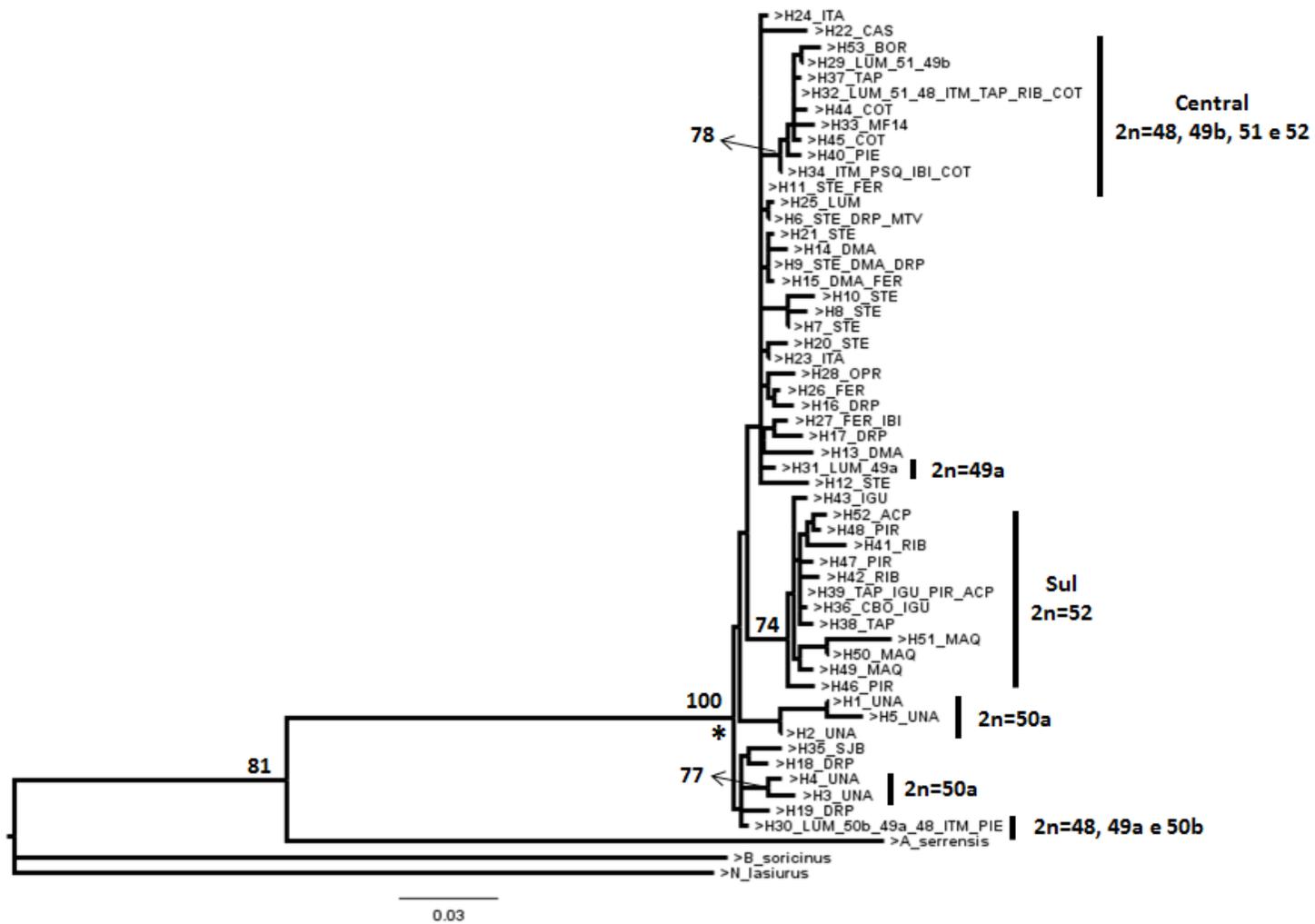


Figura 10. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com 1000 replicações obtida a partir de 112 seqüências de citocromo b (801 pb) de espécimes de *Thaptomys*.

