

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

**ESPECIAÇÃO EM *AKODON CURSOR* (WINGE, 1887): UMA
ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**

Cristina Dornelas de Andrade Nogueira Massariol

Vitória, ES
Maio, 2016

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

**ESPECIAÇÃO EM *AKODON CURSOR* (WINGE, 1887):
UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**

Cristina Dornelas de Andrade Nogueira Massariol

**Orientadora: Valéria Fagundes
Co-orientadora: Roberta Paresque**

**Tese 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 Doutor
em Biologia Animal.**

**Vitória, ES
Maio, 2016**

Àqueles que ao meu lado vêm caminhando ao longo da vida...

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

(Clarice Lispector)



Akodon cursor

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

M414e Massariol, Cristina Dornelas de Andrade Nogueira, 1979-
Especiação em *Akodon cursor* (Winge, 1887) : uma
abordagem multidisciplinar / Cristina Dornelas de Andrade
Nogueira Massariol. – 2016.
205 f. : il.

Orientador: Valéria Fagundes.

Coorientador: Roberta Paresque.

Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. *Akodon cursor*. 2. Filogeografia. 3. Cariótipos. 4.
Cruzamento (Genética). 5. Hibridação. I. Fagundes, Valéria. II.
Paresque, Roberta. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dr^a Valéria Fagundes, por me confiar a oportunidade de trabalhar com *Akodon cursor*, “a menina dos olhos” de seus estudos anteriores... pude dar continuidade e tentei responder grandes questionamentos que vinham se acumulando ao longo de sua vida acadêmica. Obrigada pela confiança e por todos os esforços para que meu projeto, tão dispendioso e laboroso, se tornasse viável e alcançasse uma abrangência muito além da que imaginávamos originalmente. Sinto-me também imensamente agradecida por ter-te como amiga! Obrigada por ser para mim um referencial de caráter, dedicação, superação e eficiência, sempre comprometida com os que te rodeiam e com a produção de trabalhos de qualidade... sua presença forte que, por vezes, tanto assusta é também o impulso para sairmos da inércia e alcançarmos ir mais longe. Obrigada Val!

Àquela que um dia foi minha companheira de laboratório, Dr^a Roberta Paresque (UFES), e que agora segue uma carreira profissional ascendente com várias vertentes de atuação, obrigada pela sua amizade e por ser co-participante nesse projeto em tantos aspectos: por ir a campo comigo ou em meu lugar, por intermediar os contatos com profissionais de outras áreas e com os quais estabelecemos parcerias essenciais para a qualidade desse trabalho, pelo apoio na análise dos dados e pelas revisões e sugestões no texto final. Muito obrigada Ro, seguramente eu posso dizer que a sua participação foi essencial e expressiva em meu projeto!

Este trabalho não teria o considerável impacto pela análise molecular de 402 indivíduos de 63 localidades brasileiras se não fosse pela participação e colaboração de muitos pesquisadores: Dr^a Yatiyo Yonenaga-Yassuda e Renata Pardini (USP), Dr^a Lena Geise (UERJ), Dr^a. Leonora Pires Costa (UFES), Dr. Yuri Luiz Reis Leite (UFES), Dra Raquel Teixeira Moura (UFMG), Ms. Cláudia Costa (PUCMG). A todos, meu reconhecimento e agradecimento.

Aos pesquisadores que há tempos vêm trabalhando com a problemática em *A. cursor*, quero agradecer imensamente, de modo especial pelo precioso material que disponibilizaram na literatura e principalmente por aqueles dados ainda não publicados que a mim coube a tarefa de finalizar as análises.

Sou imensamente grata a todos os profissionais que de forma tão eficaz e direta contribuíram para a obtenção de espécimes, o apoio para a implantação e funcionamento da

Sala de Experimentação Animal do Laboratório de Genética Animal (LGA-UFES), a geração e interpretação de dados: Dr^a Juliana Monteiro (UFES), Dr^a Livia Melo Rodrigues (UFES), Dr. Leandro Abreu da Fonseca (UFV), Dr^a Ana Carolina Loss (UFES), MSc Jerônimo Dalapicolla (UFES) e MSc. Victor Vale (UFES), Max Dantas (UFES) e Mateus Loss (UFES). Agradeço também aos servidores da UFES que me deram todo o suporte técnico e/ou administrativo: Juliana de Freitas Justino, Ariel Sessa, Rondnelly Leite Marques, Monique Nascimento e Rodolfo Barros.

Agradeço aos financiadores do presente estudo, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Doutorado e da taxa de bancada e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento dos projetos de pesquisa coordenados pelos pesquisadores Dr. Yuri Luiz Reis Leite, Dr^a Leonora Pires Costa, Dr. Celso Oliveira Azevedo, Dr. Marcelo Teixeira Tavares e Dr^a Roberta Paresque.

Agradeço também aos gestores e responsáveis pela RPPN Nova Angélica (Una-BA), Ecoparque de Una (Una-BA) e APA Cananéia-Iguape-Peruíbe (Iguape-SP) por nos receberem para a realização das coletas.

Àqueles que, ao assumirem o cargo de bolsistas de apoio técnico, o fizeram com zelo, responsabilidade e respeito aos procedimentos e nos cuidados e manutenção dos animais da Sala de Experimentação Animal, atividades laboratoriais, nas excursões a campo: MSc. Lucas Alves Vianna, MSc. Renan Vasconcelos Santos, Marina Monjardim, Kézia Araújo Porfírio, MSc. Fernanda Couto Zaidan, Débora De’Nadai Dalvi, Gabriel Bautz Dalbem e Iago Ornellas. Ao MSc. Victor Vale (PPGBAN-UFES) e à equipe da disciplina Zoologia de Campo pela imensa ajuda em trazer animais vivos que auxiliaram a completar nossa amostra de estudo.

Ao Diretor Geral do IFES – *campus* Vitória, Ricardo Paiva, agradeço pelo apoio para meu afastamento das atividades docentes nos últimos dois anos; à minha coordenadora do IFES, Edy Maria de Almeida, por todo apoio, carinho e amizade que garantiram que completasse o meu Doutorado com tranquilidade; e a todos os colegas da Coordenadoria de Química e Biologia, pela compreensão e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Genética Animal (LGA-UFES) com quem convivi ao longo da realização desse trabalho: Ana Heloísa Carvalho, Arturo Benincá Martinelli, Eduardo

Loyola Muhl, Daniele Angeli, Lorena Dinelli, Mariana Azevedo, Marianna Xavier Machado, Thaís Volpi, Yuri Marins, que colaborativamente participaram de uma ou várias dessas tarefas: coleta de espécimes, análise dos dados moleculares, cuidados com os animais, implementação da técnica de cultivo celular e preparações citogenéticas. De modo muito especial, quero enfatizar a ajuda prestada pelo Victor Hugo Colombi, Fernanda Couto Zaidan e Débora De’Nadai Dalvi, pois decididamente fizeram toda a diferença na conclusão desse trabalho ao me ajudarem com as análises moleculares e citogenéticas, ao assumirem com responsabilidade as demandas da Sala de Animais enquanto me dedicava à escrita da tese e pelas sugestões no texto final: minha gratidão e eterna disponibilidade à vocês! Agradeço ainda à Rosana Nunes, pelos 15 anos de uma amizade que começou no laboratório e se fortaleceu também fora dele... Obrigada por me lembrar dos procedimentos laboratoriais depois de 5 anos em que estive afastada da “bancada”, pela paciência, pela presença leve e insubstituível... Obrigada Ro, sob sua ótica tudo parecia ser mais simples e tangível!!

Agradeço aos meus pais e irmãos pelos esforços para que um dia eu saísse do interior, buscasse um ensino médio mais robusto e me tornasse apta a cursar o ensino superior em uma instituição pública: quanta dedicação e zelo comigo! Também à família do meu esposo, por aqui me acolherem!!! Reconheço a ajuda e incentivo que todos me prestaram ao longo da minha formação e por todo cuidado e atenção com Davi nos momentos de “aperto”... amo vocês!!

À família que formei, Thiago, meu esposo e Davi, nosso filho... foram quase cinco anos em que pude perceber toda a abrangência do amor!!! Davi, minha maior riqueza, desde tão pequeno já me via às voltas com o Doutorado... obrigada meu amor por entender minhas ausências, cobrar e incentivar que eu focasse “para acabar logo”, por ter paciência comigo e por sempre me aconchegar quando percebia meu cansaço ou abatimento... te amo filho!!! Thi, você me ajudando em coisas práticas, no cuidado dos animais vivos, consertando o computador e instalando programas quando eu mais precisava ou estava além do meu conhecimento, recuperando arquivos, me fazendo companhia nas muitas noites que passei em claro envolvida nas demandas do projeto, suportando tantas ausências nas idas a campo, sendo paciente e presente, e tantas outras coisas... como você costuma dizer, você também se torna doutor comigo, mas da arte de amar e acolher, esperar e acreditar... amo você!!! A nós três cabe agora desfrutar a presente conquista, que não é só minha, mas nossa!!!

SUMÁRIO

Resumo	11
Abstract	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Figuras	19
Lista de Abreviações	23
Apresentação	24
Capítulo 1 – Quebra filogeográfica em <i>Akodon cursor</i> mantida pelo Vale do Jequitinhonha	26
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Materiais e Métodos.....	30
Resultados.....	34
Discussão.....	42
Referências bibliográficas.....	50
Capítulo 2 – Cruamentos experimentais não demonstram isolamento reprodutivo em populações de <i>Akodon cursor</i> separadas por quebra filogeográfica	56
Resumo.....	57
Introdução.....	59
Materiais e Métodos.....	61
Resultados.....	65
Discussão.....	81
Referências bibliográficas.....	86
Capítulo 3 – Biologia reprodutiva de <i>Akodon cursor</i>	91
Resumo.....	92
Introdução.....	93
Materiais e Métodos.....	95
Resultados.....	97
Discussão.....	107
Referências bibliográficas.....	111

Capítulo 4 – Variação intraespecífica em <i>Akodon cursor</i> investigada à luz do padrão reprodutivo de híbridos entre <i>A. cursor</i> e <i>Akodon montensis</i>	115
Resumo.....	116
Introdução.....	118
Materiais e Métodos.....	119
Resultados.....	122
Discussão.....	132
Referências bibliográficas.....	137
Capítulo 5 – Revisitando <i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887): Uma abordagem multidisciplinar	140
Resumo.....	141
Introdução.....	143
Materiais e Métodos.....	145
Resultados.....	149
Discussão.....	157
Referências bibliográficas.....	172
Conclusão	180
Anexos	182

RESUMO

Akodon cursor (Winge, 1887) é um roedor Sigmodontinae que se distribui ao longo da costa Atlântica brasileira e apresenta elevado polimorfismo cromossômico ($2n=14-16$ e $NF=18-26$), com 31 cariótipos distintos já descritos para a espécie. Sequências gênicas de 402 indivíduos e 63 localidades reiteram a estruturação geográfica de *A. cursor* em clados Norte e Sul, com divergência genética de 4,4% para COI e de 2,5% para *Cit-b*. A quebra filogeográfica está localizada entre as latitudes 16-18°S (norte de Minas Gerais e sul da Bahia), coincidente com o Vale do Jequitinhonha. A formação dos clados não está relacionada a cariótipos exclusivos. No entanto, a forma $2n=16$ é mais frequente ao Norte e a forma $2n=14$ ao Sul. Dados demográficos indicam contribuição cariotípica na diversificação geográfica, com equilíbrio populacional ao Norte e duas populações distintas e estáveis ao Sul. Cruzamentos experimentais ($n=185$) envolvendo espécimes de *A. cursor* com condições geográficas (interclado) e cariotípicas ($2n=15$) intermediárias não indicam isolamento reprodutivo entre os clados Norte e Sul (sucesso reprodutivo acima de 80%), mas evidenciam redução de fertilidade em indivíduos $2n=15$. As combinações (fêmea x macho) $2n=14 \times 2n=15$ e $2n=15 \times 2n=16$ foram as que, respectivamente, apresentaram maior e menor sucesso reprodutivo, refletindo maior afinidade entre as formas $2n=15$ e $2n=14$ e revelando que fêmeas $2n=15$ apresentam prejuízo reprodutivo em comparação aos machos na mesma condição heterozigota. Além disso, em espécimes com mesmo número diploide, indivíduos capturados na natureza apresentam maior sucesso reprodutivo que os nascidos em cativeiro. Casos de agressividade entre os casais foram registrados, sendo mais frequente no clado Sul. Há distinção morfológica/anatômica entre indivíduos dos clados Norte e Sul, em concordância com o padrão geográfico obtido em análises moleculares. Embora o uso de critérios morfológicos e de monofilia recíproca apontem distinção entre os clados Norte e Sul, não há sinais de isolamento reprodutivo entre essas populações. A redução de fertilidade de indivíduos $2n=15$ indica um processo incipiente de especiação estasipátrica, com tendência ao estabelecimento da forma $2n=16$ ao Norte e da forma $2n=14$ ao Sul. Cruzamentos interespecíficos ($n=80$) entre *A. cursor* e *A. montensis* ($2n=23-25$) Thomas, 1913 geraram híbridos ($2n=19-20$) estéreis, ao contrário do observado entre os supostos “híbridos” de *A. cursor*, $2n=15$ e interclado. Nesses casos, a introgressão é bidirecional, muito embora o maior sucesso reprodutivo (75%) tenha ocorrido entre fêmea de *A. montensis* $2n=24$ e macho de *A. cursor* $2n=16$ (clado Norte). As formas cariotípicas que não geraram híbridos em *A. montensis* foram $2n=23$ (fêmea) e $2n=25$ (fêmea e macho) e em *A.*

cursor apenas $2n=15$ (fêmea). Sendo $2n=14$ a condição derivada em *A. cursor* e a mais frequente nas populações do clado Sul (onde ocorre simpatria com *A. montensis*), tem-se uma barreira ao fluxo gênico mais efetiva nessas áreas, com o cariótipo exercendo importante papel na manutenção da identidade de cada espécie.

Palavras-chave: *Akodon cursor*, filogeografia, cariótipo, cruzamentos experimentais, híbridos, *Akodon montensis*.

ABSTRACT

Akodon cursor (Winge, 1887) is a Sigmodontinae rodent that lives in the Atlantic Forest of Brazil and presents high chromosomal polymorphism ($2n=14-16$ and $NF=18-26$), with 31 distinct karyotypes described for this species up to now. Gene sequences of 402 individuals and 63 localities reiterate the geographic structure of *A. cursor* in North and South clades, with genetic divergence of 4.4% for COI and 2.5% for *Cit-b*. The phylogeographic break is localized between latitudes 16-18°S (north Minas Gerais and southern Bahia), coinciding with the Jequitinhonha Valley. The structure of the clades is not related to exclusive karyotypes. However, the form $2n=16$ is more frequent in the North and the form $2n=14$ in the South. Demographic data indicate karyotype contribution on geographic diversification, with populational equilibrium in the North and two distinct and stable populations in the South. Experimental crosses ($n=185$) involving specimens of *A. cursor* with intermediate conditions of geographical distribution (interclades) and karyotype ($2n=15$), do not indicate reproductive isolation between the Northern clades and Southern clades (reproductive success above 80%), but show reduced fertility in individuals $2n=15$. Combinations (female x male) $2n=14 \times 2n=15$ and $2n=15 \times 2n=16$ show, respectively, higher and lower reproductive success, thus reflecting higher affinity between the forms $2n=15$ and $2n=14$, and revealing that females $2n=15$ present reproductive disadvantages when compared to males in the same heterozygous condition. Moreover, in specimens with the same diploid number, individuals captured from nature present higher reproductive success than those born in captivity. Aggressive behavior among couples were registered, being more frequent in the Southern clade. There are morphological/anatomical distinctions between individuals of the Northern and Southern clades, in agreement with the geographical pattern obtained in molecular analysis. Thus, although the use of morphological criteria and reciprocal monophyly points to distinctions between Northern and Southern clades showing no signals of reproductive isolation between these populations is noticeable. The fertility reduction of individuals $2n=15$ indicates an incipient process of stasipatric speciation, tending to establish the form $2n=16$ in the North and the form $2n=14$ in the South. Interspecific crosses ($n=80$) between *A. cursor* and *A. montensis* ($2n=23-25$) Thomas 1913 produces sterile hybrids ($2n=19-20$), unlike observed among supposed *A. cursor* "hybrid", $2n=15$ and interclade. In these cases, the introgression is bidirectional, although a higher reproductive success (75%) occurred between female of *A. montensis* $2n=24$ and male of *A. cursor* $2n=16$ (North clade). *A. montensis* with $2n=23$

(female), $2n=25$ (female and male), and *A. cursor* with $2n=15$ (female) don't generate hybrids. Considering that $2n=14$ is a derived condition in *A. cursor*, and the most frequent in populations of the South clade (which occurs with sympatry with *A. montensis*), there exists a barrier to a more effective gene flow in these areas, with karyotype showing an important role in maintaining the identity of each species.