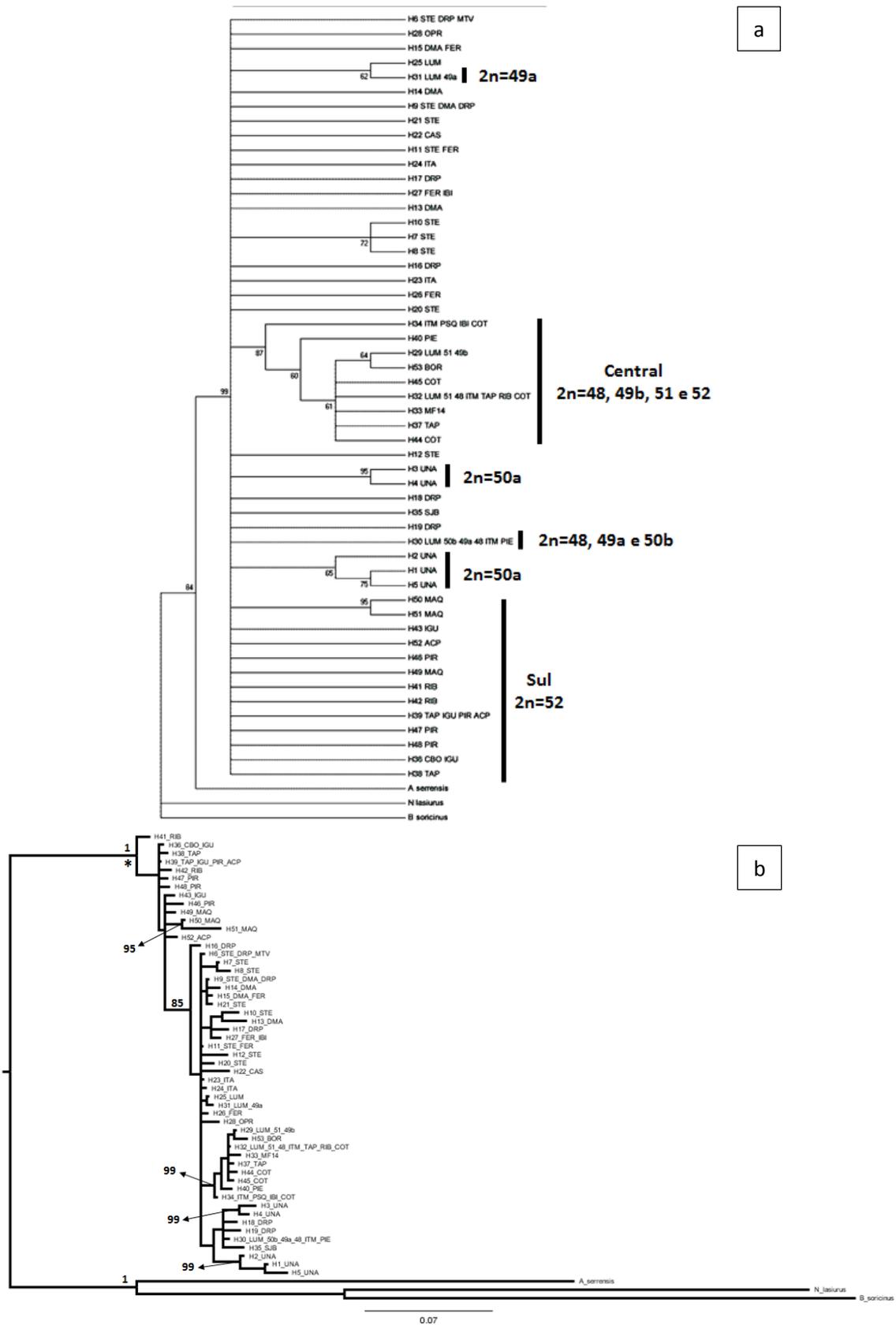


Figura 11: Árvores filogenéticas de Máxima Parcimônia (a) com 1000 replicações e Inferência Bayesiana (b) com 3 milhões de gerações obtidas a partir de 112 seqüências de citocromo b (801 pb) de espécimes de *Thaptomys*.

III.4.2. IRBP

Dos 1084 pb gerados para 65 espécimes de 17 localidades, foram obtidos 15 haplótipos (Tabela 2), com divergência entre si variando de 0,1% entre amostras de Una e Iguape a 1,1% entre Una e Iguape, distantes a cerca de 1.373 km (Tabela 4). O haplótipo I2 foi o mais frequente, representado por 49 indivíduos, desde Una, na Bahia, até o extremo da distribuição geográfica do gênero, na Argentina.

O melhor modelo evolutivo para as inferências filogenéticas de ML e IB foi GTR +G (G=0.0170). Em todos os critérios de otimização (MB, ML e IB) *Thaptomys* foi recuperado como grupo monofilético com suportes significativos para o clado (99, 100 e 1, respectivamente). Em nenhuma das análises foi observada a formação de grupos monofiléticos correspondentes aos cariótipos ou que demonstrasse qualquer estruturação geográfica (Figura 12).



Figura 12. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com 1000 replicações gerada a partir de 65 sequências (1084pb) do gene nuclear IRBP de espécimes de *Thaptomys*.

Tabela 4. Divergências genéticas (K2P) para o gene nuclear IRBP (1084pb) entre os diferentes haplótipos obtidos para *Thaptomys*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	AZA	AMO
H1																	
H2	0.001																
H3	0.002	0.001															
H4	0.005	0.004	0.005														
H5	0.007	0.006	0.007	0.010													
H6	0.009	0.008	0.009	0.012	0.002												
H7	0.003	0.002	0.003	0.006	0.008	0.010											
H8	0.002	0.001	0.002	0.005	0.007	0.009	0.003										
H9	0.002	0.001	0.002	0.005	0.007	0.009	0.003	0.002									
H10	0.001	0.002	0.003	0.005	0.008	0.010	0.004	0.003	0.003								
H11	0.003	0.004	0.003	0.008	0.008	0.010	0.006	0.005	0.005	0.004							
H12	0.008	0.007	0.008	0.011	0.011	0.009	0.007	0.008	0.008	0.009	0.009						
H13	0.004	0.003	0.004	0.007	0.007	0.009	0.005	0.004	0.004	0.005	0.003	0.008					
H14	0.002	0.001	0.002	0.005	0.007	0.009	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.008	0.002				
H15	0.002	0.001	0.002	0.005	0.007	0.009	0.003	0.002	0.002	0.003	0.005	0.007	0.004	0.002			
AZA	0.018	0.017	0.018	0.020	0.022	0.024	0.019	0.018	0.018	0.018	0.019	0.021	0.018	0.016	0.017		
AMO	0.015	0.014	0.015	0.018	0.020	0.021	0.016	0.015	0.015	0.016	0.018	0.021	0.017	0.015	0.015	0.007	
OBI	0.038	0.037	0.038	0.041	0.043	0.045	0.039	0.038	0.038	0.039	0.041	0.044	0.040	0.038	0.038	0.040	0.037

AZA=*A. azarae* (AY1635781), AMO=*A. montensis* (AY2774262), OBI=*O. bicolor* (AY163604)

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Evolução cariotípica em *Thaptomys*

Em roedores sigmodontinos observa-se grande plasticidade na constituição cariotípica, com exemplos de variação tanto no número diploide ($2n$) quanto na forma dos cromossomos gerando mudanças no número de braços (NF). Essas variações são decorrentes de rearranjos cromossômicos como fusões (Robertsonianas ou em *tandem*), inversões (pericêntricas ou paracêntricas), translocações e reposicionamento de centrômero (Romanenko *et al.* 2012).

O padrão de homologia cromossômica revelado pelo bandeamento G e pela pintura de cromossomos em *Thaptomys* mostrou que cromossomos inteiros acrocêntricos se fundem formando submetacêntricos e metacêntricos grandes por eventos de fusão cêntrica, exclusivamente em uma amostra de nove espécimes de Luminárias, Minas Gerais. Esse tipo de rearranjo em *Thaptomys* é observado pela primeira vez na literatura.

Outra variação cromossômica particular em *Thaptomys* envolve um evento de fusão em *tandem* de dois cromossomos acrocêntricos e uma inversão pericêntrica do metacêntrico pequeno, formando o cariótipo de $2n=50a$, observado exclusivamente em Una, na Bahia (Ventura *et al.* 2004).

Portanto, verifica-se que a partir de um cariótipo básico com $2n=52$, composto fundamentalmente por cromossomos acrocêntricos (Yonenaga 1975; Fagundes 1993; Paresque *et al.* 2004), existem dois padrões evolutivos cromossômicos diferentes: um caracterizado por eventos de fusão cêntrica, formando cariótipos com pelo menos um cromossomo grande de dois braços ($2n=51$, 50b, 49a, 49b e 48) e outro caracterizado por evento de fusão em *tandem* e inversão pericêntrica, com cromossomos essencialmente acrocêntricos (Figura 13). As formas variantes são detectadas em populações exclusivas, localizadas em regiões consideradas periféricas, no norte ($2n=50a$) e oeste-central ($2n=48-51$) da distribuição geográfica da espécie.