Key words: *Akodon cursor*, phylogeography, karyotype, experimental crossbreeding, hybrids, *Akodon montensis*.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Distância genética (em porcentagem) intra e interclado em <i>A. cursor</i> calculada para os genes COI e <i>Cit-b</i> considerando os clados Norte e Sul. Em negrito a distância dentro de cada agrupamento.....	36
Tabela 1.2 – Variações genéticas de <i>Cit-b</i> e COI em <i>A. cursor</i> . Índices de diversidade molecular: número de indivíduos amostrados (n), número de haplótipos (H), número de haplótipos exclusivos (He), número de sítios polimórficos (s), diversidade haplotípica (dH) e diversidade nucleotídica (π).....	39
Tabela 1.3 - Análise de variância molecular (AMOVA) em <i>A. cursor</i> , considerando os agrupamentos recuperados na análise filogenética. Porcentagem de variação entre grupos (EG), entre populações dentro dos grupos (EPDG) e dentro das populações (DP). Valores calculados para o gene <i>Cit b</i> (superior) e COI (inferior, em negrito).....	40
Tabela 1.4 - Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 , τ , soma de desvios dos quadrados (SSD) e índice R de Harpending (Hr) obtidos através da análise de distribuição <i>mismatch</i> e os valores de F_s de Fu (F_s) e D de Tajima (D) para as populações recuperadas nas análises filogenéticas. Em negrito valor significativo de p-valor < 0,005.....	40
Tabela 2.1. Número de cruzamentos realizados em <i>Akodon cursor</i> , considerando a origem do parental e cariótipos (2n=14, 15 e 16). Em vermelho, cruzamentos intraclados entre indivíduos de mesmo 2n; em cinza, cruzamentos intraclados entre indivíduos de 2n diferente e em branco, cruzamentos entre indivíduos de clados distintos.....	64
Tabela 2.2 – Número de indivíduos matriz, descendentes gerados em cativeiro e número de parentais envolvidos nos cruzamentos considerando clado de origem (Norte, Sul e Interclado) e número diploide (2n). ND=número diploide não determinado.....	66
Tabela 2.3 – Proporção de descendentes considerando a segregação dos cromossomos 1, 3 e 1+3 conforme clado de origem (Norte, Sul e Interclado) e número diploide (2n) dos parentais. ND=número diploide não determinado.....	67
Tabela 2.4 – Proporção de descendentes considerando a segregação dos cromossomos 2 e 4 em cruzamentos organizados por clado de origem e número diploide (2n) dos parentais. A=par de cromossomos acrocêntricos; S=par de cromossomos	

submetacêntricos; M=par de cromossomos metacêntricos; H=par heteromórfico, formado por um cromossomo acrocêntrico e outro metacêntrico ou submetacêntrico.....	68
Tabela 2.5 – Sucesso Reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) de indivíduos matriz (M) e de descendentes gerados em cativoiro (F ₁ , F ₂ , F ₃) com 2n=14 que participaram como parentais de cruzamentos intr <u>A</u> clado (A) e int <u>E</u> rclado (E).....	69
Tabela 2.6 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) entre matriz e gerações de descendentes de cruzamentos intraclado Norte e intraclado Sul.....	70
Tabela 2.7 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em grupos de cruzamentos interclado levando-se em consideração a origem dos parentais.....	72
Tabela 2.8 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em grupos de cruzamentos interclado.....	73
Tabela 2.9 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) estimados a partir de cruzamentos experimentais considerando o cariótipo (C) dos parentais (2n=14, 15 e 16) e o clado de origem dos mesmos (N=Norte; S=Sul; E=Inteclado).....	74
Tabela 2.10 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em cruzamentos intra e interclado envolvendo apenas parentais 2n=14.....	76
Tabela 2.11 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) de cruzamentos em que pelo menos um dos parentais apresentou 2n=15.....	77
Tabela 2.12 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) visando identificar a relação de fertilidade em exemplares 2n=15 quando estão presentes no macho ou na fêmea.....	79
Tabela 2.13 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) entre cruzamentos em que ambos parentais possuem o mesmo 2n (2n=14 x 2n=14, 2n=15 x 2n=15) e em que possuem 2n diferente.....	80
Tabela 3.1 - Grupos de cruzamentos envolvendo parentais com diferentes número diploide (2n) e origem (Norte e Sul).....	97

Tabela 3.2 – Número total de descendentes dos cruzamentos experimentais (n) gerados em cativeiro, com respectivo clado de origem e número diploide (2n) e número de descendentes que participaram de cruzamentos experimentais até Agosto/2015 (n ^c). ND=2n não determinado.....	97
Tabela 3.3 – Cruzamentos em que houve comportamento agressivo entre um ou ambos os sexos durante o período em que permaneceram unidos para cruzamento. . * = um indivíduo da prole foi vítima de canibalismo.....	99
Tabela 3.4 – Sucesso Reprodutivo para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.....	100
Tabela 3.5 – Valores de significância do sucesso reprodutivo para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais. Valor de χ^2 significativo de $p < 0,05$	101
Tabela 3.6 – Tempo gestacional e tamanho da ninhada para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.....	102
Tabela 3.7 – Valores de significância do tempo gestacional (diagonal inferior) e do tamanho da ninhada (diagonal superior com destaque em cinza) para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais. Nenhum valor de χ^2 foi significativo ($p > 0,05$).....	102
Tabela 3.8 – Mortalidade de filhotes durante o período de lactação considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.....	104
Tabela 4.1 – Sucesso reprodutivo (SR), tempo gestacional (TG) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos interespecíficos entre parentais <i>A. cursor</i> (ACU) e <i>A. montensis</i> (AMO), considerando-se o sexo das espécies parentais e clados de <i>A. cursor</i> (clado Norte - ACU-N e clado Sul - ACU-S).....	123
Tabela 4.2 – Sucesso reprodutivo (SR), tempo gestacional (TG) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos interespecíficos entre <i>A. cursor</i> e <i>A. montensis</i> considerando o cariótipo das espécies parentais e no caso de <i>A. cursor</i> , diferenças entre clado Norte (2n ^N) e Sul (2n ^S).....	123
Tabela 4.3 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) estimados a partir de cruzamentos intraespecíficos em <i>A. montensis</i> , AMO-M, AMO-F ₁	127

Tabela 4.4 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos intraespecíficos (INT) entre <i>A. montensis</i> considerando o cariótipo dos parentais.....	128
Tabela 4.5 – Descrição do cariótipo e número de híbridos gerados através de cruzamentos experimentais entre <i>A. cursor</i> e <i>A. montensis</i>	129
Tabela 5.1 – Exemplares de <i>A. cursor</i> (ACU-N, ACU-S, ACU-E) <i>A. montensis</i> (AMO) e híbridos (HIB), utilizados nas análises de anatomia interna (A), morfologia externa (M) e histologia testicular (H), visando testar as hipóteses propostas.....	148
Tabela 5.2 – Variáveis anatômicas e morfológicas entre os grupos de <i>A. cursor</i> clado Norte (ACU-N), clado Sul (ACU-S) e interclado (ACU-E). Os valores de significância na ANOVA correspondem à análise incluindo os três grupos (superior) e entre parêntesis (inferior) corresponde à análise dos grupos ACU-N e ACU-S.....	150
Tabela 5.3 – Porcentagem de classificação dos grupos na análise discriminante.....	151
Tabela 5.4 – Tamanho amostral, média, desvio padrão, mínimo, máximo e valores de significância da análise de variância (ANOVA) indicando quais variáveis anatômicas e/ou morfológicas mostram-se significativamente diferentes entre <i>A. cursor</i> (ACU), <i>A. montensis</i> (AMO) e seus híbridos (HIB). Para os dois valores de significância na ANOVA: superior=3 grupos amostrais (ACU, AMO e HIB); inferior, entre parêntesis=2 grupos amostrais (ACU e AMO).....	154
Tabela 5.5 – Classificação anterior das espécies parentais e híbridos, tamanho amostral e porcentagem de casos agrupados corretamente na análise discriminante.....	155
Tabela 5.6 – Parâmetros comparativos entre indivíduos com 2n=15 e interclados de <i>A. cursor</i> e híbridos entre <i>A. cursor</i> e <i>A. montensis</i> , e avaliação do <i>status</i> atual de cada uma dessas variantes.....	164

Lista de Figuras

- Figura 1.1** – Cariótipos representativos de *A. cursor* mostrando variação do número diploide ($2n$) associada a dois pares autossômicos (pares 1 e 3) e variação do número fundamental (NF) em decorrência de heteromorfismos dos pares 2 e 4. a) $2n=16$; b) $2n=15$; c) $2n=14$ 34
- Figura 1.2** – Mapa de distribuição com informação cariotípica dos clados Norte (vermelho) e Sul (azul) de *A. cursor* (área de distribuição, em cinza, segundo IUCN) e filogenia inferida pela análise combinada dos genes *Cit-b* e COI. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) com valores de *bootstrap* (1000 replicações) indicados acima dos ramos. Os táxons terminais correspondem a indivíduos com cariótipo conhecido, evidenciando (em cinza) os ramos em que há exemplares com $2n$ distintos. Rede de haplótipos do gene COI destacando variação por clado e por cariótipo. Números nas redes de haplótipos indicam passos mutacionais, sendo que passos ≤ 2 não foram representados. No mapa, predominância da forma $2n=14$ no clado Sul, da forma $2n=16$ no clado Norte e descaque para as localidades com casos de simpatria entre dois ou três números diplóides. Para mais detalhes sobre as localidades vide **Anexo 1**..... 37
- Figura 1.3** – Região onde ocorre a quebra filogeográfica em *A. cursor* compreendida entre as latitudes 16-18°S, correspondente ao sul da Bahia e norte de Minas Gerais. Pontos vermelhos=localidades do clado Norte e pontos azuis=localidades do clado Sul. (a) relevo e hidrografia; marrom=altitude acima de 500m; seta=Rio Jequitinhonha (b) geopolítico e (c) vegetação e hidrografia. Vide **Anexo 1** e **Fig 1.2** para detalhes sobre as localidades..... 38
- Figura 1.4** – Gráficos de distribuição *mismatch* entre as populações de *A. cursor* utilizando o gene COI (a, b) e *Cit-b* (c, d). Os valores do eixo X indicam o número de diferenças par-a-par entre os haplótipos e o eixo Y a frequência dos haplótipos. As linhas contínuas nos gráficos representam a frequência esperada para as populações, e a linha pontilhada a frequência observada. (a, c) Norte (b, d) Sul..... 41
- Figura 2.1** - Mapa de distribuição dos exemplares de *A. cursor* representativos do clado Norte (círculo vermelho) e do clado Sul (círculos azuis) utilizados como matriz nos cruzamentos experimentais. O traço horizontal representa a quebra filogeográfica e a

área em cinza corresponde aos limites de ocorrência da espécie segundo IUCN. Para mais detalhes sobre as localidades vide Anexo 3	62
Figura 2.2 – Frequência de sucesso reprodutivo (a e b) e tamanho de ninhada (TN) (c e d) em cruzamentos intraclado Norte (a e c) e Sul (b e d), considerando indivíduos matriz (M) e descendentes (F ₁ , F ₂ e F ₃) como parentais.....	71
Figura 2.3 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) em cruzamentos interclado, diferenciando cruzamentos em que os parentais foram matrizes (interclado ^a), descendentes intraclado (interclado ^b) e descendentes interclado (interclado ^c).....	73
Figura 2.4 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do tamanho da ninhada (b) entre parentais 2n=14 que participaram de cruzamentos intraclado e interclado. Cruzamentos interclado ^a = apenas matrizes como parentais; interclado ^b = um parental descendente de cruzamento intraclado e outro de cruzamento interclado; interclado ^c = parentais descendentes de cruzamentos interclado combinados entre si.....	76
Figura 2.5 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) em cruzamentos envolvendo pelo menos um parental 2n=15. Em todos os casos a combinação entre os cariótipos segue o padrão fêmea x macho.....	78
Figura 2.6 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) de cruzamentos entre parentais de mesmo cariótipo e de cariótipo distinto.....	80
Figura 3.1 – Frequência de sucesso reprodutivo levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais. As características dos grupos estão detalhadas na Tabela 3.1.....	100
Figura 3.2 – a) Tempo gestacional (em dias) de <i>A. cursor</i> levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais. b) Número de filhotes nascidos por ninhada em cruzamentos de <i>A. cursor</i> levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais.....	102
Figura 3.3 – Número total de participações em cruzamentos por indivíduo matriz (a) e por descendentes gerados em cativeiro (b).....	105
Figura 3.4 – Anomalias em prole de <i>A. cursor</i> nascidos em cativeiro. a) massa tecidual adjacente à perna direita do exemplar LGA 4074 (2n=14, clado Norte); b) pelo atípico e	

escasso em LGA4525 (2n=14, clado Norte); c) tumor abdominal em LGA 4269 (2n=14, clado Norte). Foto tirada durante preparação do espécime para taxidermia; d) ausência da pata posterior em LGA4919 (2n=14, Interclado). O exemplar LGA 4480 (2n=14, matriz coletada em Santa Teresa, ES) também apresentou a mesma anomalia..... 106

Figura 4.1 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação média do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (c) em cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis*, considerando o sexo dos parentais..... 124

Figura 4.2 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação média do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (c) em cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis*, considerando o cariótipo dos parentais..... 125

Figura 4.3 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (b) em cruzamentos de *A. montensis* envolvendo indivíduos matriz ACU-M e descendentes gerados em cativeiro (ACU-F₁)..... 127

Figura 4.4 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (b) em cruzamentos de *A. montensis* envolvendo cruzamentos com diferentes combinações cariotípicas..... 128

Figura 4.5 – Cariótipos de híbridos entre *A. cursor* (ACU) e *A. montensis* (AMO). A linha superior representa o conjunto haploide de ACU (n=7 ou n=8, com polimorfismo dos pares 1/3, 2 e 4) e a inferior o de AMO (n=12, invariável). (A) macho, 2n=20 (ACU: 1S/3M, 2S, 4A); (B) macho, 2n=20 (ACU: 1S/3M, 2S, 4M); (C) fêmea, 2n=20 (ACU: 1S/3M, 2A, 4A); (D) macho, 2n=20 (ACU: 1S/3M, 2A, 4M); (E) fêmea, 2n=19 (ACU: 1+3M, 2A, 4M); (F) macho, 2n=19 (ACU: 1+3M, 2A, 4A); (G) macho, 2n=19 (ACU: 1+3M, 2S, 4A)..... 130

Figura 4.6 – Corte longitudinal de túbulo seminífero. (a) *A. cursor* (b) *A. montensis* (c) e (d) híbridos entre essas espécies. As imagens (a) e (b) mostram a formação de espermatozoides na luz dos túbulos enquanto as formas (c) e (d) mostram a completa ausência de espermatozoides e presença e células fagocitárias (setas), sem formação de luz do túbulo..... 132

Figura 5.1 – Medidas tomadas nos órgãos considerados nas análises de anatomia interna. A) estômago; B) rim direito (idem para o rim esquerdo); C) estômago com

- intestinos completos (apenas contextualização); D) coração; E) ramos mesenteriais..... 148
- Figura 5.2** – Valores da primeira função discriminante versus escores da segunda função discriminante revelando o padrão de diferenciação anatômica e morfológica entre representantes dos clados Norte, Sul e interclado de *A. cursor*..... 152
- Figura 5.3** – Corte longitudinal de túbulo seminífero de exemplares de *A. cursor* representativos do clado Sul **(a)**, do clado Norte **(b)** e interclado **(c)** e **(d)**. As imagens mostram a formação de espermatozoides na luz dos túbulos em todas as formas. Barra = 100µm..... 152
- Figura 5.4** – Valores da primeira função discriminante versus escores da segunda função discriminante revelando o padrão de diferenciação anatômica e morfológica entre as espécies parentais *A. cursor* e *A. montensis*..... 156
- Figura 5.5** – Corte longitudinal de túbulo seminífero (TS). **(a)** *A. cursor* **(b)** *A. montensis* **(c)** e **(d)** híbridos, com ausência de espermatozoides e presença e células fagocitárias (setas), sem formação de luz do túbulo. Barra = 100µm em **(a)** e **(b)**, 50 µm em **(c)** e **(d)**..... 156
- Figura 5.6** – Distribuição geográfica dos exemplares de *A. cursor* utilizados exclusivamente no presente estudo (pontos circulares, descritivo numérico) e no presente estudo e em Geise *et al.*, 2005 (quadrados, sendo G1, G3, G4 e G5 com numeração tal qual artigo – para demais localidades vide o referido trabalho). 1=Una, BA; 2=Santa Teresa, ES; 3=Domingos Martins, ES; 4=Castelo, ES; G1=Lençóis, BA; G3=Turmalina, MG; G4=Pau Brasil, BA; G5=Nova Viçosa, BA. Destaque para a localidade G4, cuja classificação foi revista (vide discussão). 159
- Figura 5.7** – Diagramas representativos de linhagens evolutivas **(a)** adaptação de De Queiroz, 2007. Gradação em escalas de cinza representam as linhagens filhas divergindo ao longo do tempo e as linhas horizontais SC (critérios de espécie) 1 a 9 representam o tempo em que cada forma adquirem propriedades diferentes (ou seja, quando se tornam feneticamente distinguíveis, diagnosticáveis, reciprocamente monofiléticas, reprodutivamente incompatíveis, ecologicamente distintas, etc... conforme conceito adotado). **(b)** eventos deflagradores (E) do processo de especiação (alopátrica, simpátrica e parapátrica)..... 169

Lista de Abreviações

ACU: *Akodon cursor*

ACU-E: *Akodon cursor* de cruzamentos interclado

ACU-N: *Akodon cursor* clado Norte

ACU-N: *Akodon cursor* clado Norte

ACU-S: *Akodon cursor* clado Sul

AMO: *Akodon montensis*

AMOVA: análise de variância molecular

ANOVA: análise de variância simples

BT: valores de *bootstrap* em análises de máxima verossimilhança

Cit-*b*: gene Citocromo *b*

COI: gene Citocromo oxidase I

dH: diversidade haplotípica

dn: diversidade nuc

HIB: híbridos entre *Akodon cursor* e *Akodon montensis*

IB: Inferência Baesyana

INT: intercruzamento de híbridos

ML: máxima Verossimilhança

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PP: probabilidade *a posteriori* em Inferência Baesyana

RET: retrocruzamento de híbrido com espécies parentais

SSD: soma do desvio dos quadrados

Apresentação

Akodon cursor é uma das dez espécies do gênero que ocorrem no território brasileiro. Está distribuída ao longo da costa brasileira leste, desde o norte do estado do Paraná até a Paraíba, ocupando áreas de Mata Atlântica, Restinga, Cerrado e Caatinga. Esta espécie é frequentemente confundida com sua irmã, *A. montensis*, pois ambas compartilham áreas de simpatria no estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais e são indistintas do ponto de vista morfológico. Porém, do ponto de vista citogenético são facilmente distintas, *A. cursor* apresentando $2n=14, 15$ e 16 e *A. montensis* $2n=23, 24, 25$ e 26 .

Desde os primeiros registros de cariótipo de *A. cursor*, no início da década de 70 até o fim da década de 90, já haviam sido descritos rearranjos cromossômicos em pares autossômicos, totalizando em 28 cariótipos em 311 indivíduos analisados. Cerca de doze anos depois, uma nova compilação considerando 672 exemplares elevou para 31 o número de cariótipos conhecidos para a espécie. A variação do $2n$ de 14-16 e do número fundamental de 18-26, se deve principalmente a polimorfismos envolvendo cinco pares autossômicos.

A frequência com que cada cariótipo ocorre ao longo da distribuição geográfica é distinta, com maior frequência de $2n=16$ ao norte e $2n=14$ ao sul. Estudos meióticos sugeriram não haver problemas de emparelhamento dos pares heteromórficos e na geração de gametas. Porém, nenhum estudo até então realizado aborda se indivíduos com cariótipos distintos combinam-se arbitrariamente, ou se o cariótipo pode impor algum tipo de isolamento reprodutivo.

Os primeiros estudos moleculares já indicavam que *A. cursor* está organizado em dois agrupamentos monofiléticos. Trabalhos voltados para investigar essa dicotomia revelaram que as três formas cariotípicas estavam presentes nos dois clados. Assim, a sugestão inicial de que os clados se distinguem pelos cariótipos, e que poderiam representar duas espécies, uma com $2n=14-15$ e outra com $2n=16$, foi rejeitada. Em seu lugar, passou-se a considerar que a divergência genética refletida na recuperação dos dois clados estaria associada a uma distinção geográfica, com populações do Norte e do Sul. Porém, os limites geográficos que separam os clados Norte e Sul não foram definidos, necessitando estudos com amostras mais abrangentes. Essa abordagem é explorada no capítulo 1 do presente estudo.

Do ponto de vista taxonômico, já foi levantado o questionamento sobre a existência de duas espécies em *A. cursor*. Os dados moleculares sugerem dois clados, porém, a falta de

evidências de distinção morfológica e cariotípica entre indivíduos com $2n=14$, 15 e $2n=16$ mantém essa questão em aberto. Estudos que demonstrem a viabilidade reprodutiva de indivíduos com $2n=15$ e análises morfológicas e/ou anatômicas mais amplas são elementos-chave para uma discussão mais fundamentada do tema. Questões como “ $2n=15$ é um híbrido?” e “ $2n=15$ é estéril?” são ainda pendentes. Essa abordagem é explorada nos capítulos 2 e 3 do presente estudo.

No início da década de 80 foram registrados indivíduos com $2n=19$ e $2n=20$, coletados na natureza, híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*. Tais híbridos também já foram gerados em cativeiro e se mostraram estéreis, indicando isolamento reprodutivo entre as espécies parentais. Alguns dados dos híbridos com $2n=19$ e 20 podem auxiliar nas interpretações sobre as variações intraespecíficas de *A. cursor*. O capítulo 4 contribuirá para a discussão desse assunto.

As questões: “qual o limite geográfico dos clados de *A. cursor*?”; “descendentes de *A. cursor* clado Norte x clado Sul são viáveis?”; “há evidências para sugerir a separação de *A. cursor* em duas espécies?” serão exploradas no capítulo 5 do presente estudo.

Vamos iniciar a discussão...

CAPÍTULO 1

QUEBRA FILOGEOGRÁFICA EM *AKODON CURSOR* MANTIDA PELO VALE DO JEQUITINHONHA

RESUMO

Akodon cursor (Winge, 1887) é um roedor sigmodontino com ampla distribuição geográfica ao longo da costa Atlântica brasileira com características citogenéticas capazes de distingui-la de sua espécie críptica e irmã *A. montensis* Thomas, 1913, com a qual compartilha áreas de simpatria nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. *A. cursor* apresenta número diploide $2n=14$, 15 e 16 e variação do número de braços autossômicos de 21 a 28, totalizando 31 cariótipos distintos para a espécie. Dados moleculares apontam grande diversidade genética em *A. cursor*, com estruturação das populações em dois agrupamentos relacionados à distribuição geográfica e designados clados Norte e Sul, cada qual contendo os três cariótipos. Foram realizadas reconstruções filogenéticas de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana baseadas em sequências dos genes Citocromo *b* (Cit-*b*) e Citocromo oxidase I (COI) de uma amostragem de 402 indivíduos de 63 localidades visando mapear os limites geográficos que definem os grupos monofiléticos, relacionando-os ao cariótipo dos exemplares e descrevendo os parâmetros da estrutura genética das populações. Os resultados confirmam a ocorrência de dois agrupamentos em *A. cursor*, Norte e Sul, com divergência genética de 4,4% para COI e de 2,5% para Cit-*b* e poucos haplótipos compartilhados (um de cada gene) entre os clados, em um tempo de divergência aproximado de 1 Ma. O clado Norte compreende populações localizadas entre as latitudes 7-18°S e o clado Sul entre as latitudes 16-26°S, estando a quebra filogeográfica compreendida entre as latitudes 16-18°S, entre o sul da Bahia e norte de Minas Gerais. Nesse intervalo a distribuição e organização das populações parece seguir um padrão altitudinal, com Norte (acima de 700 m) a oeste da longitude 42°W e Sul (inferior a 300 m) a leste de 42°W. Em ambos os clados foram encontrados os cariótipos $2n=14$, 15 e 16, confirmando que tal dicotomia não está associada a um cariótipo específico, muito embora haja maior frequência da forma $2n=16$ ao Norte e da forma $2n=14$ ao Sul. Valores altos de *Fst* sugerem a ausência de fluxo gênico entre populações Norte e Sul, bem como a análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que há maior variação entre os clados que dentro deles. Parâmetros demográficos indicaram equilíbrio populacional no Norte e a existência de duas populações distintas e estáveis no Sul. No Sul, a expansão populacional pode ser uma evidência dos movimentos de ocupação das áreas expostas da Plataforma Continental, concordante com a hipótese da Mata Atlântida, que através de processos evolutivos favoreceu a fixação do cariótipo $2n=14$ nas populações mais ao norte do clado Sul. A quebra filogeográfica é coincidente com Vale do Jequitinhonha que funciona como barreira secundária ao fluxo gênico entre essas populações.

INTRODUÇÃO

Akodon cursor (Winge, 1887) é uma espécie de roedor da subfamília Sigmodontinae que apresenta distribuição geográfica ampla ao longo da costa Atlântica brasileira e características genéticas marcantes, mas que não se distingue morfológicamente da espécie irmã *A. montensis* Thomas, 1913, com a qual compartilha áreas de simpatria nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

A área de distribuição de *A. cursor* é bastante distinta em relevo e vegetação. Ocorre em áreas de Mata Atlântica até 1.170 metros de altitude, desde a Paraíba até o extremo norte do Paraná (Maia e Langguth, 1981; Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Gentile *et al.*, 1997; Fagundes *et al.*, 1998; Paresque *et al.*, 2004; Nogueira e Fagundes, 2008; Barros *et al.*, 2009; Colombi *et al.*, 2010; Geise, 2012). Registros apontam a ocupação dessa espécie também em áreas de Restinga no Rio de Janeiro (Cerqueira *et al.*, 1993 e Gentile *et al.*, 1997), Cerrado na Chapada Diamantina (Pereira e Geise, 2007) e Caatinga em Pernambuco (Ribeiro *et al.*, 2009).

O polimorfismo cariotípico elevado é o caráter genético mais marcante em *A. cursor*, com número diploide $2n=14$, 15 e 16 , e número de braços autossômicos (NF) variando de 21 a 28, totalizando 31 cariótipos distintos para a espécie (Fagundes *et al.*, 1998; Colombi, 2010). Fagundes *et al.* (1997b) apontaram que a forma $2n=16$ e os pares autossômicos de dois braços (metacêntrico e submetacêntrico) constituem o cariótipo básico para a espécie, com algumas variações cariotípicas mais frequentes: 1) rearranjo complexo envolvendo inversões e fusão cêntrica dos pares submetacêntricos 1 e 3 presentes na forma $2n=16$, gerando os cariótipos com $2n=14$ (forma homozigota do rearranjo) e $2n=15$ (forma heterozigota do rearranjo); 2) inversões pericêntricas nos pares autossômicos 2, 4 e 6, gerando formas acrocêntricas em homozigose (quando os dois autossomos são acrocêntricos), heterozigose (quando um dos autossomos é acrocêntrico e outro é meta ou submetacêntrico).

Dados moleculares apontam uma diversidade genética alta para a espécie, com estruturação das populações em dois grandes agrupamentos (Geise *et al.*, 2001; Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010). Estudos com alozimas revelaram a existência de cinco alelos capazes de diferenciar as populações do Espírito Santo ($2n=14$) e da Paraíba ($2n=16$), sugerindo um processo especiativo recente dentro de *A. cursor* (Rieger *et al.*, 1995). Estes autores consideraram que *A. cursor* $2n=14$ corresponderia aos espécimes do sul-sudeste e uma

nova entidade taxonômica, *Akodon* aff. *cursor*, com $2n=16$, corresponderia àqueles exemplares do nordeste. No entanto, esses autores relataram que apenas a distância genética, desvinculada da informação cariotípica, não seria suficiente para assumir a existência de duas espécies, além disso, a amostragem utilizada no referido estudo estava limitada a duas localidades, cada qual com indivíduos de número diploide distinto. Geise *et al.* (2001) utilizaram sequências do gene Citocromo *b* (*Cit-b*) associadas a dados cariotípicos e também recuperaram dois clados em *A. cursor*, um com exemplares $2n=16$ da Bahia, do norte de Minas Gerais e da Paraíba e outro com indivíduos $2n=14-15$ de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, seguindo a nomenclatura sugerida por Rieger *et al.* (1995).

Mais tarde, Nogueira (2005) e Nogueira e Fagundes (2008) realizaram análise molecular com uma amostra mais abrangente, envolvendo exemplares representativos dos dois clados e com as três formas cariotípicas ($2n=14, 15$ e 16), de localidades ao longo de toda a área de distribuição, incluindo populações nas quais foram registrados casos de simpatria entre esses citótipos, e recuperaram dois agrupamentos monofiléticos, cada qual contendo os três cariótipos, refutando a proposta de que os grupos poderiam ser associados a cariótipos específicos e distintos. Assim, foi sugerido o desuso de *A. aff. cursor* para exemplares com $2n=16$, como proposto por Rieger *et al.* (1995). Ainda, os autores concluíram que não havia informação suficiente que embasasse a decisão de separar *A. cursor* em duas espécies, mas reconheciam a existência de uma quebra filogeográfica entre o norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Nogueira e Fagundes (2008) atribuíram os resultados obtidos por Rieger *et al.* (1995) e Geise *et al.* (2001) a um viés amostral, já que tais autores não possuíam em suas amostras representantes com $2n=14, 15$ e 16 ocorrendo na mesma região geográfica. Em compilação realizada posteriormente, Geise (2012) mencionou outros trabalhos concordantes com os resultados obtidos por Nogueira (2005) e Nogueira e Fagundes (2008).

Visando refinar a localização da quebra geográfica entre os dois clados, Colombi *et al.* (2010) amostraram localidades envolvendo as latitudes $15-20^{\circ}\text{S}$ para testar se o Rio Doce estaria atuando como barreira geográfica na diversificação de *A. cursor*. Os resultados, baseados em sequências de *Cit-b* de populações localizadas ao norte e sul do Rio Doce refutaram essa hipótese e apontaram que tal quebra filogeográfica estaria localizada ainda mais ao norte. Nesse sentido, o presente estudo pretendeu: 1) mapear os limites geográficos dos agrupamentos Norte e Sul utilizando sequências de dois marcadores mitocondriais de uma amostragem ampla; 2) propor as possíveis barreiras geográficas responsáveis e/ou

mantenedoras da estruturação geográfica observada; 3) descrever os parâmetros de estrutura genética das populações que compõem cada agrupamento e 4) verificar o padrão de distribuição dos cariótipos nos clados recuperados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra analisada no presente estudo foi obtida da Coleção de Tecidos e de DNA da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) ou através de doações de pesquisadores colaboradores: Yatiyo Yonenaga-Yassuda (USP), Renata Pardini (USP), Lena Geise (UERJ), Alfredo Langguth (UFPE), Cláudia Costa (PUC-MG) e Raquel Moura (UFMG). Fizeram parte do presente estudo 402 indivíduos provenientes de 63 localidades dos estados de Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (**Anexo 1**).

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA dos exemplares foi obtido de amostras de tecido muscular ou hepático adotando-se o protocolo de extração de DNA total com o uso NaCl/SDS/Proteinase K, segundo Bruford *et al.* (1992). O sucesso e a qualidade dos extratos de DNA foram verificados em gel de agarose 1% e a quantidade de DNA foi medida em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). Todos os extratos foram diluídos em água ultrapura para 50ng/μL.

Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 μl utilizando-se 0,5 μl de DNA molde a 50 ng no Termociclador ABI Veriti®. As misturas de PCR continham 1x de solução tampão, 1,0 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada primer e 0,5U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Inc.).

Para amplificar o gene Citocromo Oxidase I (COI) foram utilizados os *primers* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') e LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAA AGATATTGG-3'), específicos para os 666 pb iniciais do gene (Folmer *et al.* 1994). O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 94°C por 5 minutos; (2) 35 ciclos de 94°C por 40 segundos (desnaturação), 46°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 5 minutos.

Para o gene Citocromo *b* (Cit-*b*), foram utilizados os *primers* L14115 (5'-GATATGAAAAACCATC GTTG-3') e H15228 (5'-ACAAGACCAGAGTAATGTTTATACTAT-3') que amplificaram 1.140 pb do gene. O perfil adotado consistiu em (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA a 94°C por 5 minutos; (2) 35 ciclos de 94°C por 40 segundos (desnaturação), 47°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 75 segundos (elongação); (3) um período de final a 72°C por 10 minutos.

O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose e visualizado sob incidência de luz ultravioleta em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch® (Loccus). Todas as PCR foram realizadas utilizando-se Água Milli-Q® como controle negativo. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o Kit de Purificação ExoSAP-IT® (USB Corporation), seguindo-se o protocolo do fabricante.

As sequências de Cit-*b* foram geradas utilizando-se os *primers* L14115 e MVZ 127 (Smith e Patton, 1993) e para o COI foi usado preferencialmente o *primer* LCO 1490 (Folmer *et al.*, 1994) e alternativamente o *primer* HCO 2198 (Folmer *et al.*, 1994). O sequenciamento foi feito usando o Kit Big Dye® 3.1 em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) no Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES ou na Macrogen, Inc. (<http://dna.macrogen.com>).

Somente sequências com picos claros e bem definidos no eletroferograma foram utilizadas na análise. Para cada sequência gerada foi feita uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para verificar a ocorrência de possíveis contaminações e a correspondência ao gene de interesse. O alinhamento foi feito no programa MEGA v6 utilizando a ferramenta Muscle (Tamura *et al.*, 2013).

Para avaliar se as sequências obtidas eram cópias originais do gene citocromo *b* e não cópias de pseudogenes integradas ao núcleo (Bensasson *et al.*, 2001) duas medidas foram adotadas utilizando-se o programa MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013): as sequências dos nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos para verificar a existência de códons de parada ou mudanças do quadro de leitura; as frequências dos nucleotídeos foram calculadas para verificar a existência de *déficit* de guanina, típico de fragmentos de regiões codificadoras do DNA mitocondrial (Vences *et al.*, 2004)

Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas foi utilizada uma matriz concatenada dos genes *Cit-b* e COI obtida através do programa SequenceMatrix (Vaidya *et al.*, 2011) v1.8, utilizando os indivíduos como táxon terminal. As árvores filogenéticas foram inferidas a partir da utilização dos critérios de otimização de Máxima Verossimilhança (ML) e através da Inferência Bayesiana (IB). Em ambos os casos foi estimado o melhor modelo de substituição nucleotídica, considerando a posição das bases no códon utilizando o programa PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012). A árvore filogenética de ML foi obtida através do programa RAxML disponível na interface virtual da plataforma *online* CIPRES (Miller *et al.*, 2010), estabelecendo valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 replicações nos quais ramos que apresentaram valores inferiores a 70% foram desconsiderados. A IB foi realizada na plataforma *online* CIPRES (Miller *et al.*, 2010) a partir de matriz gerada pelo programa BEAST (Drummond e Rambaut, 2007) v1.8.2. utilizando-se a cadeia de *Markov Monte Carlo* em 100.000.000 gerações, tendo sido consideradas significativas as probabilidades posteriores acima de 95%. As árvores geradas foram editadas no programa FigTree v1.4.0. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). As divergências genéticas intra e interclado de *A. cursor* foram estimadas no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando-se o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). *A. montensis* foi utilizado como grupo externo nas análises filogenéticas.

A relação hierárquica entre os haplótipos foi estabelecida através de rede de haplótipos para cada gene, gerada por parcimônia estatística utilizando-se o programa NETWORK 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd). Os haplótipos de cada gene foram associados ao número diploide dos espécimes.

As localidades representativas dos clados Norte e Sul foram plotadas em mapa de distribuição gerado no programa Quantum GIS (QGIS) v1.8 (<http://www.qgis.org/>), evidenciando relevo, vegetação e hidrografia com o objetivo de se mapear os limites geográficos dos agrupamentos, assim como as possíveis barreiras naturais que poderiam estar atuando como responsáveis e/ou mantenedoras da estruturação geográfica.

Análises intra e interpopulacionais

Nessas análises foram consideradas como populações os clados recuperados nas reconstruções filogenéticas, tendo sido realizadas análises separadas para cada um dos marcadores genéticos.

O número de haplótipos, os níveis de diversidade haplotípica (dH), diversidade nucleotídica (π) e número de sítios polimórficos (s) foram calculados utilizando o programa DnaSP v5.10.01 (Librado e Rozas, 2009).

Para compreender a estruturação genética das populações, foram realizadas análises de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequin v3.1 (Excoffier, 2005) para avaliar a distribuição espacial da variação genética atribuída à diferenciação entre os grupos (F_{CT}), entre grupos dentro das localidades (F_{SC}) e entre as localidades em relação à amostra total (F_{ST}). A variação genética global foi estabelecida pelo nível de fluxo gênico entre as populações estimado através de valores de F_{ST} .

História demográfica das populações

Inferências sobre a história demográfica das populações foram conduzidas utilizando-se o programa Arlequin v3.1 (Excoffier, 2005). As distribuições *mismatch* apresentam distribuição multimodal quando as populações estão em equilíbrio demográfico e curva unimodal geralmente sinaliza que a população passou por uma expansão demográfica recente. O teste da soma de desvio dos quadrados (SSD) foi utilizado para verificar se os diferentes arranjos populacionais se ajustam à proposta de equilíbrio populacional ou de expansão, determinados pelos parâmetros demográficos de expansão τ , θ_0 e θ_1 . Valores de $\tau > 0$ e $\theta_1 > \theta_0$ são indicativos de um modelo de expansão, enquanto $\tau = 0$ e $\theta_1 = \theta_0$ são indicativos do modelo nulo, de equilíbrio populacional. Valores significativos de SSD (p-valor) foram utilizados para rejeitar ou validar o modelo nulo. Testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) foram realizados para examinar mudanças recentes no tamanho da população, sendo que em ambos os casos, valores significativamente negativos indicavam expansão populacional enquanto valores positivos indicavam seleção balanceada.

RESULTADOS

Variabilidade genética

Dos 402 espécimes analisados, 309 (76,8%) apresentaram informação cariotípica, sendo 77,3% com $2n=14$, 17,2% com $2n=16$ e 5,5% com $2n=15$ (**Figura 1.1**). Áreas de simpatria entre as formas $2n=14$, 15 e 16 foram registradas em populações ao norte (localidade 11 - Bahia) e ao sul (localidades 59 e 60 - São Paulo) da área de distribuição da espécie, e entre $2n=14$ e 16 no centro da distribuição (localidades 23 e 26 - Minas Gerais) (**Figura 1.2; Anexo 2**).