As formas variantes $2n=48-51$ observadas em Minas Gerais envolvem fusões de cromossomos acrocêntricos em várias combinações, aparentemente sem nenhum sentido prioritário para ocorrer, de modo que cada carioforma poderia ser resgatada a partir de cariótipo com $2n=52$, independentemente. Assim, para a diferenciação do cariótipo com $2n=51$ é previsto que uma fusão cêntrica 1+15 ocorra originando um cromossomo submetacêntrico grande; para a formação daquele com $2n=50b$ seria necessário ocorrer uma fusão 1+15 e uma 3+4; para que o cariótipo com $2n=49a$ pudesse ser formado seriam necessárias duas fusões 1+15 e uma 3+4; para a formação do cariótipo $2n=49b$ deveriam ocorrer duas fusões 3+4 e uma 1+15; e finalmente para a formação do $2n=48$ seria necessário ocorrer duas fusões 1+15 e duas 3+4.

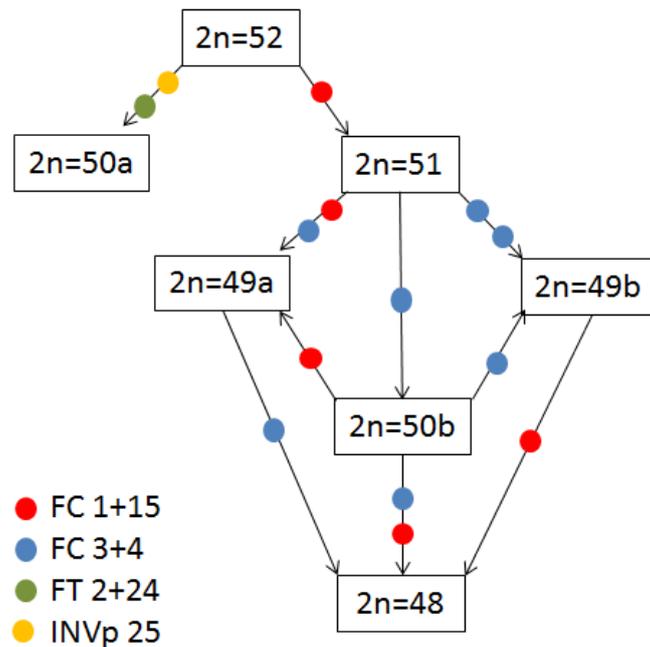


Figura 13. Esquema dos rearranjos envolvidos na evolução cariotípica em *Thaptomys* (FC= fusão cêntrica, FT= fusão em tandem, INVp= inversão pericêntrica).

A detecção de resquícios telôméricos nas porções pericentroméricas dos cromossomos submetacêntricos e metacêntricos grandes e a manutenção do NFa=52 são evidências que reforçam a proposta de diferenciação por fusões cêntricas do tipo Robertsonianas, ao invés de fissão cêntrica. Esse tipo de rearranjo envolve a fusão de dois cromossomos de um braço (acrocêntricos ou telocêntricos) tendo como resultado a formação de elementos de dois braços (cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos), com perda do centrômero de um dos acrocêntricos envolvidos no rearranjo; ou simplesmente os cromossomos se fundem pelas regiões paracentroméricas produzindo um cromossomo de dois braços dicêntrico, o que requereria inativação de um dos centrômeros (King 1993). No caso de *T. nigrita* assumimos que o primeiro caso ocorra tanto no evento de fusão 1+15 quanto no 3+4.

A proposta de fissão cêntrica tem baixa probabilidade de ocorrer uma vez que a) a frequência do cariótipo de $2n=52$ é alta, ocorrendo do Espírito Santo à Argentina; b) os cariótipos variantes são exclusivos a duas localidades, periféricas à toda a distribuição da espécie; c) a ocorrência de fissão pressupõe que o cariótipo básico de *Thaptomys* deveria ser $2n=50$ (similar ao da Bahia) ou $2n=48$ (similar ao de Minas Gerais), os quais são completamente distintos, derivados por mecanismos muito diferentes, restritos a uma localidade geográfica distinta e raros; e por fim d) seria necessário surgir novos telômeros e centrômeros nos cromossomos derivados, sendo estes segmentos muito específicos do DNA.

Apesar de os processos serem distintos, verificamos que houve manutenção do segmento telomérico intersticial decorrente dos rearranjos de fusão cêntrica (presente estudo) e

em *tandem* (Ventura *et al.* 2004). Segundo nossa proposta, o telômero foi mantido durante os eventos de fusão. Por outro lado, segmentos sem função nos cromossomos, como telômeros intersticiais, podem estar sujeitos a alterações aleatórias e serem modificados com o passar do tempo, de maneira que as sondas das técnicas de FISH não seriam capazes de detectá-los.

A proposta de que os segmentos teloméricos intersticiais são resquílios de eventos recentes é corroborado pelos dados encontrados por Fagundes e Yonenaga-Yassuda (1998). Nesse estudo as autoras estabeleceram as homologias cromossômicas entre *Akodon montensis* (AMO), com $2n=24$ e 25 , e *Necromys lasiurus* (NLA), com $2n=33$ e 34 a partir de bandeamento G e identificaram que o cromossomo AMO 3 é completamente homeólogo ao cromossomo NLA 6+7. Após FISH com sondas teloméricas foi observada a marcação telomérica intersticial em NLA 6+7 e ausência de marcação em AMO 3. As autoras propõe que essa marcação em NLA 6+7 foi detectada pela FISH por ser um evento recente, enquanto em AMO 3 essa mesma marcação não foi observada por ser um evento evolutivo antigo, de maneira que possíveis sequências intersticiais acumularam diferenças e não puderam ser reveladas pela FISH.

Baseando-se nessa proposta, podemos sugerir que os eventos de fusão cêntrica e em *tandem* na formas variantes de *Thaptomys* sejam recentes. Paralelamente, os dados de pintura cromossômica sugerem que segmentos de dois cromossomos distintos de *Akodon paranaensis* (APA L e APA T) se fundiram formando o TNI 1 e nesse caso não se observa os resquílios teloméricos do evento de fusão. Assim, duas propostas são plausíveis: ou houve perda do telômero nesse processo ou o telômero foi mantido, mas diferenciado com o passar do tempo, não sendo detectado, como previsto por King (1993).