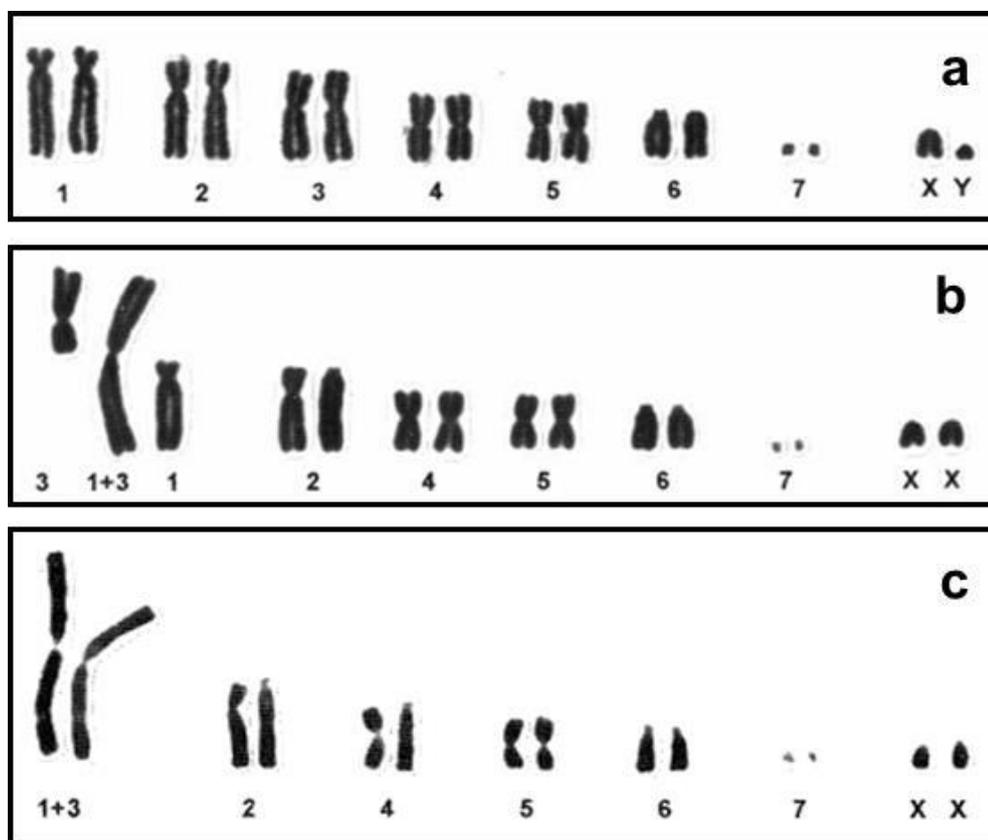


Figura 1.1 – Cariótipos representativos de *A. cursor* mostrando variação do número diplóide ($2n$) associada a dois pares autossômicos (pares 1 e 3) e variação do número fundamental (NF) em decorrência de heteromorfismos dos pares 2 e 4. a) $2n=16$; b) $2n=15$; c) $2n=14$.

A taxa de sucesso na obtenção de sequências foi superior a 97% para ambos os genes, tendo sido obtidas 392 sequências compreendendo 182 haplótipos de *Cit-b* e 399 sequências correspondendo a 115 haplótipos de COI (**Anexo 2**), que somadas totalizaram 1.806 pb analisados por indivíduo.

Análises filogenéticas

Para o gene COI os melhores modelos evolutivos considerando a 1^a, 2^a e 3^a posição do códon foram HKY+G, GTR+I e GTR+G, respectivamente, e para o *Cit-b* os melhores modelos evolutivos foram HKY+G, TrN+I e GTR+G, respectivamente. As topologias das árvores concatenada geradas por ML (**Figura 1.2**) e IB foram congruentes.

A. cursor foi recuperado como monofilético e apresentou dicotomia basal com alto suporte (BT=100 e PP=1,00) correspondente à distribuição geográfica das populações. Os clados Norte e Sul foram monofiléticos e apresentaram valor de suporte alto, BT=98/PP=1,00 e BT=77/PP=0,95, respectivamente.

No clado Norte foram agrupados exemplares localizados no intervalo 7-18°S de latitude, incluindo localidades da Paraíba (localidade 1), Pernambuco (localidades 2-3), Bahia (localidades de 4-8 e 11) e Minas Gerais (localidades 18, 21, 26). O clado Sul contém exemplares provenientes de localidades compreendidas entre as latitudes 16-26°S, que compreende o sul da Bahia (localidades 9-11), Minas Gerais (localidades 12-17, 19-20, 22-25, 27-28), Espírito Santo (localidades 29-38), Rio de Janeiro (localidades 39-56) e São Paulo (localidades 57-63) (**Figura 1.2; Anexo 1**). Exemplares da localidade 11 foram recuperados no clado Norte e no clado Sul (**Anexo 2**).

O cariótipo predominante no clado Norte foi $2n=16$ e no clado Sul foi $2n=14$. Indivíduos com dois ou três cariótipos distintos e que apresentaram o mesmo haplótipo para os genes *Cit-b* e COI foram agrupados em localidades do clado Norte e do clado Sul. No clado Norte houve compartilhamento de haplótipo entre indivíduos com $2n=14$, 15 e 16 (localidade 11, Bahia) e no clado Sul entre $2n=14$, 15 (localidade 59, São Paulo), entre $2n=14$ e 16 (localidades 23 e 26, Minas Gerais) e entre $2n=14$, 15 e 16 (localidade 11, Bahia e localidade 60, São Paulo) (**Figura 1.2, Anexo 2**).

As redes de haplótipos de COI e *Cit-b* apresentaram as mesmas relações hierárquicas recuperadas nas análises filogenéticas, sendo que os clados Norte e Sul foram separados por 13 e 19 pontos mutacionais para COI e *Cit-b*, respectivamente. Para ilustração, apenas as redes de

COI com exemplares cariotipados foram representadas em associação com a árvore de ML (**Figura 1.2**).

A divergência genética para os genes COI e *Cit-b* calculada para os agrupamentos basais de *A. cursor*, clados Norte e Sul, foi consideravelmente maior entre grupos (4,4% e 2,5% para COI e *Cit-b* respectivamente) do que dentro dos grupos (0,8-1,1%) (**Tabela 1.1**), sendo que o gene COI apresentou para um mesmo grupo de populações valores de divergência maiores que *Cit-b*.

Tabela 1.1 – Distância genética (em porcentagem) intra e interclado em *A. cursor* calculada para os genes COI e *Cit-b* considerando os clados Norte e Sul. Em negrito a distância dentro de cada agrupamento.

Grupos considerados	Genes			
	COI		<i>Cit-b</i>	
	Norte	Sul	Norte	Sul
Norte	1,0	-	0,8	-
Sul	4,4	1,1	2,5	0,8

O clado Norte incluiu populações localizadas entre as latitudes 7-18°S e o clado Sul populações entre 16-26°S, estando a quebra filogeográfica entre esses clados localizada entre as latitudes 16-18°S, que corresponde ao sul da Bahia e norte de Minas Gerais. Nesse intervalo, a oeste da longitude 42°W tem-se o clado Norte e a leste o clado Sul (**Figura 1.3**). Um único exemplar da localidade 22, situada a oeste, na longitude a 42,5°W foi recuperado no clado Sul, a uma altitude acima de 1000 metros (**Figura 1.3b**).

Na região da quebra filogeográfica verifica-se a ocorrência de áreas montanhosas com vegetação natural de Cerrado a oeste da longitude 42°W (norte de Minas) e de áreas mais baixas com vegetação típica da Mata Atlântica a leste dessa longitude (sul da Bahia). Perpassando o intervalo de 16-18°S está o Vale do Jequitinhonha, cujo rio nasce em Minas Gerais próximo às localidades 18, 21, 22 e 26 e deságua na Bahia entre as localidades 9 e 11 (**Figura 1.3a, c**).

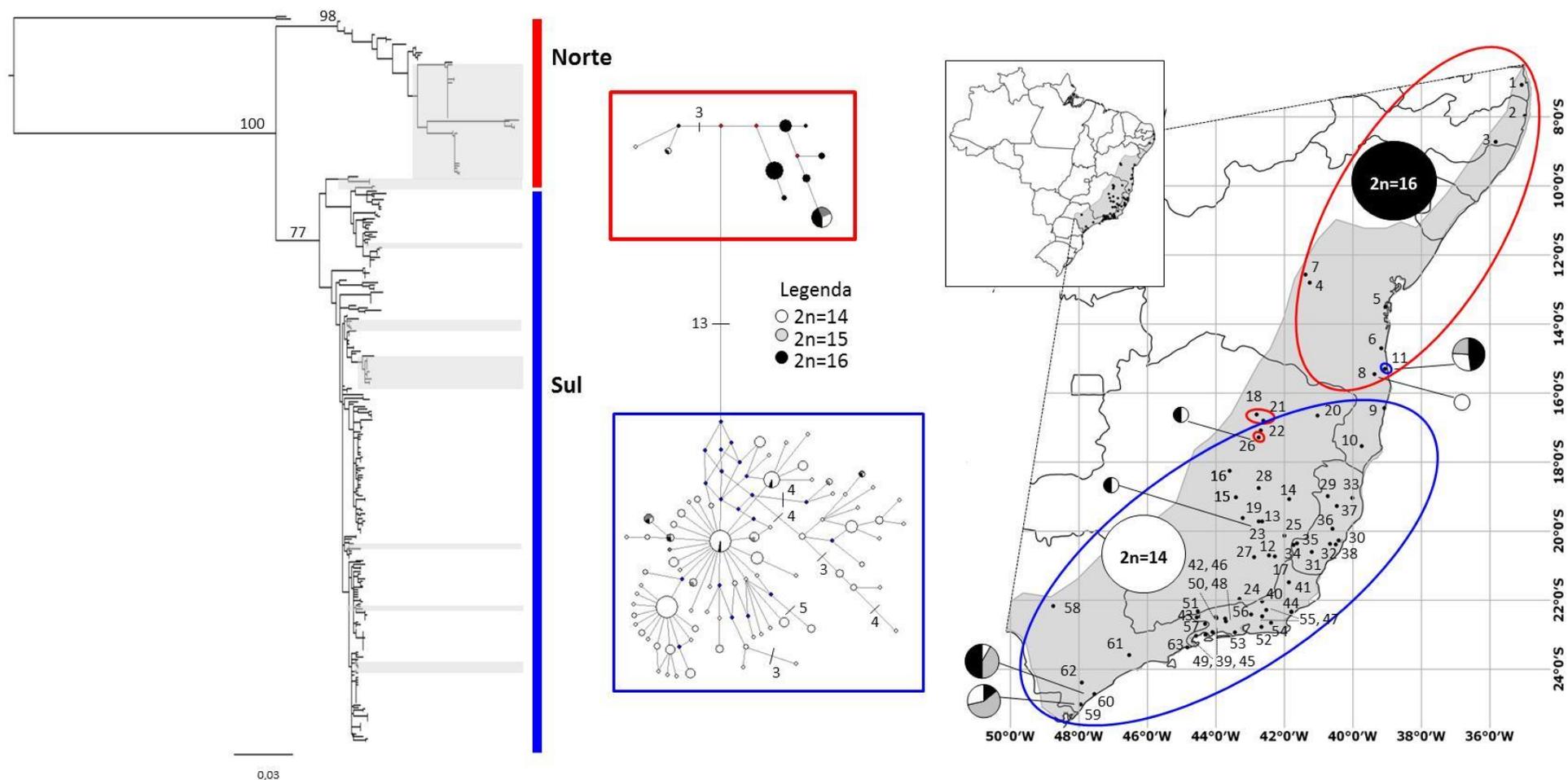


Figura 1.2 – Mapa de distribuição com informação cariotípica dos clados Norte (vermelho) e Sul (azul) de *A. cursor* (área de distribuição, em cinza, segundo IUCN) e filogenia inferida pela análise combinada dos genes *Cit-b* e *COI*. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) com valores de *bootstrap* (1000 replicações) indicados acima dos ramos. Os táxons terminais correspondem a indivíduos com cariótipo conhecido, evidenciando (em cinza) os ramos em que há exemplares com $2n$ distintos. Rede de haplótipos do gene *COI* destacando variação por clado e por cariótipo. Números nas redes de haplótipos indicam passos mutacionais, sendo que passos ≤ 2 não foram representados. No mapa, predominância da forma $2n=14$ no clado Sul, da forma $2n=16$ no clado Norte e destaque para as localidades com casos de simpatria entre dois ou três números diplóides. Para mais detalhes sobre as localidades vide **Anexo 1**.

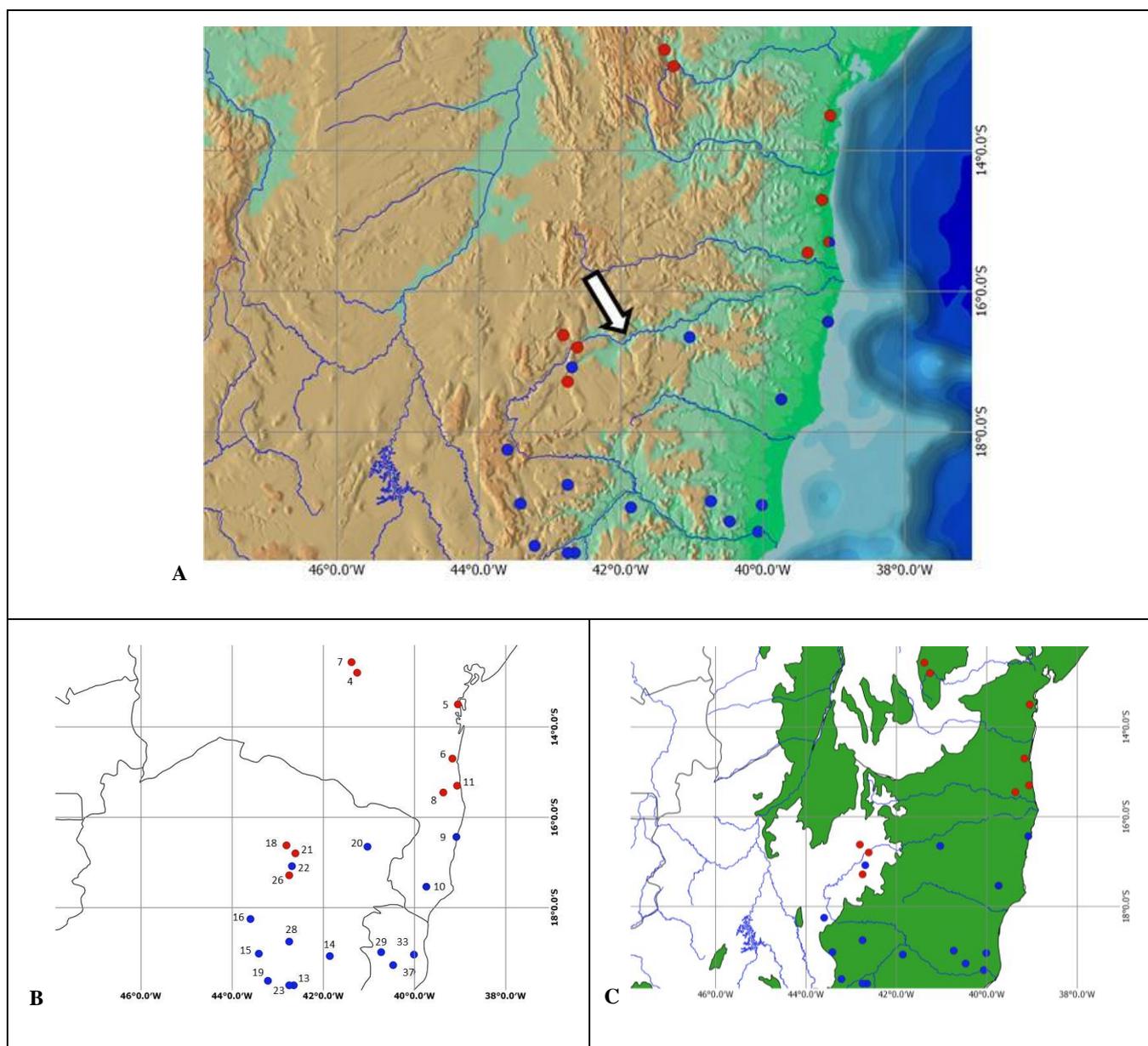


Figura 1.3 – Região onde ocorre a quebra filogeográfica em *A. cursor* compreendida entre as latitudes 16-18°S, correspondente ao sul da Bahia e norte de Minas Gerais. Pontos vermelhos=localidades do clado Norte e pontos azuis=localidades do clado Sul. (a) relevo e hidrografia; marrom=altitude acima de 500m; seta=Rio Jequitinhonha (b) geopolítico e (c) vegetação e hidrografia. Vide Anexo 1 e Fig 1.2 para detalhes sobre as localidades.

Análises intra e interpopulacionais

A análise de 1.140 pb de *Cit-b* revelou 228 sítios polimórficos definindo 182 haplótipos, e a análise de 666 pb de COI revelou 123 sítios polimórficos definindo 115 haplótipos. As diversidades haplotípica e nucleotídica globais foram altas para ambos os genes ($dH=0,982$ $\pi=0,014$ e $dH=0,973$ $\pi=0,022$, para *Cit-b* e COI, respectivamente). Para ambos os genes, a população Norte apresentou menor diversidade haplotípica (dH) que a população Sul, sendo que ambas apresentaram diversidade nucleotídica alta ($\pi > 0,005$) (**Tabela 1.2**). Apenas dois haplótipos foram compartilhados entre as populações Norte e Sul, sendo um de cada gene. O haplótipo h1 de *Cit-b* foi compartilhado entre as localidades 5, 8, 11 (Norte, Bahia) e 37 (Sul, Espírito Santo), e o haplótipo H8 de COI entre as localidades 11 (Norte, Bahia) e 20, 28, 29, 33 (Sul, Minas Gerais e Espírito Santo) (**Anexo 2**).

A análise da divergência interpopulacional mostrou valores de *Fst* significativos para as populações Norte e Sul, com divergência alta para ambos os genes (0,664 para *Cit-b*, e 0,753 para COI), indicando ausência de fluxo gênico entre essas populações.

As análises de variância molecular revelaram que a maior porcentagem de variação está entre as populações (54,02% para COI e 44,07% para *Cit-b*) do que dentro das populações (20,38% para COI e 29,37% para *Cit-b*), confirmando a diferenciação entre as populações e indicando estruturação genética em *A. cursor* (**Tabela 1.3**).

Tabela 1.2 – Variações genéticas de *Cit-b* e COI em *A. cursor*. Índices de diversidade molecular: número de indivíduos amostrados (n), número de haplótipos (H), número de haplótipos exclusivos (He), número de sítios polimórficos (s), diversidade haplotípica (dH) e diversidade nucleotídica (π).

Gene	Populações	n	H	He	s	dH	π
Cit-b	Norte	96	23	22	57	0,829	0,007
	Sul	296	159	158	203	0,986	0,010
Total		392	182	-	228	0,982	0,014
COI	Norte	96	12	11	43	0,786	0,011
	Sul	301	104	103	104	0,976	0,010
Total		399	115	-	123	0,973	0,022

Tabela 1.3 - Análise de variância molecular (AMOVA) em *A. cursor*, considerando os agrupamentos recuperados na análise filogenética. Porcentagem de variação entre grupos (EG), entre populações dentro dos grupos (EPDG) e dentro das populações (DP). Valores calculados para o gene *Cit-b* (superior) e COI (inferior, em negrito).

Grupos	Porcentagem de variação			Índices de fixação		
	EG	EPDG	DP	F_{CT}	F_{SC}	F_{ST}
Norte	44,07	26,56	29,37	0,441	0,475	0,706
Sul	54,02	25,59	20,38	0,540	0,557	0,796

História demográfica das populações

Os resultados de D de Tajima e F_s de Fu foram significativos para o grupo Sul em ambos os genes e com valores negativos, indicando expansão populacional, ao contrário do Norte, que apresentou valores negativos mas sem suporte estatístico ($p > 0,005$), sinalizando equilíbrio populacional. Os valores da soma de desvios dos quadrados (SSD) e os valores de R de Harpending (Hr) da distribuição *mismatch* foram altos para o grupo Norte e baixos para o grupo Sul, corroborando os resultados de equilíbrio populacional em Norte e expansão em Sul, mas os índices de θ_0 e θ_1 demonstraram que todas as populações expandiram de um tamanho reduzido para um tamanho maior. (**Tabela 1.4**).

A curva de distribuição *mismatch* do grupo Norte foi multimodal, que representa populações em equilíbrio, no entanto, a curva do grupo Sul foi bimodal, que pode representar contato secundário entre populações distintas ou duas populações diferentes e estáveis, cada qual apresentando expansão populacional (**Figura 1.4**).

Tabela 1.4 - Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 , τ , soma de desvios dos quadrados (SSD) e índice R de Harpending (Hr) obtidos através da análise de distribuição *mismatch* e os valores de F_s de Fu (F_s) e D de Tajima (D) para as populações recuperadas nas análises filogenéticas. Em negrito valor significativo de p -valor $< 0,005$.

Gene	Grupo	θ_0	θ_1	τ	SSD (p-valor)	Hr (p-valor)	D (p-valor)	F_s (p-valor)
Cit-b	Norte	2,672	11,150	8,947	0,033 (0,122)	0,055 (0,044)	-1,021 (0,146)	-1,031 (0,431)
	Sul	6,676	341,875	2,934	0,001 (0,765)	0,002 (0,923)	-2,296 (0,000)	-24,262 (0,001)
Total		15,441	115,231	2,617	0,003 (0,809)	0,001 (0,971)	-1,811 (0,004)	-23,652 (0,009)
COI	Norte	0,000	11,244	9,732	0,065 (0,015)	0,161 (0,001)	-0,585 (0,308)	4,440 (0,908)
	Sul	4,955	99999,0	1,844	0,008 (0,442)	0,009 (0,500)	-1,854 (0,001)	-24,604 (0,000)
Total		14,521	99999,0	1,012	0,193 (0,366)	0,008 (0,265)	-0,868 (0,1830)	-23,681 (0,006)

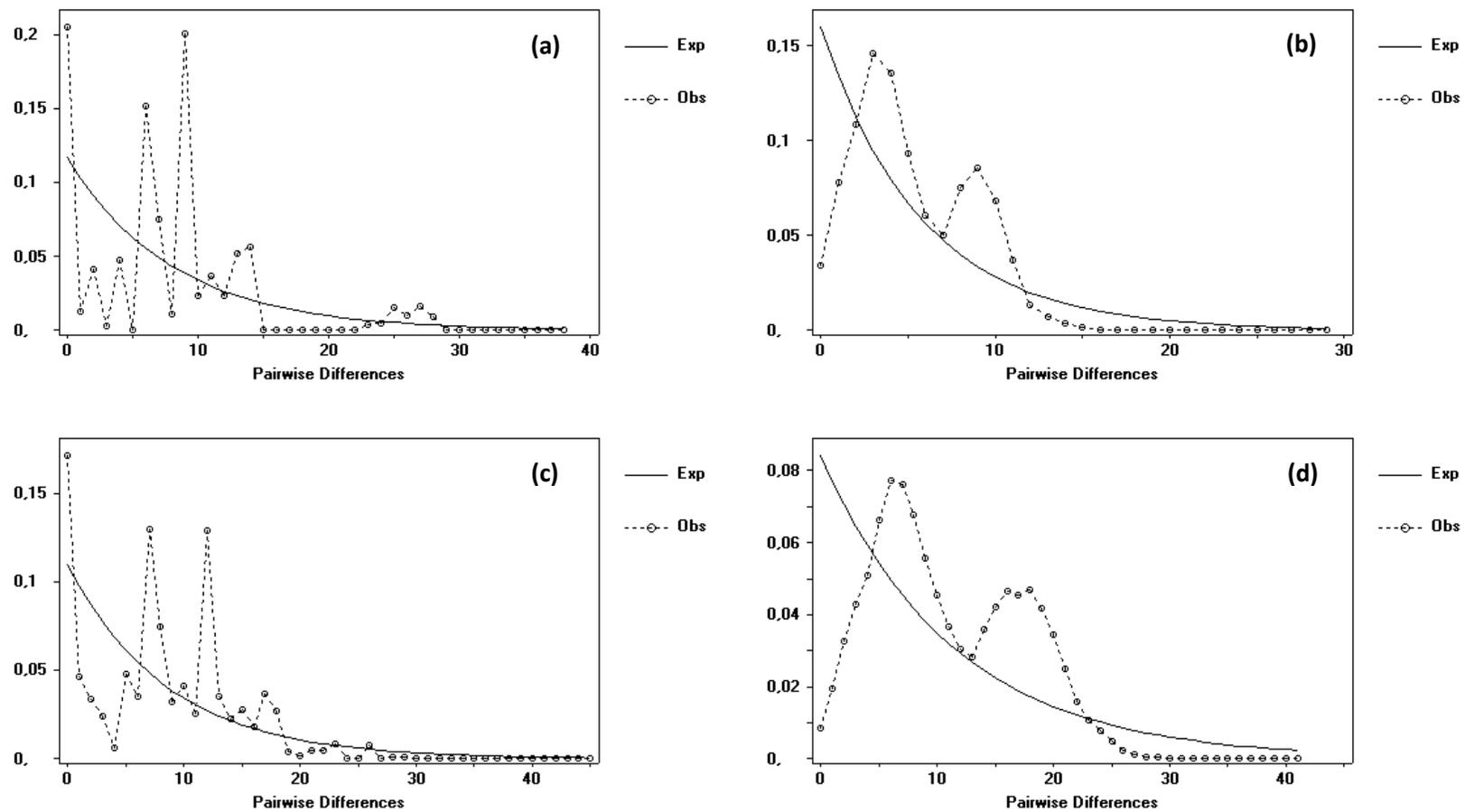


Figura 1.4 – Gráficos de distribuição *mismatch* entre as populações de *A. cursor* utilizando o gene COI (a, b) e Cit-b (c, d). Os valores do eixo X indicam o número de diferenças par-a-par entre os haplótipos e o eixo Y a frequência dos haplótipos. As linhas contínuas nos gráficos representam a frequência esperada para as populações, e a linha pontilhada a frequência observada. (a, c) Norte (b, d) Sul.

DISCUSSÃO

O presente estudo representa aumento de amostragem superior a 200% e 600% em relação ao número de localidades e indivíduos, respectivamente, quando comparado a trabalhos anteriores que utilizaram dados moleculares para discutir o padrão de distribuição de *A. cursor*. Geise *et al.* (2001) utilizaram 22 localidades e 30 indivíduos, Nogueira e Fagundes (2008) 12 localidades e 50 indivíduos e Colombi *et al.* (2010) 10 localidades e 64 indivíduos, contrastando com os valores da presente amostra que inclui 63 localidades e 402 indivíduos, representando a amostragem mais ampla a ser utilizada em um estudo filogeográfico da espécie.

Embora a maioria dos registros de ocorrência para a espécie esteja em áreas de Mata Atlântica, nossa amostra compreende exemplares do Cerrado (localidades 16 e 22 – clado Sul e localidades 18, 21 e 26 – clado Norte) e da Caatinga (localidades 4 e 7 – clado Norte) que ainda estão dentro dos limites estabelecidos pela IUCN como sendo os de ocorrência para *A. cursor*.

Cerca de 77% dos exemplares utilizados nas reconstruções filogenéticas possuem informação cariotípica ($2n$). Considerando apenas os exemplares com cariótipo descrito ($n=309$), verificou-se que a forma $2n=16$ ocorre em 100% da Paraíba e Pernambuco (PB-PE), 62% na Bahia (BA), 7% em Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), estando ausente no Rio de Janeiro e Espírito Santo (RJ-ES). O oposto foi verificado para $2n=14$, único cariótipo registrado no RJ-ES, 63% em SP, 93% em MG, 22% na BA e ausente em PB-PE. Esses resultados são coincidentes com os descritos por Fagundes *et al.* (1998), que ao utilizarem 311 exemplares provenientes de Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, observaram o mesmo padrão de distribuição dos cariótipos $2n=14$ e $2n=16$. Em ambos os estudos tem-se frequências distintas dos números diploides: na área leste do centro da distribuição da espécie (RJ-ES) apenas a forma $2n=14$ foi registrada. Ao redor desse centro as formas $2n=16$ podem ser encontradas em maior (ao norte, BA, PB-PE) ou menor proporção (a oeste, MG, e ao sul, SP).

A quebra filogeográfica está associada ao Vale do Rio Jequitinhonha

Concordando com os dados prévios da literatura (Geise *et al.*, 2001; Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010), nossos dados recuperam dois agrupamentos com suporte alto em *A. cursor*, correspondendo aos clados Norte e Sul, além de permitir o

detalhamento da região onde a quebra filogeográfica está localizada, entre as latitudes 16-18°S correspondente ao sul da Bahia e norte de Minas Gerais. Nesse intervalo o clado Norte envolve localidades ao norte do Vale do Rio Jequitinhonha, na latitude de 16°S, e a oeste da longitude 42°W e o clado sul envolve localidades ao sul do Vale do Rio Jequitinhonha do litoral até a longitude 42°W.

Nossos dados vão ao encontro do proposto por Colombi *et al.* (2010) que afirmaram que o ponto da quebra filogeográfica estaria localizado ao norte do Rio Doce, entre as latitudes 15-20°S. Esses autores utilizaram sequências de *Cit-b* para investigar se o Rio Doce estaria atuando como barreira ao fluxo gênico entre as populações Norte e Sul de *A. cursor*, o que foi refutado, já que populações do Espírito Santo localizadas nas duas margens do Rio Doce foram recuperadas como clado Sul. Assim, a quebra estaria mais ao norte, entre o norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Nossos dados permitiram refinar a localização da quebra filogeográfica, compreendida entre 16-18°S (sul da Bahia e norte de Minas Gerais), o que inclui todas as localidades do Espírito Santo no clado Sul.

O Vale do Jequitinhonha se divide em Alto (região próxima a nascente do rio, em Minas Gerais), Médio e Baixo Jequitinhonha (próximo à foz, no sul da Bahia). As paisagens nesse Vale abrangem desde altitudes próximas a 1.400 m na região de Diamantina, até 150 m na divisa com o estado da Bahia. A vegetação é bem diversificada sendo que na região próxima à Serra do Espinhaço (local onde nasce o Rio Jequitinhonha) predominam as Chapadas, áreas planas extensas com altitudes entre 800 e 1.100 m, entremeadas por vales profundos e com vegetação típica do Cerrado. Em direção à região do Médio Jequitinhonha encontram-se áreas de depressão do Rio Jequitinhonha com 300-400m de altitude e vegetação típicas do Bioma Caatinga. Seguindo-se o curso do rio adentra-se no Baixo Jequitinhonha, cuja planície sofre declínio gradativo de 300 m até cerca de 150 m de altitude onde alcança a divisa entre os estados de Minas Gerais e Bahia, no Bioma Mata Atlântica (Souza, 1997; Fávero e Monteiro, 2014). Nossa amostragem compreende exemplares de Turmalina e Leme do Prado (localidades 26 e 22, respectivamente) que estão no Alto Jequitinhonha, José Gonçalves de Minas, adjacente às áreas de Chapada, mas dentro da microrregião do Médio Jequitinhonha, e ao norte desta, mas fora do Vale do Jequitinhonha Grão Mogol (localidades 21 e 18 respectivamente). No Baixo Jequitinhonha está Joáima (localidade 20).

Na região da nascente do Rio, que envolve as localidades de Grão Mogol como clado Norte e Joáima como clado Sul, as condições topográficas e climáticas são bastante distintas.

Porém, Turmalina, Leme do Prado e José Gonçalves de Minas formam um conjunto de localidades cuja distinção é controversa, dada a similaridade topográfica das localidades e a proximidade entre elas, já que Leme do Prado foi recuperado como clado Sul e as demais como clado Norte. Padrão semelhante de distribuição foi observado para o complexo de aves *Synallaxis ruficapilla*, revelando quebras filogeográficas profundas no Vale do Jequitinhonha que deram origem a três filogrupos dessa espécie cuja divergência ocorreu durante o Pleistoceno, por volta de 1 Ma, mas que ainda apresentam extensa área de contato secundário ao longo do Vale do Jequitinhonha (Batalha-Filho, 2013; Batalha-Filho *et al.*, 2013), sendo esse tempo o mesmo previsto para a diversificação observada em *A. cursor* (Smith e Patton, 2007).

Vasconcelos e D'Angelo-Neto (2006) afirmaram que as Caatingas do Vale do Jequitinhonha representam uma barreira geográfica para a maioria das aves de Mata Atlântica. Entretanto isto não seria um empecilho para *A. cursor* já que há registros da espécie nesse Bioma (Pereira e Geise, 2007). As localidades do clado Norte amostradas no presente trabalho compreendidas entre as latitudes 16-18°S e mais próximas à nascente do Rio Jequitinhonha encontram-se em altitudes superiores a 700 m (Grão Mogol, Turmalina e José Gonçalves de Minas), enquanto as recuperadas como clado Sul foram registradas em altitudes inferiores a 300 m (Joáima, Teixeira de Freitas e Porto Seguro) e mais distantes da nascente. Esses fatores combinados explicam a distribuição longitudinal das populações dos cladogramas Norte e Sul nesse intervalo latitudinal (16-18°S). Registros mostram que *A. cursor* ocorre em áreas de menores altitudes, por volta de 800 m, enquanto em altitudes superiores a essa somente sua espécie irmã e críptica *A. montensis* é encontrada (Geise *et al.*, 2005). Assim como a altitude contribui para a distinção de nichos ocupados por essas espécies irmãs desde a sua diversificação estimada em 1,75 Ma (Coyner *et al.*, 2013), ela também pode influenciar na distinção intraespecífica observada em *A. cursor*, cujo tempo de divergência entre Norte e Sul é estimado como inferior a 1Ma (Smith e Patton, 2007).

A quebra filogeográfica não é influenciada pelo cariótipo

Os agrupamentos recuperados para *A. cursor* confirmam não haver qualquer relação de exclusividade com o número diploide dos indivíduos, contrariando dados de Geise *et al.* (2001). Esses autores utilizando sequências do gene *Cit-b* também recuperaram dois cladogramas intraespecíficos para *A. cursor*, um contendo indivíduos com cariótipo $2n=14$ e 15 que designaram como *A. cursor* e outros contendo apenas indivíduos com $2n=16$, que associaram a

um novo táxon, denominado *Akodon aff. cursor*. No entanto, Geise *et al.* (2001) utilizaram indivíduos com $2n=16$ exclusivos do norte de Minas Gerais (localidade 26), da Bahia (localidade 11) e da Paraíba, enquanto as amostras com $2n=14$ e 15 foram encontradas em localidades do sul da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Mais tarde, Nogueira e Fagundes (2008) recuperaram dois agrupamentos Norte e Sul, cada qual contendo exemplares com $2n=14$, 15 e 16, sugerindo que os mesmos não se baseavam em cariótipos exclusivos, e que um viés amostral nos trabalhos prévios poderiam ter levado à uma interpretação equivocada dos dados.

Nossos dados também apoiam a estruturação geográfica em *A. cursor* não relacionada a cariótipos exclusivos, por considerar que: a) em ambos os clados tem-se registro das formas $2n=14$, 15 e 16; b) há registro de simpatria desses três cariótipos em localidades do clado Norte e do clado Sul; c) houve compartilhamento de haplótipos entre indivíduos com os três números diploides para os genes COI e Cit-*b* (**Anexo 2**).

Outros estudos baseados em análises do cariótipo, Fagundes *et al.*, (1997a) utilizaram sondas teloméricas para identificar os mecanismos de alteração dos cromossomos envolvidos na determinação do número diploide e foi proposto que mecanismos envolvendo inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica seriam os responsáveis pela redução do número diploide de 16 para 14 (em homozigose) ou 15 (heterozigose). Apesar disso, notou-se variação na distribuição dos cariótipos: 94,4% das formas $2n=16$ encontram-se localizadas no clado Norte, enquanto 95% das formas $2n=14$ estão localizadas no clado Sul, com a fixação de formas cariotípicas distintas de acordo com o posicionamento geográfico das populações. Esses autores consideraram que as formas cariotípicas tratam-se de polimorfismos intraespecíficos, pois análises da meiose de pares heteromórficos evidenciaram mecanismos genéticos atuando de modo a evitar a formação de gametas desbalanceados, e portanto, não impedindo cruzamentos entre indivíduos de $2n$ distintos.

Taxas de divergência entre os clados Norte e Sul

Em estudos filogeográficos, dois principais aspectos da variabilidade intraespecífica do DNAm_t são considerados: a quantidade de divergência genética entre os haplótipos e a distribuição geográfica dos clados monofiléticos (Avise, 2000). Há exemplos de espécies que exibem padrões bem estruturados de subdivisão de populações, outras que possuem pouca ou

nenhuma estruturação filogeográfica com baixa divergência genética, e algumas ainda que apresentam pouca ou nenhuma estruturação filogeográfica com altos níveis de divergência genética, sendo essa última mais rara (Avise *et al.*, 1987).

Estudos filogeográficos em *A. cursor* realizados com o gene Citocromo *b* (Geise *et al.*, 2001, Nogueira e Fagundes, 2008, Barros *et al.*, 2009, Colombi *et al.*, 2010) tem revelado estruturação geográfica com distância genética considerável entre as populações. No presente estudo, a divergência genética entre os clados Norte e Sul foi de 4,4% para COI e de 2,5% para Cit-*b*. Taxa semelhante de divergência (2,6%) foi encontrada por Valdez e D'Elia (2013) em estudos intrapopulacionais de *A. montensis* com o gene Cit-*b*.