Rearranjos cromossômicos estruturais são muito comuns entre os roedores (Souza 1981; Patton e Sherwood 1983), dentre eles estão as fusões cêntricas, como observadas em *Sigmodon fulviventer* ou *Mus* (Patton e Sherwood 1983), em *tandem*, como *Juliomys* (Costa *et al.* 2007; Paresque *et al.* 2009) e *Deltamys* (Ventura *et al.* 2011) e as inversões pericêntricas, detectadas em *Akodon cursor* (Fagundes *et al.* 1997b), *Oligorizomys nigripes* (Paresque *et al.* 2007) e *Cerradomys langguthi* (Maia e Hulak 1981). Esses rearranjos possuem a capacidade de causar a segregação incorreta dos cromossomos na meiose dos híbridos produzindo aneuploidias, duplicações, deleções ou até mesmo de impedir completamente a meiose (King 1993), atuando, dessa maneira, como uma barreira pós-zigótica. Entretanto, se ocorre a segregação normal dos produtos da meiose em heterozigotos para essas mudanças, eles não resultarão em um isolamento pós zigótico, mas na formação de cariótipos polimórficos (King 1993).

Diferenças cromossômicas são consideradas polimorfismos em casos de alterações estruturais em que as formas normal e rearranjada são possíveis de ocorrer ao mesmo tempo na mesma região (Sumner 1990). As diferenças cariotípicas seriam consideradas como diferenças cromossômicas geográficas intraespecíficas em populações disjuntas que apresentem constituições cariotípicas distintas, ou seja, com e sem o rearranjo (Kasahara 2009). Essa

configuração é observada em *Thaptomys*, em que os diferentes cariótipos parecem estar isolados geograficamente e as populações com formas variantes não estão próximas uma das outras.

Apesar dos rearranjos de fusões cêntricas, em *tandem* e inversões pericêntricas terem o potencial de produzir efeitos meióticos deletérios, citogeneticistas de populações tem encontrado dificuldade em detectar híbridos, rearranjos que levem ao isolamento reprodutivo, pois a amostragem é um elemento importante para responder a essas questões (King 1993). Além disso, cruzamentos experimentais representam a chave para estudos que abordem esse tema. No caso de *Thaptomys nigrita*, consideramos que os novos cariótipos constituem diferenças cromossômicas geográficas intraespecíficas em populações disjuntas.

IV.2. *Thaptomys*, um gênero monotípico? Uma visão sob diferentes critérios operacionais.

Espécies são consideradas as unidades fundamentais para estudos de ecologia, evolução, sistemática e biologia da conservação (Sites e Marshall 2004). Entretanto, um dos maiores problemas entre os taxonomistas atualmente é a falta de consenso sobre o que é uma espécie. Na literatura, são encontrados mais de 26 conceitos de espécie (Mallet 2005).

Alguns autores (como Sites e Marshall 2004) dividem os conceitos de espécie em primários e secundários. Nesse contexto, os conceitos primários definiriam, teoricamente, as entidades como espécies (por exemplo, o conceito evolutivo de espécie); enquanto que os conceitos secundários tratariam dos métodos operacionais (morfologia, morfometria, cromossomo, sequenciamento de DNA) utilizados para identificar as entidades biológicas de acordo com os conceitos primários.

Mesmo assim, diferentes conjuntos de dados e métodos para delimitação das espécies podem resultar em conclusões ambíguas ou conflitantes (Hey *et al.* 2003; Sites e Marshall 2003) como consequência de múltiplos processos evolutivos que operam dentro e entre populações através de variadas escalas espaço-temporais (Harrison 1998; Lee 2003). A partir dos dados apresentados no presente estudo tem-se a oportunidade de discutir o táxon *Thaptomys nigrita* do ponto de vista de vários critérios operacionais: citogenético, filogenético a partir de sequências de DNA, e morfológico, a partir de dados secundários.

A análise do cariótipo, principalmente se estendida a vários exemplares coletados em diferentes localidades e com o emprego de técnicas diversas de marcação cromossômica, é uma forma de caracterizar uma espécie de forma mais completa do ponto de vista dos seus cromossomos. Com isso, são obtidos conhecimentos sobre a possível ocorrência de diferentes constituições cariotípicas que podem corresponder a casos de polimorfismo cromossômico, a cariótipos espécie-específicos ou representar citótipos distintos restritos a determinadas localidades (Kasahara 2009).

Mallet (1995) propõe outro conceito de espécie baseado em agrupamentos genotípicos (*clusters*) em que “espécies são agrupamentos de entidades biológicas, monotípicas ou politípicas, reconhecidos por meio de dois tipos de conjunto de dados: (1) morfológico (presença ou ausência de características) e (2) genético (aloenzimas, cromossomos, loci, etc)”.

Nesse sentido, em uma interpretação baseada exclusivamente nos dados cariotípicos, seria razoável afirmar que o cromossomo em *Thaptomys* atuaria como barreira pré ou pós-zigótica devido aos rearranjos de fusão cêntrica, em *tandem* e inversão pericêntrica. Assim, nesse cenário hipotético, seriam observados três táxons para o gênero: (I) $2n=52$, $NFa=52$ cariótipo mais frequente, com maior distribuição geográfica e sem nenhum rearranjo; (II) $2n=50$, $NFa=48$, exclusivo de Una-BA, localizado no extremo norte da distribuição para o gênero, em que se observa uma fusão em *tandem* e uma inversão pericêntrica; e (III) $2n=51$, 50 , 49 , e 48 , $NFa=52$, exclusivos de Luminárias-MG, localizados no extremo oeste da distribuição para o gênero, em que são detectadas fusões cêntricas em várias combinações. Como as fusões cêntricas observadas nesse táxon sempre envolvem os mesmos pares cromossômicos para a fusão 1+15, 3+4 ou para ambas e foram observadas em 66% (seis espécimes em nove amostrados) dos espécimes coletados como carioformas heterozigotas, a variação de $2n$ nessa população seria um polimorfismo.

Uma observação interessante em relação à distribuição geográfica dos diferentes cariótipos de *Thaptomys* é que eles nunca foram detectados em simpatria. Esse fato pode refletir apenas um problema amostral. Por outro lado, os diferentes cariótipos parecem estar isolados geograficamente e as populações não estão próximas umas das outras, principalmente no que se refere às formas variantes de $2n=52$. Não há evidências de híbridos entre essas formas $2n=50$ (Bahia), $2n=48-51$ (Minas Gerais) e $2n=52$. Nesse caso, é esperado que não esteja ocorrendo fluxo gênico entre as diferentes carioformas observadas em *Thaptomys*, pois a fixação de um rearranjo cromossômico com alta frequência em uma população acarretaria a separação dessa população em dois subgrupos não intercruzantes (com e sem o rearranjo cromossômico), representando uma barreira ao fluxo gênico (Rieseberg 2001). O modelo de especiação cromossômico peripátrico (Baker e Bickham 1986), por sua vez, leva em consideração aspectos geográficos, no qual populações fundadoras de pequeno tamanho tenderiam a representar espécies distintas, sendo o cromossomo o fator desencadeador do processo de especiação.

Se por um lado o fluxo gênico se torna um fator importante para a definição de uma espécie segundo o CBE, por outro não é possível fazer afirmações sobre fluxo gênico (ou sua ausência) sem avaliar dados sobre a diversidade genética das populações. Em nosso estudo, investigamos a divergência genética das populações e formação de grupos monofiléticos a partir de sequência de DNA do gene citocromo b e IRBP de todas as formas cromossômicas observadas de modo a trazer novos indícios que viessem a contribuir com a identificação de mais de um táxon em *Thaptomys*.

Os métodos cladísticos revolucionaram a sistemática propondo que toda a classificação deve ser baseada na idéia de monofilia. Sendo assim, esse novo sistema propõe que grupos parafiléticos e polifiléticos não são agrupamentos naturais e que não devem ser usados na taxonomia (Mallet 2007). Essa ideia levou à formulação de um critério de monofilia das espécies, o conceito filogenético de Hennig (1966). Nesse caso, espécies são vistas como uma população com indivíduos que se separam em dois ramos ou linhagens que não mais trocam material genético. Em uma formulação um pouco diferente, o conceito cladístico propõe que as espécies são ramos na filogenia com cada evento de ramificação conduzindo a um novo par de espécies (Ridley 1996). Caso contrário, se apenas um dos dois ramos for reconhecido como novo, o outro ramo se torna parafilético (Mallet 2007).

No presente estudo utilizamos a amostra mais completa em uma abordagem cromossômica e molecular em *Thaptomys*, compreendendo 112 espécimes, 25 localidades ao longo de sete dos oito estados brasileiros com ocorrência conhecida para o gênero, até o norte da Argentina, além da localidade tipo, Rio de Janeiro. Em nossas análises filogenéticas nenhum dos sete cariótipos foi recuperado como grupo monofilético. As divergências genéticas entre os cariótipos variaram de 1,2 a 2,2%, o que é comumente encontrado em análises intraespecíficas em mamíferos (Bradley e Baker 2001; Baker e Bradley 2006). Além disso, haplótipos são compartilhados entre indivíduos com $2n=50$ (Bahia), $2n=48-51$ (Minas Gerais), $2n=52$ (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul) e espécimes da Argentina para sequências de IRBP, distantes a cerca de 2.072 km.

Nossos dados foram discordantes do observado por Ventura *et al.* (2010), no qual foram recuperados dois clados congruentes com os cariótipos $2n=50$ (Bahia) e $2n=52$ (Espírito Santo, São Paulo e Paraná) com divergência genética de 1,9% a 3,5%. Nesse estudo os autores sugerem que os espécimes com cariótipo $2n=50$ seria um táxon distinto daquele com $2n=52$. Uma análise comparativa dos dados de Ventura *et al.* (2010) e do presente estudo mostra que no primeiro foram utilizadas 18 sequências (1077 pb) do gene Citocromo b; quatro estados; sete localidades (Una-BA; Santa Teresa e Domingos Martins-ES, Biritiba Mirim, São Bernardo do Campo, Pilar do Sul e Iguape-SP; e Ortigueira-PR); com baixos valores de *bootstrap* para os clados recuperados (96-89% para MP e 61-52% para ML). Assim, atribuímos a formação dos clados como decorrência de uma amostra reduzida e descontínua, com pequena abrangência se comparada à distribuição geográfica para o gênero, o que provavelmente levou à formação desses dois agrupamentos.

Para esclarecer como a composição da amostra pode influenciar a formação dos clados em *Thaptomys*, utilizamos uma sub-amostra dos nossos dados composta por indivíduos com localidades próximas às testadas por Ventura *et al.* (2010) (Figura 14). Essa simulação mostra que o clado com $2n=50$ foi recuperado como monofilético. Segundo essa interpretação, se nossa amostra fosse reduzida, os mesmos grupos obtidos previamente por Ventura *et al.* (2010)

também seriam recuperados. No presente estudo, usando uma amostra mais abrangente, a formação dos clados apresentados em Ventura *et al.* (2010) não é recuperada. Portanto, segundo nossa interpretação, a forma da Bahia com 2n=50 não representa um táxon novo como proposto previamente.

Apesar de alguns pequenos mamíferos apresentarem baixa divergência genética entre suas espécies (Romanenko *et al.* 2012), outros como *Monodelphis domestica* (Duda, 2012) e *Nectomys squamipes* (Almeida *et al.* 2000; 2005) apresentam uma distribuição tão ampla quanto a de *Thaptomys* e níveis de divergência genética baixos entre as populações dos extremos norte e sul das suas distribuições geográficas, variando nos mesmos níveis que os observados aqui em *Thaptomys*.

Sobre os clados observados no presente estudo na árvore de ML obtida a partir das sequências de Citocromo b, o clado Sul teve baixo suporte (74%) e é composto por 29 espécimes de São Paulo (Capão Bonito, Iguape, Ribeirão Grande e Tapiraí), Paraná (Piraquara), Rio Grande do Sul (Maquiné) e Argentina (Arroio Cunã Pirú), dos quais 24 apresentam 2n=52/NFa=52. Foi encontrada baixa divergência genética entre o clado Sul e os demais espécimes, variando de 1,9 a 2,2%. Ventura *et al.* (2010) também recuperaram amostras do sul de São Paulo (Iguape) e Paraná (Ortigueira) com 2n=52/NFa=52 como monofilético, com baixo suporte na análise de ML (71%). Embora esse clado coincida com a distribuição de *T. subterraneus*, espécie sinonimizada com *T. nigrita* por Cabrera (1961), nossos dados não sugerem que esse agrupamento do clado sul represente um outro táxon.