Estudos mais amplos têm detectado que em vertebrados taxas superiores a 8% e 7% para COI e Cit-*b*, respectivamente, estão associadas à divergência interespecífica (Johns e Avise, 1998; Agrizzi *et al.*, 2012; Hebert *et al.*, 2004). Bradley e Baker (2001) afirmaram que, para sequências de Cit-*b*, valores de distância genética entre 2 e 11%, interpretadas conforme a distribuição geográfica, podem indicar populações de uma mesma espécie ou espécies distintas, requerendo investigações mais a fundo para validar ou não o *status* de espécie.

Variação de sequências do gene Cit-*b* em diferentes espécies sul-americanas do gênero *Akodon* revela que intervalo de divergência entre 1% e 8% pode ser encontrado dentro de espécies que apresentam variação geográfica, como é o caso de *A. cursor*, e que essa variação pode chegar a 21% entre espécies desse gênero (Smith e Patton, 1991). Assim, a variação entre os clados Norte e Sul é interpretada como interpopulacional, não descartando que em outras abordagens o isolamento das populações e a tendência ao aumento na diversificação entre os grupos deve ser considerado, exigindo uma interpretação mais ampla sobre a diversificação em *A. cursor*.

Smith e Patton (2007) calcularam que a diversificação entre os clados Sul (por eles chamado de *A. cursor*) e Norte (por eles chamado *A. aff. cursor*) teria ocorrido há 1 Ma. Alguns exemplares designados como *A. aff. cursor* (2n=16) utilizados por esses autores foram utilizados no presente estudo e recuperados como clado Norte. Logo, podemos afirmar que há suporte para a estruturação geográfica proposta por Nogueira e Fagundes (2008) e que 1 Ma é o tempo de divergência entre os clados Norte e Sul.

Os valores de *Fst* entre todas as populações foi elevado (acima de 0,45) e, aliados aos resultados de AMOVA, confirmam o cenário de estruturação geográfica e isolamento

populacional que não corresponde, necessariamente, a um padrão de isolamento por distância, já que exemplares de localidades muito próximas, dentro do intervalo latitudinal 16-18°S foram recuperados em agrupamentos distintos.

Expansão populacional ao sul e equilíbrio ao norte

Nossos dados revelaram valores elevados de diversidade haplotípica ($dH > 0,5$) e nucleotídica ($\pi > 0,005$) para os agrupamentos Norte e Sul, sendo a diversidade haplotípica em populações Sul maior que em Norte. Segundo Grant e Bowel (1998) populações com valores elevados de dH e π podem representar populações com estabilidade populacional e longa história evolutiva, ou ainda podem ter tido contato secundário com outras linhagens.

Sinais de equilíbrio populacional também foram recuperados nas populações Norte a partir da distribuição *mismatch* e dos testes de neutralidade, que embora tenham apresentado valores negativos não tiveram suporte estatístico ($p > 0,05$). Em contrapartida, a distribuição *mismatch* e os valores negativos e significantes de F_s de F_u e D de Tajima se contrapuseram aos dados de dH e π , coincidente com a distribuição bimodal observada. Nesse caso, os elevados valores de dH e π poderiam refletir um contato secundário com outras linhagens, elevando a diversidade dentro de cada curva unimodal. O teste SSD e o índice R de Harpending também são consistentes com a hipótese de equilíbrio populacional ao Norte e expansão ao Sul.

Nesse sentido, o cariótipo contribui para o entendimento desse processo de divergência observado em nível molecular. Estudos têm mostrado que em *A. cursor* o cariótipo $2n=16$ é a condição ancestral sendo a forma que divide com *A. montensis* menor número de rearranjos cromossômicos, quando comparado a $2n=14$, no processo de diferenciação entre essas espécies (Fagundes *et al.*, 1997a). Assim, desde a diversificação de *A. cursor* e *A. montensis*, há cerca de 1,75 Ma (Coyner *et al.*, 2013), linhagens de *A. cursor* ocuparam toda a costa leste brasileira se estabelecendo do Paraná até a Paraíba. Os estoques da forma $2n=16$, a única registrada em populações de Pernambuco e da Paraíba (7-10°S) relevam que estas populações do extremo norte da distribuição da espécie retiveram o cariótipo ancestral da espécie e se encontram, atualmente, geograficamente separadas das demais populações do clado Norte por extensas áreas abertas ao norte da Bahia.

O cariótipo $2n=14$ está presente predominantemente nas populações Sul, logo, os rearranjos cromossômicos que deram origem a forma heterozigota $2n=15$ e à forma $2n=14$

surgiram no centro-sul da área de distribuição da espécie, fixando-se na região do extremo norte do clado sul, no Espírito Santo.

Acredita-se que o surgimento do cariótipo $2n=15$, através de rearranjos complexos envolvendo inversões pericêntricas e fusão cêntrica de dois pares autossômicos (Fagundes *et al.*, 1997a), tenha deflagrado o início de um processo que levou à fixação da forma $2n=14$ ao sul, em sobreposição à forma basal $2n=16$, que tem se mostrado bastante rara e com alguns poucos estoques nos estados de Minas Gerais, São Paulo e/ou Paraná (Manduca, 2008; Yonena-Yassuda, 1979; Fagundes *et al.*, 1998; Sbalqueiro e Nascimento, 1996).

Considerando-se que $2n=14$ é a forma derivada do cariótipo de *A. cursor*, e que essa forma impõe maior distinção genética com *A. montensis* ($2n=24$) nas localidades onde ocorre em simpatria, tem-se maior favorecimento na distinção de ambas espécies, ainda consideradas crípticas.

Recente hipótese, denominada Mata Atlântida, foi proposta para explicar os padrões de distribuição da biodiversidade na Mata Atlântica (Leite *et al.*, 2016). A partir da utilização de modelos de distribuição de espécies com simulações de coalescência baseadas em sequências do gene Citocromo-*b* os autores propuseram que durante o último glacial teria havido expansão da adequabilidade das condições climáticas para a plataforma continental, favorecendo a expansão das florestas nessas áreas e, em consequência, de espécies de marsupiais e roedores a ela associados. Dado que a plataforma continental apresenta grandes extensões (a partir da costa) entre as latitudes 18-26°S, pode-se considerar que populações Sul tiveram ampla área para se expandir durante o último glacial máximo, o que gerou uma assinatura de expansão. A localidade de Una, recuperada como clado Norte está um pouco mais ao norte da latitude 18°S, mas em uma área propícia à imigração das populações em expansão do Sul, causando um contato secundário entre essas populações, o que explicaria o compartilhamento de haplótipos entre Norte (especificamente Una) e Sul, pela elevada diversidade nucleotídica e curva bimodal encontrada no Sul.

A hipótese amplamente utilizada para se compreender a diversidade biológica é a dos Refúgios Pleistocênicos, que prediz o oposto da recém-lançada hipótese da Mata Atlântida. Segundo essa hipótese, os refúgios funcionaram como ilhas de florestas densas e úmidas isoladas por vegetação aberta. Essas florestas se retraíram durante períodos glaciais (formando os refúgios) e se expandiram durante os períodos interglaciais, mais quentes, enquanto a vegetação de áreas abertas se comportou de maneira antagônica (Carnaval e Moritz, 2008).

Trabalhos de filogeografia da Mata Atlântica têm apontado três áreas de descontinuidade, associadas a refúgios florestais pleistocênicos, recorrentes para grupos diferentes de organismos: abelhas (Batalha-Filho *et al.*, 2010), anfíbios (Carnaval *et al.*, 2009; Thomé *et al.*, 2010), répteis (Pellegrino *et al.*, 2005; Graziotin *et al.*, 2006), aves (Cabanne *et al.*, 2007, 2008), morcegos (Martins *et al.*, 2007) e plantas (Ribeiro *et al.*, 2010). Essas descontinuidades ocorrem: a) coincidente com o Rio São Francisco (entre Bahia e Pernambuco); b) coincidente com o Rio Doce (abrangendo o Espírito Santo e Minas Gerais); e c) próximo ao Vale Paraíba do Sul (em São Paulo) (Carnaval *et al.*, 2009). No entanto, nossos dados de diferenciação entre Norte e Sul não são coincidentes com qualquer dessas descontinuidades, muito embora dentro do clado Norte seja preciso investigar se há diferenças entre as populações isoladas da Paraíba e Pernambuco daquelas localizadas na Bahia e norte de Minas Gerais. Além disso, Colombi *et al.* (2010) já descartaram a ação do Rio Doce atuando como barreira ao fluxo gênico em *A. cursor*.

Outras hipóteses que buscam explicar o processo de diversificação das espécies são: 1) a hipótese de rios como barreira ao fluxo gênico para animais terrestres, proposta inicialmente por Wallace (1852), na qual rios surgem como barreira primária de eventos vicariantes que levam a especiação (Patton *et al.*, 2000); 2) a hipótese de diversificação por tectonismo (Cracraft, 1985; Silva e Straube, 1996), na qual o evento de especiação ocorre como consequência de atividade tectônica que leva à vicariância entre populações de uma espécie; 3) a hipótese de gradientes ecológicos (Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001), na qual a diversificação pode ocorrer em parapatria, na qual a diferenciação entre espécies ou linhagens pode ocorrer devido a diferentes pressões seletivas atuantes em ambientes diferentes e adjacentes.

A hipótese de rios como barreiras foi proposta a partir estudos com primatas da Amazônia, envolvendo rios amazônicos profundos e de grande extensão entre as margens. Em *A. cursor* observou-se que a estruturação genética encontrada corresponde a dois clados delimitados pelo rio, muito embora esse rio apresente menores dimensões e esteja associado a separação de cadeias de montanhas, ao contrário dos rios amazônicos que são meândricos e de maiores extensões entre as margens. No entanto, o que aqui se propõe não é que o rio (ou Vale) Jequitinhonha seja o responsável pela origem da diversificação em *A. cursor*, mas que veio a se tornar uma barreira secundária de impedimento ao fluxo gênico, promovendo a diferenciação das populações do Norte e Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrizzi J, Loss AC, Farro APC, Duda R, Costa LP and Leite YLR (2012) Molecular diagnosis of Atlantic Forest mammals using mitochondrial DNA sequences: Didelphid Marsupials. *The Open Zoology Journal* 5:2-9.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA and Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Barros MC, Sampaio I, Schneider H and Langguth A (2009) Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). *Iheringia, Série Zoologia* 99(4): 373-380.
- Benansson D, Zhang D-X, Harl DL and Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 16:314-321.
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY and Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: *Molecular genetic analyses of populations. A practical Approach*. A.R. Hoelzel (Ed.). IRL Press, Oxford, pp 225-269.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG and Fernandes-Salomão TM (2010) Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41:534-547.
- Batalha-Filho H (2013) Padrões e processos de diversificação em aves da Amazônica e da Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Batalha-Filho H, Irestedt M, Fjeldsa J, Ericson PGE, Silveira LF and Miyaki CY (2013) Molecular systematics and evolution of the *Synallaxis ruficapilla* complex (Aves: Furnariidae) in the Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67:86-94.
- Bradley RD and Baker RJ (2001) A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82:960-973.

- Cabanne GS, Santos FR and Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91:73-84.
- Cabanne GS, d'Horta FM, Sari HER, Santos FR and Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves:Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 49(3):760-773.
- Carnaval AC and Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35(7):1187-1201.
- Carnaval A, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT and Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323:785–789.
- Cerqueira R, Gentile R, Fernandez FAZ and D'Andrea OS (1993). A five-year population study of an assemblage of small mammals in southeastern Brazil. *Mammalia* 57:507–517.
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):785-789.
- Coyner BS, Braum JK, Mares MA and Van Den Bussche RA (2013) Taxonomic validity of species groups in the genus *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). *Zoologica Scripta* 42(4):335-350.
- Drummond AJ, and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AM and Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.
- Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J and Yonenaga-Yassuda Y (1997b) ZOO-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology

- between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 78:224-228.
- Fagundes V, Christoff AU and 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.
- Fávero C and Monteiro FT (2014) Disputas territoriais no Vale do Jequitinhonha: uma leitura pelas transformações nas paisagens. *Agriculturas* 11(3):7-15.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Geise L, Smith MF and Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82(1):92-101.
- Geise L, Moraes DA dan Silva HS (2005) Morphometric differentiation and distributional notes of three species of *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae, Akodontini) in the Atlantic coastal area of Brazil. *Arquivos do Museu Nacional* 63(1):63-74.
- Geise L (2012) *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian species* 44(893):33-43.
- Gentile R, D'Andrea OS and Cerqueira R (1997) Home rangers of *Philander frenata* and *Akodon cursor* in a Brazilian Restinga (Coastal Shrubland). *Mastozoologia Neotropical* 4(2):105-112.
- Grant WS and Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Genetics* 89:415-426.

- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S and Bonatto S (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes:Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15:3969-3982.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH and Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:14812–14817.
- Johns GC and Avise J (1998) Tests for ancient species flocks based on molecular phylogenetic appraisals of *Sebastes* rockfish and other marine fishes. *Evolution* 52:1135-1146.
- 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.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6):1695-1701.
- Leite ULR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M and Pardini R (2016) Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(4):1008-1013.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Maia V and Langguth A (1981) New karyotypes of Brazilian akodont rodents with notes on taxonomy. *Sonderdruck-Zeitschrift fur Saugetierkunde* 46: 241-289.
- Martins FM, Ditchfield AD, Meyer D and Morgante JS (2007) Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45(4):372–378.
- Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA. Pp 1-8.

- Nogueira CDA (2005) Uma análise filogeográfica das espécies do 'complexo *Akodon cursor*' (Rodentia, Sigmodontinae) utilizando dados moleculares e cariotípicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Nogueira CDA and Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL and Fagundes V (2004) Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 17:5-33.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yonenaga-Yassuda Y and Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:13-26.
- Pereira LG and Geise L (2007) Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* 67(3):509-518.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martens AC, Pinzon FJ and HI Rota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications form conservation. *Biological Conservation* 142:1141-1153.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos AC and Lovato MB (2010) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic forest. *Heredity* 106(1):46-57.
- Rieger TT, Langguth A and Weimer TA (1995) Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* Species Group (Rodentia-Cricetidae). *Biochemical Genetics* 33:283-295.
- Sbalqueiro IJ and Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19(4):565-569.
- Smith MD and Patton JL (1993) The Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biology Journal Linnean Society* 50:149-177.

- Smith MF and Patton JL (2007) Molecular Phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. In: Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J and Patton JL (eds) *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Publications in Zoology, pp. 827-858.
- Souza JVA (1997) Luzes e sombras sobre a história e cultura do Vale do Jequitinhonha. In: Santos, GR (Org). *Trabalho, Cultura e Sociedade no Norte/Nordeste de Minas: Considerações a partir das Ciências Sociais*. Montes Claros, MG. Best Comunicações e Marketing.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Thomé MT, Zamudio KR, Giovanelli JG, Haddad CF, Baldissera FA Jr and Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55(3):1018-1031.
- Vaidya G, Lohman DJ and Meier R (2011) SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character *set* and codon information. *Cladistics* 27:171-180.
- Vasconcelos MF and D'Angelo-Neto S (2006) Padrões de distribuição e conservação da avifauna na região central da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes, Minas Gerais, Brasil. *Cotinga* 28:27-44.
- Vences M, Thomaas M, Van der Meijden A, Chiari Y and Vieites DR (2004) Comparative performance of 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2:5.
- Winge H (1987) Jordfundne og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien: med udsigt over gnavernes indbyrdes slægtskab. *E Museo Lundii* 1(3):1-200.

CAPÍTULO 2

CRUZAMENTOS EXPERIMENTAIS NÃO DEMONSTRAM ISOLAMENTO REPRODUTIVO EM POPULAÇÕES DE *AKODON CURSOR* SEPARADAS POR QUEBRA FILOGEOGRÁFICA

RESUMO

Akodon cursor se distribui pela costa Atlântica brasileira e apresenta diversidade cariotípica elevada, com 31 cariótipos e três números diploides ($2n=14$, 15 e 16). O cariótipo $2n=16$ carrega os pares 1 e 3 submetacêntricos, $2n=14$ possui um grande par metacêntrico formado pela fusão dos pares 1 e 3 e $2n=15$ apresenta a forma intermediária, carregando um cromossomo metacêntrico grande e um de cada cromossomo 1 e 3. Estudos meióticos sugerem que indivíduos $2n=15$ são férteis e capazes de recuperar as formas homozigotas quando se inter cruzam. A partir de sequências gênicas dois agrupamentos monofiléticos foram recuperados para a espécie, clados Norte e Sul, cada qual representado por indivíduos com as três formas cariotípicas. Considerando a divergência genética entre Norte e Sul, a evidente quebra filogeográfica e o compartilhamento das formas cariotípicas em frequências distintas em cada clado, algumas questões foram levantadas a respeito dos fatores que mantêm a distinção molecular das populações e que papel o cariótipo desempenharia na diferenciação entre Norte e Sul. No presente estudo, alguns parâmetros da reprodução de *A. cursor*, como sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN), foram avaliados considerando diferentes combinações de formas parentais ($2n$ e clado) em cruzamentos experimentais entre indivíduos coletados na natureza (matrizes) em localidades dos clados Norte e Sul, e seus descendentes gerados em cativeiro. Os cruzamentos foram realizados entre julho/2013 a agosto/2015, a partir de uma amostra de 33 indivíduos matrizes e seus descendentes de gerações F_1 , F_2 e F_3 . Os resultados foram analisados considerando-se os cruzamentos entre indivíduos de mesmo clado (intraclado) e clados distintos (interclado), e entre indivíduos com números diploides diferentes e teve como objetivo verificar a existência isolamento reprodutivo entre clados Norte e Sul e/ou entre as formas $2n=14$ e $2n=16$. Foram realizados 185 cruzamentos, com sucesso reprodutivo (SR) total de 45,4%, média geral de 3,69 descendentes por ninhada e total de 310 descendentes nascidos em cativeiro. Indivíduos $2n=15$ são férteis, porém com SR reduzido, principalmente quando a fêmea é portadora dessa condição heterozigota. Nenhum cruzamento entre $2n=15$ e $2n=16$ gerou descendentes e o SR foi significativamente maior quando indivíduos $2n=15$ inter cruzaram com indivíduos $2n=14$. Não houve variação de tamanho da ninhada (TN) nas diferentes combinações entre os cariótipos. Indivíduos com $2n=15$ formam gametas $n=7$ e $n=8$ e possuem o potencial de recuperar as formas $2n=14$ e $2n=16$. Cruzamentos entre indivíduos de mesmo número diploide tendem a ser mais bem sucedidos que entre indivíduos de números diploides distintos. O SR foi menor a medida que descendentes gerados em cativeiro

participaram como parentais em novos cruzamentos, sendo essa diferença significativamente maior em cruzamentos intraclado Sul. Os cruzamentos interclado não mostraram diferenças significativas no SR e TN quando comparados com os cruzamentos intraclado, embora os descendentes de cruzamentos interclado que participaram como parentais em novos cruzamentos apresentaram maior SR e TN que exemplares intraclado. Nossos dados são inéditos e comprovam a fertilidade reduzida dos indivíduos com $2n=15$, sendo que essa condição quando ocorre nas fêmeas é mais prejudicial do que quando está presente nos machos.

INTRODUÇÃO

Akodon cursor (Winge, 1887) é uma espécie de roedor da família Sigmodontinae que apresenta diversidade molecular e cariotípica elevadas, e está distribuída ao longo da costa leste brasileira, do norte da Paraíba até o norte do Paraná (Maia e Langguth, 1981; Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Gentile *et al.*, 1997; Fagundes *et al.*, 1998; Paresque *et al.*, 2004; Nogueira e Fagundes, 2008; Barros *et al.*, 2009; Colombi, 2010).

O mapeamento da diversidade genética com estudos de alozimas (Rieger *et al.*, 1995) e de sequências do gene mitocondrial Citocromo *b* (Geise *et al.*, 2001; Nogueira e Fagundes, 2008) confirmam a estruturação em dois grupos definidos geograficamente. O grupo Norte é formado por populações localizadas entre as latitudes 7-18°S, e o clado sul é formado por populações compreendidas entre as latitudes 16-26°S (Cap.1).

Do ponto de vista cariotípico, já foram descritos três números diploides ($2n=14$, 15 e 16) e nove números de braços autossômicos (NF=18 a 26), que combinados resultaram em 31 cariótipos distintos (Fagundes *et al.*, 1998 ; Pereira e Geise, 2007; Colombi, 2010). Os números diploides variam devido a um rearranjo complexo envolvendo inversões pericêntricas e fusão cêntrica dos pares submetacêntricos médios 1 e 3, gerando um par de metacêntrico grande (1+3). O cariótipo básico com $2n=16$ possui os pares 1 e 3, $2n=14$ possui o par metacêntrico grande 1+3 e $2n=15$ possui um cromossomo 1+3 e cada um dos cromossomos 1 e 3. Os pares 2, 4 e 6 variam em decorrência de inversões pericêntricas convertendo as formas meta ou submetacêntricas em acrocêntricas, sendo possível encontrar pares acrocêntricos, heteromórficos e metacêntricos. O uso de padrões de bandeamento G e de hibridação de sondas teloméricas permitiu identificar completa homologia entre os cariótipos de 14, 15 e 16, sugerindo $2n=15$ como a condição intermediária, heterozigota para o rearranjo envolvendo os pares 1 e 3. A forma $2n=16$ associada aos pares 2, 4 e 6 sub/metacêntrica constitui o cariótipo ancestral da espécie (Fagundes *et al.*, 1997a, 1997b).

Embora a variação cariotípica ocorra ao longo da distribuição da espécie, há registros de simpatria envolvendo dois ou mais números diploides: $2n=14$, 15 e 16 em Una, Bahia (clado Norte), em Iguape e Cananéia, São Paulo e na Baía de Guaraqueçaba, Paraná (clado Sul) (Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Fagundes *et al.*, 1998). Os cariótipos com $2n=14$ e $2n=15$ ocorrem em simpatria em São Paulo e Rio de Janeiro (Yonenaga-Yassuda, 1979; Fagundes *et al.*, 1998) e as formas $2n=14$ e $2n=16$ em Minas Gerais (Manduca, 2008; Colombi, 2010). Em populações da Paraíba e de Pernambuco só há registro da forma $2n=16$ (Maia e Langguth,

1981; Fagundes *et al.*, 1998; Rieger *et al.*, 1995; Oliveira e Langguth, 2004), enquanto $2n=14$ é a forma exclusiva no Espírito Santo (Paresque *et al.*, 2004; Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010).

Estudos meióticos sugerem que os portadores da forma $2n=15$ não apresentam problemas decorrentes de segregação desigual dos cromossomos 1, 3 e 1+3 (que se organizam como um trivalente na prófase I), ou desbalanço na frequência de formação de células em metáfase II com $n=7$ e $n=8$ (Yonenaga-Yassuda, 1979). Os portadores de pares heteromórficos 2, 4 e 6 também não sofrem prejuízos na formação do gameta devido a ajuste sináptico ou supressão de *crossing over* em segmentos invertidos (Fagundes *et al.*, 1998). Baseando-se nesses achados celulares, foi proposto que os indivíduos $2n=15$ seriam férteis, com capacidade de se inter cruzarem e cruzarem com as formas homomórficas, gerando descendentes férteis e garantindo a manutenção dos níveis elevados de polimorfismos cariotípicos. Esse conjunto de evidências deu suporte à proposta de que todas as populações, independente das formas cariotípicas variantes e da diversidade molecular, pertenciam à única espécie, *A. cursor*.

Contudo, a diversificação genética de *A. cursor* em clados Norte e Sul (Cap. 1) sugere que há fator(es) que impede(m) o cruzamento indistinto entre essas populações. Devido à ocorrência das três formas cariotípicas nos dois clados, acreditava-se que o cariótipo não teria influência sobre essa diversificação (Nogueira e Fagundes, 2008), muito embora haja diferença na frequência com que as formas cariotípicas se distribuem ao longo da área de ocorrência da espécie (Fagundes *et al.*, 1998).

Estudos envolvendo cruzamentos em cativo tem potencial de revelar a capacidade de geração de descendentes e avaliar potenciais isolamentos reprodutivos pré e pós-zigóticos, capazes de contribuir para o entendimento do processo de diversificação genética em *A. cursor*. Sbalqueiro e Nascimento (1996) mencionaram a realização de cruzamentos entre indivíduos com $2n=15$, recuperando as três formas cariotípicas. Os primeiros dados da literatura que apresentam o padrão de segregação de homólogos, baseado em cruzamentos experimentais de indivíduos de São Paulo e Rio de Janeiro com $2n=14$ e diferentes heteromorfismos dos pares 2 e 4, mostraram um padrão mendeliano de segregação dos cromossomos (Fagundes *et al.*, 1998). Ainda, há registros de cruzamentos experimentais em *A. cursor* de populações do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (clado Sul), porém voltados para a compreensão do padrão reprodutivo da espécie (Pereira *et al.*, 1993; Gentile *et al.*, 1997; Bergallo e Magnusson, 1999; D'Andrea *et al.*, 1999; Gentile *et al.*, 2000; Feliciano *et al.*, 2002), mas em nenhum desses

casos foi mencionado o cariótipo dos espécimes que participaram dos experimentos ou da prole gerada.

Ante o exposto, o presente estudo verificou se a origem geográfica ou o número diploide do parental influencia no sucesso reprodutivo e tamanho da ninhada em *A. cursor*, utilizando-se cruzamentos experimentais entre indivíduos coletados na natureza e seus descendentes gerados em cativeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram realizadas cinco excursões para coleta de animais vivos, cada qual com 14 dias de duração: duas campanhas em Una/Ba, uma campanha para Iguape/SP, duas campanhas para Cananéia e Ilha Comprida/SP entre os períodos de maio/2013 a junho/2014. Outros colaboradores contribuíram fornecendo exemplares vivos coletados em quatro localidades no Espírito Santo: Castelo, Santa Teresa, Guarapari, Domingo Martins (**Figura 2.1, Anexo 3**). No total, 33 indivíduos matrizes (M) de *A. cursor* foram utilizados como matrizes nos cruzamentos experimentais, sendo 20 exemplares do norte em (Una, Bahia) e 13 exemplares de quatro municípios do Espírito Santo, totalizando 21 machos e 12 fêmeas (**Anexo 4**).

Cariótipo

A informação cariotípica de todos os espécimes envolvidos em cruzamentos foi obtida a partir de células de linfócitos cultivadas *in vitro* (com manutenção do animal vivo) ou de medula óssea (com eutanásia do animal), seguindo protocolos adaptados de Rissino (2002) e Fagundes *et al.* (1998), respectivamente. Cruzamentos específicos, incluindo parentais com heteromorfismos dos pares 1/3, 2 e 4, foram utilizados para avaliar o padrão de segregação desses pares.

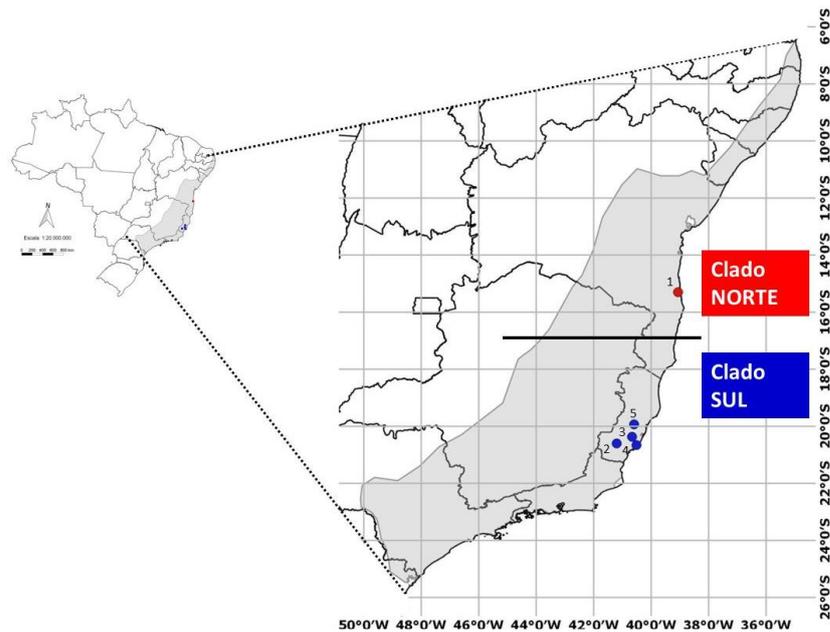


Figura 2.1 - Mapa de distribuição dos exemplares de *A. cursor* representativos do clado Norte (círculo vermelho) e do clado Sul (círculos azuis) utilizados como matriz nos cruzamentos experimentais. O traço horizontal representa a quebra filogeográfica e a área em cinza corresponde aos limites de ocorrência da espécie segundo IUCN. Para mais detalhes sobre as localidades vide **Anexo 3**.

Cruzamentos Experimentais

As condições de manutenção e manuseio dos exemplares, assim como a realização dos cruzamentos experimentais em cativeiro foram avaliadas e aprovadas pelo Comitê de Ética da UFES (Protocolo 07/2012). Os dados aqui incluídos envolveram experimentos realizados entre julho de 2013 a agosto de 2015. As observações de sobrevivência se estenderam até dezembro de 2015. Os cruzamentos experimentais continuam a ser realizados na Sala de Experimentação Animal do Laboratório de Genética Animal da UFES (LGA) visando dar continuidade aos estudos nessa área.

A temperatura foi mantida em $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e o ciclo de claro/escuro foi o natural da cidade de Vitória, ES. A água foi fornecida *ad libitum* e a dieta dos animais foi baseada em laranja e ração específica para roedores. Cada indivíduo foi mantido em uma caixa de polipropileno de 30x20x13 cm forrada com maravalha, enquanto os casais para copular e as fêmeas supostamente prenhes ou as lactantes permaneciam em caixas de 49x34x16 cm, também forradas com maravalha e algodão para a confecção de ninhos.

A junção dos casais ocorreu no início da manhã e o comportamento dos indivíduos foi acompanhado pelas 5 horas seguidas, em intervalos de 30 minutos, para verificar a aceitação mútua e identificar possíveis comportamentos agressivos. No caso de agressividade excessiva ainda na primeira hora após a união do casal, os mesmos foram separados e retornavam para caixas de contenção individualizadas. Não havendo sinais de agressividade, o casal era mantido junto por um período de 6 a 8 dias, com monitoramento diário. Após esse período, o macho era retirado do contato com a fêmea, retornando para caixa de contenção individual, enquanto a fêmea permanecia na caixa de cópula sob monitoramento por até 21 dias, tempo superior ao estimado para a gestação na espécie (Pereira *et al.*, 1993). A partir do 14º dia de separação do macho, as caixas onde estavam as fêmeas supostamente prenhes foram checadas de uma a duas vezes por dia. Na ausência de filhotes, a fêmea também retornou para a caixa individual de contenção. Havendo filhotes, registrou-se a data de nascimento, o número de crias, o número do cruzamento e os dados de origem e cariótipo dos parentais. A prole permaneceu, no mínimo, 21 dias junto da mãe até o completo desmame, após o qual cada filhote foi transferido para caixa individual de contenção, com identificação do sexo e do cruzamento do qual se originou.

Foram realizados 185 cruzamentos considerando-se a localidade de origem (Norte e Sul) e o cariótipo ($2n=14$, 15 ou 16) de cada parental. Outros sete cruzamentos realizados não foram computados nas análises pois os parentais não tiveram o cariótipo determinado (cruzamento intraclado Norte nº77 e cruzamentos interclado nºs 20, 22, 33, 46, 47 e 48). Dentre esses cruzamentos apenas Norte 77 e Interclado 48 geraram descendentes, sendo 3 machos e um casal, respectivamente. Esses cinco exemplares também não foram incluídos nas análises estatísticas (**Anexo 5**)

Do total de 81 possíveis combinações de cruzamentos realizáveis considerando variação do número diploide e origem dos parentais, 26% delas foram realizadas (**Tabela 2.1**). Descendentes F_1 , F_2 e F_3 nascidos em cativeiro também participaram de cruzamentos após completarem 90 dias de vida, tempo estimado para se alcançar a maturidade sexual (Gentile *et al.*, 2000). Para cruzamentos intraclado Norte adotou-se a sigla “N”, para intraclado Sul a sigla “S” e para cruzamentos interclado a sigla “E”.

Estimativa de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN)

O SR foi definido pela capacidade do casal gerar pelo menos um descendente após uma tentativa de cruzamento, considerando como previsão de nascimento até 28 dias a contar do

primeiro dia de contato entre os parentais. A taxa de SR foi calculada pela razão entre número de cruzamentos que geraram filhotes e número total de cruzamentos realizados.

Para o TN, considerou-se o número de filhotes registrado na primeira checagem diária das caixas de contenção, sempre no início da manhã, desconsiderando as possíveis mortes por canibalismo ou outro fator ocorridas no intervalo entre checagens.

Tabela 2.1. Número de cruzamentos realizados em *Akodon cursor*, considerando a origem do parental e cariótipos (2n=14, 15 e 16). Em preto, cruzamentos intraclados entre indivíduos de mesmo 2n; em cinza, cruzamentos intraclados entre indivíduos de 2n diferente e em branco, cruzamentos entre indivíduos de clados distintos.

Parentais		♂ N			♂ S			♂ E			Total
		14	15	16	14	15	16	14	15	16	
N ♀	14	32	13	11	14			3			73
	15	5	17	3	3						28
	16										
S ♀	14	3	5	2	42			2	1		55
	15										
	16										
E ♀	14	4	1		3			19	1		28
	15							1			1
	16										
Total		44	36	16	62			25	2		185

Norte - N, Sul - S ou descendente de cruzamento intercalado - E

Diferenças significativas de SR entre os grupos, baseados em clados e cariótipos, foram estimadas usando o teste do χ^2 . Para o TN, foram calculadas média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e realizada análise de variância (ANOVA) a fim de identificar diferenças significativas entre grupos. O nível crítico de significância considerado em ambos os testes foi de 5% e as análises realizadas no software SPSS®.

Verificando a influência das gerações no SR e TN

Considerando que descendentes F₁, F₂ e F₃ foram incluídos no cálculos de SR e TN, inicialmente foi avaliado se esses valores foram influenciados pelas gerações quando parentais matrizes e descendentes (em gerações diferentes) participavam dos cruzamentos. Para tanto, nessa análise, utilizou-se somente cruzamentos nos quais ambos parentais possuíam 2n=14, visando verificar a influência das gerações nos resultados. Os parentais foram classificados como matrizes (M), descendentes intraclado, ou seja, prole de cruzamentos intraclado (Norte:

F₁, F₂ ou F₃, e Sul: F₁) ou descendentes interclado, ou seja, prole de cruzamentos entre indivíduos dos clados Norte e Sul (M Norte, F_{1/2/3} Norte, M Sul, F₁ Sul).

Verificando a influência do cariótipo no SR e TN

Nessa análise as combinações de cruzamento levaram em consideração o cariótipo e o clado de origem dos indivíduos. Assim, os parentais de cada cruzamento foram identificados como 14^N (indivíduo 2n=14 coletado na natureza no clado Norte ou resultado de cruzamento intraclado Norte) e 14^S (indivíduo 2n=14 coletado na natureza no clado Sul ou resultado de cruzamento intraclado Sul), e assim por diante. Para as formas 2n=15 e 2n=16, participaram dos cruzamentos apenas indivíduos 15^N e 16^N, já que indivíduos 15^S e 16^S não foram obtidos na natureza ou em cativeiro. Descendentes de cruzamentos (F₁, F₂ ou F₃) cujos parentais eram de clados distintos (interclado), foram designados como 14^E, 15^E ou 16^E.

RESULTADOS

Dentre os 20 indivíduos matrizes de Una/BA (clado Norte) registrou-se as formas 2n=14 (85%), 2n=15 (10%) e 2n=16 (5%), enquanto os 13 indivíduos do clado Sul apresentaram 2n=14. Embora tenha-se feito grande esforço de coleta, não foram obtidos indivíduos com 2n=15 e 2n=16 em localidades do sul onde havia registro de sua ocorrência (Iguape e Cananéia, SP). Assim, estavam disponíveis para os cruzamentos experimentais matrizes 14^N, 15^N, 16^N e 14^S.

Dos 185 cruzamentos utilizados nas análises, 81 foram intraclado Norte, 42 intraclado Sul e 62 interclado, totalizando 310 descendentes dos quais 286 concluíram o desmame e puderam ser sexados (**Tabelas 2.1 e 2.2**). Dos 81 cruzamentos intraclado Norte nasceram 115 descendentes, dos quais 80,0 % concluíram a lactação, e dos 42 cruzamentos intraclado Sul nasceram 56 filhotes, com taxa de sobrevivência após a lactação de 91,1%. De 62 cruzamentos interclado nasceram 139 exemplares, sendo que 95,7% completaram o desmame.

Dos 81 cruzamentos intraclado Norte, 19 foram realizados entre matrizes e 62 envolveram descendentes F₁, F₂ e F₃ (entre si ou combinados com matrizes). Dos 42 cruzamentos intraclado Sul, 19 ocorreram apenas entre matrizes e nos demais participaram indivíduos gerados em F₁ combinados entre si ou com um parental matriz. Em cruzamentos interclado, 11 casos ocorreram entre matriz Norte x matriz Sul, e em 51 casos participaram como parentais indivíduos F₁, F₂ e F₃ do clado Norte, F₁ do clado Sul e também descendentes

interclado F₁ e F₂, em várias combinações. Foram gerados 139 descendentes, dos quais 133 concluíram o desmame.