Similarmente, em uma abordagem morfológica e morfométrica, Moreira e Oliveira (2011) utilizaram 379 espécimes de *Thaptomys* de 29 localidades, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul e encontraram uma baixa variação interpopulacional, mostrando divergência morfométrica sutil e não significativa, levantando questões sobre a validade de um novo táxon como proposto por Ventura *et al.* (2010). Entretanto, os autores afirmam que os dados não dão suporte para sugerir um táxon novo em *Thaptomys*. Além disso, mesmo com um intervalo amostral de 540 km entre as amostras da Bahia e o ponto mais ao norte amostrado, Santa Teresa-ES, os autores observaram que, a partir das análises de UPGMA e *Neighbor-Joining*, amostras de São Paulo (Iguape e Biritiba-Mirim) ficaram agrupadas com amostras da Bahia (Una). Assim, as diferenças encontradas não representariam uma descontinuidade em *Thaptomys*, ou seja, que as amostras da Bahia não representariam outro táxon, mas sim um artefato da amostragem geográfica desigual.

Diante da falta de apoio estatístico nos padrões de divergências morfométricas, juntamente com as evidências citogenéticas e moleculares, em que não há evidências de descontinuidade genética entre populações com diferentes carioformas, que nenhum dos cariótipos foi recuperado como grupo monofilético; que há baixa divergência genética entre

indivíduos com cariótipos distintos; que as formas cariotípicas variantes são derivadas de $2n=52$, propomos que *Thaptomys* permaneça monotípico, sendo representado por *T. nigrita*.

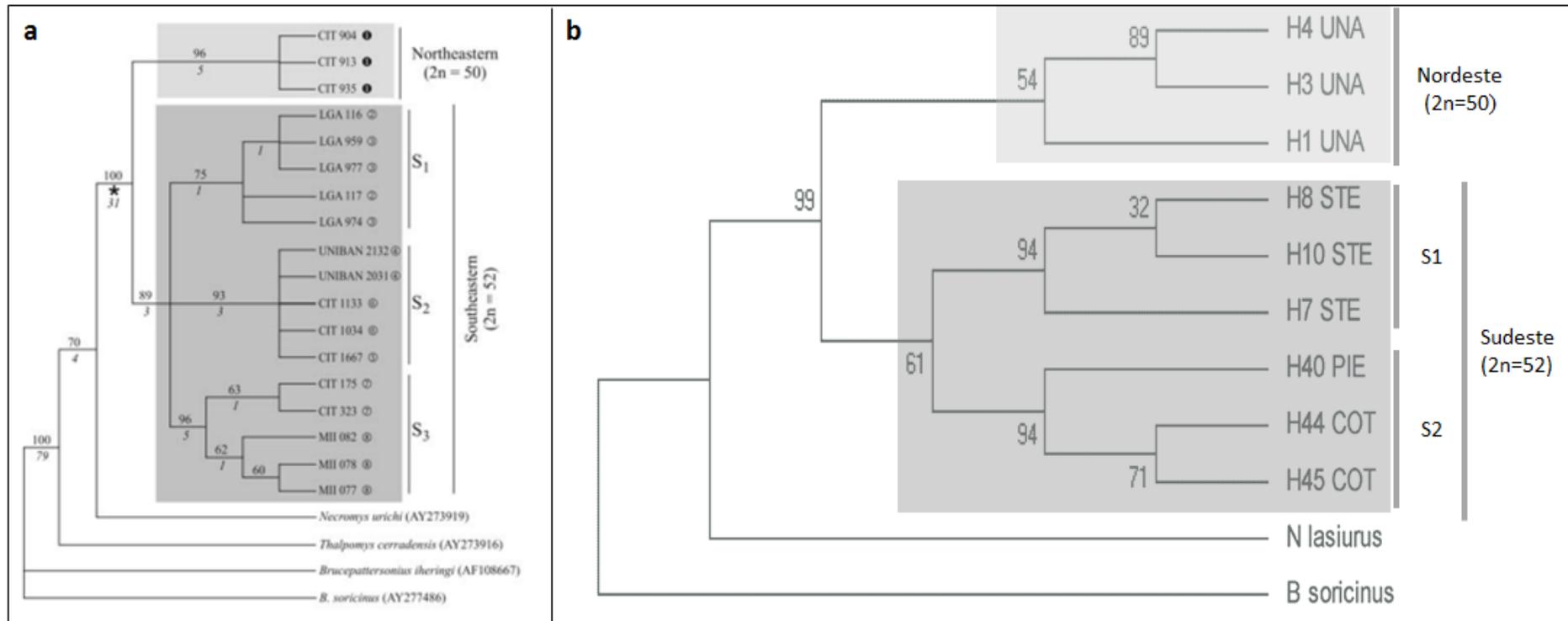


Figura 14. Árvores Filogenéticas de Máxima Parcimônia com 1000 replicações do gene Citocromo b em que foi possível recuperar os clados Nordeste, correspondente ao 2n=50 da Bahia, e Sudeste, representado por amostras com 2n=52. **a.** Árvore retirada de Ventura *et al.* (2010). **b.** Árvore gerada a partir de uma sub-amostra do presente estudo mostrando que os dados de Ventura *et al.* (2010) estão influenciados pela pequena amostragem.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida FC, Moreria MAM, Bonvicino CR e Cerqueira R (2000) RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. *Genetics and Molecular Biology* 23(4):793-797.
- Almeida FC, Maroja LS, Moreira MAM, Seuánez HN e Cerqueira R (2005) Population structure and genetic variability of mainland and insular populations of the Neotropical water rat, *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae). *Genetics and Molecular Biology* 28(4):693-699.
- Baker RJ e Bickham JW (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (21):8245-8
- Baker RJ e Bradley RD (2006) Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of Mammalogy* 87(4):643-662.
- Bonvicino CR, Oliveira JA e Gentile R (2010) A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Eastern Brazil. *Zootaxa* 2336:19-25.
- Bradley RD e Baker RJ (2001) A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-b sequences and mammals. *J Mammal* 82:960-973.
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and DNA fingerprinting In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach. Oxford: IRL Press.* p.225–269.
- Cabrera A (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia, *Ciências Zoológicas* 4:309–327.
- Costa LP, Pavan SE, Leite YLR and Fagundes V (2007) A new species of *Juliomys* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from the Atlantic forest of southeastern Brazil. *Zootaxa* 1463:21-37.
- Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection & c.*, John Murray.
- Darwin C (1871) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*, John Murray.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the Origin of Species*, Columbia University Press.
- Dobzhansky T (1951) *Genetics and the origin of species* (3rd ed). New York: Columbia University Press.
- Duda RC (2012) Padrões de variação genética e morfológica em *Monodelphis* de listras (Marsupialia: Didelphidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- Ellerman JR (1941) *The families and genera of living rodents II. Family Muridae*. London, British Museum Natural History, 690pp.

- Fagundes V (1993) Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V (1997) Contribuição da Citogenética Molecular no entendimento da evolução cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V, Christoff AU e Yonenaga-Yassuda Y (1998) Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the Neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ($2n = 16, 15$ And 14). *Hereditas* 129:263-274.
- Fagundes V e Yonenaga-Yassuda Y (1998) Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Research* 6:643-648.
- Fagundes V, Sato Y, Silva MJ, Rodrigues F e Yonenaga-Yassuda Y (2000) A new species of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Central Brazil identified by its karyotype. *Hereditas* 133(3):195-200.
- Faria R e Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology & Evolution* 25 (11): 660-669.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W e 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.
- Gylsdenstolpe N (1932) A manual of neotropical sigmodont rodents. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 11(3):1-164.
- Harrison RG (1998) Linking evolutionary pattern and process. The relevance of species concepts for the study of speciation. In *Endless Forms. Species and Speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, Eds.), pp. 19–31. Oxford University Press, New York.
- Hennig W (1966) *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois. Press Urbana.
- Hensel R (1873) Beiträge zur Kenntniss der Säugethiere Süd-Brasiliens. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 1872:1-130.
- Hershkovitz P (1990) Mice of the *Akodon boliviensis* group size class (Sigmodontinae, Cricetidae), with the description of two new species from Brazil. *Fieldiana Zoology*, New Series 57:1-35.
- Hershkovitz P (1998) Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoolische Beiträge* 47:193-256.

- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK e Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 18:597–603.
- Huelsenbeck JP e Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Applications Note* 17:754-755.
- Kasahara S (2009) Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Ed. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, p.160.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- King M (1993) Species Evolution: The Role of Chromosome Changes. Cambridge, Cambridge University Press.
- Lee MSY (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.* 16:179–88.
- Librado P e Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lichtenstein H (1829) Darstellung neuer oder wenig bekannter Säugethiere in Abhandlungen und Beschreiben von 65 Arten auf 50 color Steintafeln nach den Originalen. Zoologische Museum der Universität zu Berlin, 10 Heften.
- Maia V e Hulak A (1981) Robertsonian polymorphism in chromosomes of *Oryzomys subflavus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 31:33-39.
- Mallet J (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 294–99.
- Mallet J (2007) Concepts of Species. *Encyclopedia of Biodiversity* 2:1-19.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. New York: Columbia University Press.
- Mayr E (1970) Population, species, and evolution: An abridgment of animal species and evolution. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press.
- Moreira JC e Oliveira JA (2011) Evaluating diversification hypotheses in the South American cricetid *Thaptomys nigrita* (Lichtenstein, 1829) (Rodentia: Sigmodontinae): an appraisal of geographical variation based on different character systems. *J Mamm Evol* 18(3):201-214.
- Musser GG e Carleton MD (2005) Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference (D.E. Wilson e D.M. Reeder, eds), Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Paresque R (2001) Estudos citogenéticos em marsupiais e roedores da Mata Atlântica, município de Santa Teresa, ES. Monografia. Monografia de Graduação. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

- Paresque R, Souza WP, Mendes SL e Fagundes V (2004) Composição cariotípica de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 5-35.
- Paresque R, Christoff AU e Fagundes V (2009) Karyology of the Atlantic forest rodent *Juliomys* (Cricetidae): A new karyotype from southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 32(2):301-305.
- Paresque R (2010) Diversificação das espécies do gênero *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Cricetidae) na região Neotropical. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Patton J e Sherwood SW (1983) Chromosome Evolution and Speciation in Rodents. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14:139-58.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253-1256.
- Reig OA (1987) An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Fieldiana Zoologic* 39:347-99.
- Ridley M (1996) Evolution. Blackwell Science, Oxford.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16:351-358.
- Romanenko SA, Perelman PL, Trifonov VA e Graphodatsky AS (2012) Chromosomal evolution in Rodentia. *Heredity* 108:4-16.
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, London 1:971-972.
- Sites JW Jr e Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol* 18:462-70.
- Sites JW Jr e Marshall JC (2004) Operational Criteria for Delimiting Species. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 35:199-227.
- Smith MF e Patton JL (1993) Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biol J Linn Soc Lond* 50:149-177.
- Smith MF e Patton JL (1999) Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J Mamm Evol* 6:89-128.
- Sokal RR e Crovello TJ (1970) The biological species concept: A critical evaluation. *Am. Nat.* 104:107-123.
- Souza MJ (1981) Caracterização cromossômica em oito espécies de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

- Stanhope MJ, Czelusniak J, Si JS, Nickerson J e Goodman M (1992) A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1:148–160.
- Sumner A (1972) A simple technique for demonstrating heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304–306.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M e Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Thomas O (1916) The grouping of the South-American Muridae commonly referred to *Akodon*. *J. Nat. Hist* 8(18):336-340.
- Trouessart EL (1898) *Catalogus mammalium tam viventium quam fossilium*. [Catalogue des mammifères vivants et fossiles. Catalogue of the living and fossil mammals]. *Nova editio* 8:665-1264.
- Ventura K, Silva MJJ, Pardini R e Yonenaga-Yassuda Y (2004) An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n=50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n=52) evidenced by FISH and Ag-NORs. *Caryologia* 57:89–97.
- Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y. e Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17:1063-1078.
- Ventura K, de Silva MJJ e Yonenaga-Yassuda Y (2010) *Thaptomys* Thomas 1915 (Rodentia, Sigmodontinae, Akodontini) with karyotypes 2n=50, FN=48 and 2n=52, FN=52: Two monophyletic lineages recovered by molecular phylogeny. *Genet Mol Biol* 33:256–261.
- Ventura K, Fagundes V, D'Elia G, Christoff AU e Yonenaga-Yassuda Y (2011) A new allopatric lineage of the rodent *Deltamys* (Rodentia: Sigmodontinae) and the chromosomal evolution in *Deltamys kempi* and *Deltamys* sp. *Cytogenetic and Genome Research* 135(2):126-34.
- Wallace AR (1865) On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidae of the Malayan region. *Trans. Linn. Soc. Lond* 25:1–71.
- Yang F, Carter NP, Shi L e Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103:642–652.
- Yonenaga Y (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia* 28:269-286.

VI. APÊNDICE

PAÍS - ESTADO: Município (coordenada geográfica): localidade: número de identificação do exemplar (haplótipo citocromo b; haplótipo IRBP).

Siglas referentes às coleções ou coletores: AC: Alexandre Christoff, LGA: Laboratório de Genética Animal, UFES; MN: Museu Nacional, UFRJ; UFMG: Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, ICB, UFMG; HGB: Helena de Godoy Bergallo; JAO: João Alves Oliveira; RP: Renata Pardini; UP: Ulyses Pardinãs.

BRASIL – BAHIA: Una (15°18'S; 39°04'W): Fazenda Jueirana: UFMG 2017 (C4;I2), UFMG 2018 (C3;I9), UFMG 2180 (C2;I2), UFMG 2181 (C3;I2); Reserva Biológica de Una: UFMG 2019 (C1;I2), CIT 0935 (C1;I2); Fazenda Bolandeira: UFMG 2020 (C5;I8). **ESPÍRITO SANTO: Santa Teresa** (19°55'S, 40°36'W): Estação Biológica de Santa Lúcia: LGA 76 (C6;I2), LGA 77 (C7;I2), LGA 81 (C7), LGA 83 (C8;I2), LGA 93 (C7;I2), LGA 94 (C7;I2), LGA 98 (C9;I2), LGA 102 (C6;I2), LGA 103 (C10;I2), LGA 105 (C9;I2), LGA 111 (C7), LGA 116 (C9;I2), LGA 117 (C11;I2), LGA 127 (C12;I2), LGA 703 (C6;I2), LGA 997 (C11;I5), LGA 2943 (C20;I2), MBML 2288 (C21;I2), MBML 2337 (C11); **Domingos Martins** (20°22'S, 40°40'W): Parque Estadual Pedra Azul: LGA 958 (C13;I2), LGA 959 (C14;I2), LGA 974 (C15), LGA 977 (C9;I2); **Castelo** (20°36'13"S, 41°11'05"W): Fazenda Forno Grande: MBML 2650 (C22;I2); **Dores do Rio Preto** (20°28'S, 41°49'W): Parque Nacional do Caparaó: LGA 1376 (C16;I2), LGA 1486 (C6;I2), LGA 1491 (C17;I3), LGA 1632 (C18;I2), LGA 1635 (C9;I2), LGA 1652 (C19;I2). **MINAS GERAIS: Delfim Moreira** (22°30'S, 45°17'W): Fazenda da Onça: UFMG 1839 (C11); **Passa Quatro** (22°24'S, 44°59'W): Fazenda do Itaguare: UFMG 1838 (C34;I2); **Ouro Preto** (20°18'S, 43°31'W): UFMG 1851 (C28); **Fervedouro** (20°43'S, 42°28'W): Fazenda Neblina: UFMG 1841 (C15;I2), UFMG 1843 (C11), UFMG 1847 (C11;I2), UFMG 1848 (C26), UFMG 1849 (C27;I2), UFMG 1850 (C26;I2); **Monte Verde** (19°53'S, 41°57'W): EF 206815 (C6); **Luminárias** (21°34'12"S, 44°47'24"W): Fazenda Pedra do Navio: LGA 3065 (C29), LGA 3066 (C30), LGA 3067 (C29;I2), LGA 3819 (C31), LGA 3821 (C30;I2), LGA 3825 (C32), LGA 3827 (C32;I15), LGA 3830, LGA 3836 (C30;I15), MP 594 (C29;I2), MP 611 (C29), MP 619 (C29;I7), MP 626 (C29), MP 627 (C29), MP 629 (C29), MP 630 (C29;I2), MP 631 (C25), MP 632 (C29;I2); **Itamonte** (22°09'S, 44°44'24"W): Serra do Papagaio: MP 474 (C32;I2), MP 496 (C34;I6), MP 508 (C30). **RIO DE JANEIRO: Itatiaia** (22°23'S, 44°43'W): Parque Nacional de Itatiaia: MN 48074 (C23), HGB 385 (C24;I2). **SÃO PAULO: São João da Boa Vista** (21°58'S, 46°47'W): Fazenda Santa Tereza: HGB DB 05 (C35;I13); **Ibiúna** (23°37'S, 46°56'W): Reserva de Morro Grande: RP 66 (C34), RP 193

(C27); **Iguape** (24°43'S, 47°33'W): CIT 204 (C43), CIT 260 (C36;I3), CIT 261 (C39;I4), CIT 320 (C39;I10), CIT 324 (C39;I11), CIT 325 (C36), CIT 330 (C36;I1); **Piedade** (23°49'48"S, 47°27'W): AB_276 (C30), AB_274 (C40); **Tapiraí** (23°54'36"S, 47°27'W): AB_194 (C32;I2), AB_214 (C32), AB_185 (C37;I2) AB_209 (C38) AB_236 (C39); **Ribeirão Grande** (22°10'48"S, 48°46'12"W): RP_155 (C32), AB_577 (C41) AB_744 (C42); **Cotia** (23°45'S, 47°W): B_302 (C32), B_712 (C34) B_789 (C34) B_355 (C44) B_716 (C45); **Capão Bonito** (24°10'12"S, 48°14'24"W): AB_127 (C36;I1); **Boracéia** (24°04'48"S, 48°22'12"W): AF 108666 (C53). **PARANÁ: Piraquara** (25°21'S, 49°04'W): Mananciais da Serra: JAO 1020 (C46), JAO 1021 (C47;I2), JAO 1024 (C39;I12), JAO 1563 (C39;I2), JAO 1573 (C48;I3), JAO 1575 (C48;I2). **RIO GRANDE DO SUL: Maquiné** (29°40'S, 50°34'W): AC 662 (C49) AC 666 (C50), AC 684 (C49), AC 675 (C51), AC 679 (C50;I14), AC 680 (C49), AC 685 (C49), LGA 323 (C49). **ARGENTINA – MISIONES: Valle del Arroyo Cunã Pirú** (27°05'S, 54°57'W): Reserva Privada de la UNLP: UP 735 (C39;I2), UP 736 (C52;I2).