Dos descendentes que tiveram o cariótipo determinado, 90,1 % possuíam 2n=14, 9,5% apresentaram 2n=15 e 0,4% tinham 2n=16. Destes, 97 participaram como parentais em cruzamentos experimentais intra e interclado após atingirem a maturidade sexual (**Tabela 2.2**).

Padrão de segregação dos pares heteromórficos

Foram avaliados os padrões de segregação dos pares heteromórficos 2, 4, 1 e 3 (**Tabela 2.3**). Dentre os descendentes de cruzamentos 2n=14x2n=14, 230 apresentaram 2n=14 e uma fêmea (0,4%) apresentou 2n=13 decorrente de monossomia do cromossomo X. Do mesmo modo, todos os cruzamentos entre parentais 2n=14 e 2n=16, resultaram em 100% da prole com 2n=15.

Tabela 2.2 – Número de indivíduos matriz, descendentes gerados em cativeiro e número de parentais envolvidos nos cruzamentos de *Akodon cursor* considerando clado de origem (Norte, Sul e Interclado) e número diploide (2n). ND=número diploide não determinado.

Clado	2n	Matriz*		Descendente*	
		n	Participaram como parental em cruzamentos	Vivos após desmame (21 dias) ¹	Participaram como parental em cruzamentos
Norte	14	17	16	62 (-2)	26
	15	2	2	21	13
	16	1	1	1	-
	ND	-	-	10	3
Sul	14	13	13	51	16
Interclado	14	-	-	118	33
	15	-	-	3	3
	ND	-	-	15 (-3)	3
TOTAL		33	32	281/276	97

¹ = exemplares, indicados entre parêntesis, que ficaram de fora da análise estatística pelo fato do cariótipo dos parentais não ter sido determinado.

Dos cruzamentos do clado Norte envolvendo parentais fêmea 2n=14 e macho 2n=15, 20% da prole apresentou 2n=15, 27% apresentou 2n=14 e 43% dos descendentes não tiveram o cariótipo analisado. Dos cruzamentos Interclado envolvendo parentais fêmea 2n=14 e macho 2n=15, 28% apresentaram 2n=15, 28% apresentou 2n=14 e 46% dos descendentes não tiveram o cariótipo analisado. A proporção de descendentes 2n=14 e 2n=15 atendeu a relação de 1:1, obedecendo ao padrão de segregação mendeliano.

Por outro lado, no caso específico de cruzamentos intraclado Norte envolvendo fêmea 2n=15 e macho 2n=14, foram gerados 62% de descendentes com 2n=14 e 25% com 2n=15,

associado a um desvio da proporção 1:1 para maior número de machos. Porém, cabe destacar que esse arranjo analisado gerou somente 8 descendentes e o desvio na proporção pode ser estocástico. Apenas um cruzamento $2n=15 \times 2n=15$ teve sucesso, e nele foram gerados dois filhotes, um macho com $2n=15$ e uma fêmea com $2n=16$ (**Tabela 2.3**).

Em cruzamentos em que foi possível avaliar a segregação dos pares 2 e 4 (**Tabela 2.4**) observou-se que a segregação dos pares heteromórfico seguiu um padrão mendeliano, com segregação independente de cada par.

Tabela 2.3 – Proporção de descendentes considerando a segregação dos cromossomos 1, 3 e 1+3 conforme clado de origem (Norte, Sul e Interclado) e número diploide ($2n$) dos parentais. ND=número diploide não determinado.

Clado	Parental		Prole		
	fêmea	macho	$2n$	n	razão sexual
Norte	14	14	$2n=14$	50 (98%)	31M, 19F
			$2n=13$ (X0)	1 (2%)	1F
	14	15	$2n=15$	3 (20%)	2M, 1F
			$2n=14$	4 (27%)	2M, 3F
	14	16	ND	7 (46%)	2M, 5F
			$2n=15$	15 (100%)	9M, 6F
	15	14	$2n=14$	5 (62,5%)	1M, 4F
			$2n=15$	2 (25%)	1M, 1F
	15	15	ND	1 (12,5)	1M
			$2n=16$	1 (50%)	1F
Sul	14	14	$2n=15$	1 (50%)	1M
			$2n=14$	51 (100%)	28M, 19F
Interclado	14	14	$2n=14$	129 (98%)	66M, 63F
			$2n=15$	2 (28%)	1M, 1F
	14	15	$2n=14$	2 (28%)	1M, 1F
			ND	3 (43%)	1M, 2F

CRUZAMENTOS CONSIDERANDO A INFLUÊNCIA DAS GERAÇÕES NO SR E TN

Inicialmente, pretendeu-se avaliar se o SR e o TN sofriam alteração caso os parentais fossem indivíduos matrizes ou descendentes gerados em cativeiro. Para tanto, analisamos os cruzamentos envolvendo matrizes e todos os descendentes, considerando a origem dos parentais, sem considerar variações cariotípicas.

Para que eventuais interferências dos diferentes cariótipos não alterassem o resultado, essa análise envolveu somente indivíduos com $2n=14$. Os cruzamentos foram organizados em

33 grupos de acordo com o clado de origem de cada parental (intraClado – A1 a A11 e intErclado – E1 a E22) (**Tabela 2.5**).

Tabela 2.4 – Proporção de descendentes considerando a segregação dos cromossomos 2 e 4 em cruzamentos organizados por clado de origem e número diploide (2n) dos parentais. A=par de cromossomos acrocêntricos; S=par de cromossomos submetacêntricos; M=par de cromossomos metacêntricos; H=par heteromórfico, formado por um cromossomo acrocêntrico e outro metacêntrico ou submetacêntrico.

Clado	Parentais		prole	%	
	♀	♀			
Norte	2n=14, 2A, 4M	2n=14, 2H, 4A	2n=14, 2H, 4H	2	66
			2n=14, 2H, 4H	1	33
	2n=15, 2H, 4H	2n=14, 2A, 4M	2n=15, 2A, 4H	1	33
			2n=14, 2A, 4M	2	66
	2n=14, 2A, 4M	2n=15, 2H, 4H	2n=14, 2A, 4H	1	50
			2n=15, 2H, 4H	1	50
	2n=15, 2H, 4H	2n=14, 2H, 4M	2n=14, 2A, 4H	2	50
			2n=14, 2S, 4H	1	25
			2n=15, 2H, 4M	1	25
	2n=15, 2S, 4H	2n=15, 2H, 4H	2n=15, 2H, 4M	1	50
	2n=14, 2H, 4H	2n=15, 2A, 4H	2n=16, 2H, 4A	1	50
			2n=15, 2A, 4A	2	33
	2n=14, 2H, 4H	2n=16, 2H, 4H	2n=14, 2A, 4A	1	66
	2n=14, 2A, 4M	2n=14, 2H, 4A	2n=15, 2S, 4H	1	100
2n=14, 2H, 4H	2n=16, 2H, 4H	2n=14, 2H, 4H	2	50	
		2n=14, 2A, 4H	2	50	
		2n=15, 2A, 4H	1	50	
		2n=15, 2S, 4A	1	50	
Interclado	2n=14 ^N , 2H, 4H	2n=14 ^S , 2A, 4A	2n=14, 2A, 4A	2	50
			2n=14, 2A, 4H	1	25
			2n=14, 2H, 4A	1	25
	2n=14 ^S , 2H, 4H	2n=14 ^N , 2A, 4M	2n=14, 2A, 4H	1	50
	2n=14 ^S , 2H, 4H	2n=16 ^N , 2H, 4H	2n=14, 2H, 4H	1	50
2n=14 ^S , 2H, 4H	2n=16 ^N , 2H, 4H	2n=15, 2H, 4H	1	100	

Tabela 2.5 – Sucesso Reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) de indivíduos matriz (M) e de descendentes gerados em cativeiro (F_1 , F_2 , F_3) com $2n=14$ que participaram como parentais de cruzamentos intraculado (A) e interclado (E).

TIPO		CRUZAMENTOS				TAMANHO NINHADA			
		$\text{♀} \times \text{♂}^1$	TOTAL	SEM FILHOTE	COM FILHOTE	SR ²	TOTAL	MÉDIA (D.P)	MÍN-MÁX
INTRACLADO	NORTE	A1	$M^N \times M^N$	13	4	9	69,23%	29	2-5
		A2	$F_1^{NxN} \times M^N$	6	2	4	66,67%	15	2-5
		A3	$F_1^{NxN} \times F_1^{NxN}$	1	1	0	0,00%	0	-
		A4	$F_2^{NxN} \times M^N$	8	5	3	37,5%	11	2-5
		A5	$M^N \times F_2^{NxN}$	1	1	0	0,00%	0	-
		A6	$F_1^{NxN} \times F_2^{NxN}$	2	1	1	50,00%	1	1
		A7	$F_2^{NxN} \times F_3^{NxN}$	1	0	1	100,0%	4	4
	SUL	A8	$M^S \times M^S$	19	8	11	57,89%	39	1-6
		A9	$F_1^{SxS} \times M^S$	12	10	2	16,67%	11	4-7
		A10	$M^S \times F_1^{SxS}$	2	2	0	0,00%	0	-
		A11	$F_1^{SxS} \times F_1^{SxS}$	9	7	2	22,22%	6	3-3
TOTAL A			74	41	33	44,59%	116	3,52 (±1,395)	1-7
INTERCLADO	E1	$M^N \times M^S$	6	4	2	33,33%	7	2-5	
	E2	$M^S \times M^N$	1	0	1	100,0%	2	2	
	E3	$F_1^{NxN} \times M^S$	4	3	1	33,33%	4	4	
	E4	$F_1^{SxS} \times M^N$	1	1	0	0,00%	0	-	
	E5	$F_2^{NxN} \times M^S$	3	1	2	66,67%	9	4-5	
	E6	$F_3^{NxN} \times F_1^{SxS}$	1	1	0	0,00%	0	-	
	E7	$F_1^{NxS} \times M^N$	3	0	3	100,0%	15	5-5	
	E8	$M^N \times F_1^{NxS}$	2	2	0	0,00%	0	-	
	E9	$F_1^{NxS} \times M^S$	2	0	2	100,0%	11	5-6	
	E10	$F_1^{NxS} \times F_1^{NxS}$	4	0	4	100,0%	13	2-5	
	E11	$F_1^{NxS} \times F_1^{SxN}$	2	1	1	50,00%	4	4	
	E12	$F_2^{NxNS} \times M^N$	1	0	1	100,0%	5	5	
	E13	$F_2^{NSxN} \times M^S$	1	0	1	100,0%	5	5	
	E14	$M^S \times F_2^{NSxNS}$	2	1	1	50,00%	7	7	
	E15	$F_2^{NxN} \times F_1^{NxS}$	1	0	1	100,0%	4	4	
	E16	$F_1^{NxS} \times F_2^{NSxS}$	4	2	2	50,00%	9	4-5	
	E17	$F_1^{NxS} \times F_2^{NxNS}$	3	1	2	66,67%	8	3-5	
	E18	$F_1^{NxS} \times F_2^{NSxSN}$	2	0	2	100,0%	7	3-4	
	E19	$F_2^{NxS} \times F_1^{NxS}$	1	0	1	100,0%	3	3	
	E20	$F_2^{NSxSN} \times F_2^{NxNS}$	1	0	1	100,0%	1	1	
	E21	$F_2^{NSxN} \times F_2^{NxNS}$	1	0	1	100,0%	4	4	
	E22	$F_2^{NxNS} \times F_2^{NSxSN}$	1	0	1	100,0%	3	3	
TOTAL E			47	17	30	62,50%	121	4,03 (±1,351)	1-7
TOTAL A + E			121	58	63	52,07%	237	3,76 (±1,388)	1-7

¹ F_1^{NxS} = descendente F_1 de parentais matriz, sendo ♀ Norte e ♂ Sul; F_2^{NSxSN} = descendente F_2 de parentais F_1 , sendo ♀ de matriz NxS e ♂ de matriz SxN

² Porcentagem de cruzamentos em que pelo menos um descendente foi gerado.

Há diferenças do SR e TN quando os cruzamentos envolvem matrizes ou gerações de diferentes níveis de descendentes (F_1 , F_2 e F_3) em cruzamentos intraclado?

Foram realizados 31 cruzamentos entre indivíduos $2n=14$ do clado Norte (A1 a A7, **Tabela 2.5**), sendo que 42% ocorreram exclusivamente entre parentais matriz (A1), 22,5%

envolvendo descendentes gerados em F_1 combinados entre si ou com indivíduos matriz (A2 e A3) e os demais envolvendo F_2 e F_3 combinados entre si, com descendentes F_1 ou com indivíduos matriz (A4 a A7). Foram realizados 42 cruzamentos entre parentais $2n=14$ do clado Sul (A8 a A11, **Tabela 2.5**), sendo 19 entre matrizes (A8) e os demais envolvendo F_1 entre si ou combinados com indivíduos matriz (A9, A10 e A11).

Cruzamentos intraclado envolvendo pelo menos um parental matriz Norte ou matriz Sul foram comparados entre si e não apresentaram diferença significativa de SR e TN (situação A, **Tabela 2.6**).

Tabela 2.6 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) entre matriz e gerações de descendentes de cruzamentos intraclado Norte e intraclado Sul.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A			
Comparação entre grupos intraclado considerando os casos em que pelo menos um dos parentais é matriz	A1 x A2 x A4 x A5 x A8 x A9 x A10	0,067	0,370
Situação B			
Comparação entre grupos intraclado em que ambos os parentais são matrizes e grupos em que somente um dos parentais é matriz ou em que ambos são descendentes	A1 x A8	0,515	0,598
	(A1+A8) x (A2+A9+A10)	0,023	0,161
	(A1+A8) x (A4+A5)	0,119	0,750
	(A1+A8) x (A3+A6+A7+A11)	0,053	0,374
	(A2+A9+A10) x (A4+A5)	0,858	0,435
	(A4+A5+ A2+A9+A10) x (A3+A6+A7+A11)	0,986	0,151

Combinações envolvendo parentais matrizes e diferentes gerações foram testadas e não houve diferença significativa de SR e TN para a maioria dos casos, com exceção para descendentes matriz (A1+A8) x cruzamentos com pelo menos um parental matriz (A2+A9+A10), que exibiu diferença significativa de SR, com maiores frequências quando apenas exemplares matrizes participaram dos cruzamentos (situação B, **Tabela 2.6**). Assim, mantivemos as análises de SR com a distinção entre cruzamentos com matriz e cruzamentos envolvendo descendente.

Esse decréscimo de SR em cruzamentos mais introgressivos pode ser mais facilmente observada ao se analisar as variações dentro dos cruzamentos intraclado Norte e Sul separadamente. Em Norte o SR foi de 69% em A1 (matrizes), 57% em A2+A3 (envolvendo pelo menos um parental F_1) e 42% em A4 a A7 (envolvendo pelo menos um parental F_2 ou F_3), enquanto em Sul, o SR foi 58% em A8 (matrizes) e de 17,5% em A9+A10+A11 (envolvendo pelo menos um parental F_1) (**Figura 2.2**).

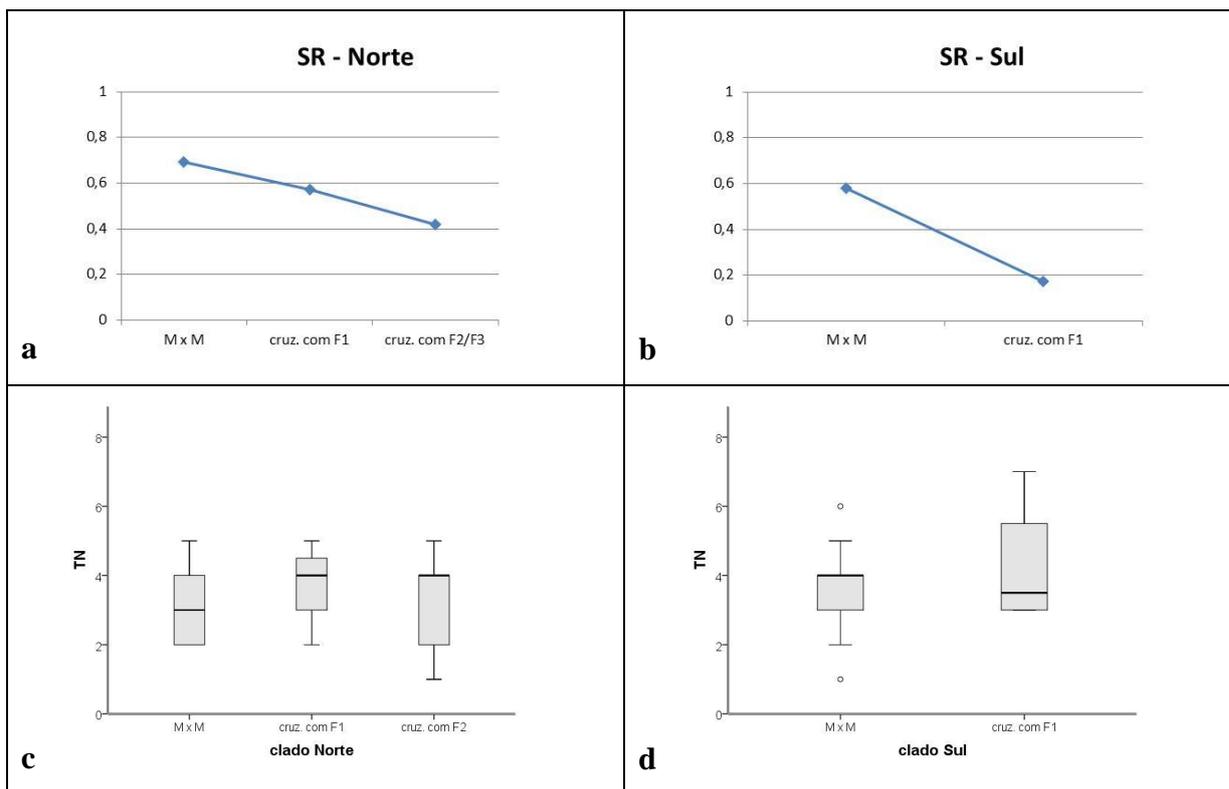


Figura 2.2 – Frequência de sucesso reprodutivo (**a** e **b**) e tamanho de ninhada (TN) (**c** e **d**) em cruzamentos intraclado Norte (**a** e **c**) e Sul (**b** e **d**), considerando indivíduos matriz (M) e descendentes (F₁, F₂ e F₃) como parentais.

O TN foi de 3,22 e 3,55 em cruzamentos entre matrizes Norte e Sul, respectivamente, e variou de 3,7 a 5,5 quando um dos parentais era matriz e de 1,0 a 4,0 quando nenhum dos parentais era matriz. Dentro do clado Norte o TN variou de 1,0 a 4,0 e dentro do clado Sul variou de 3,0 a 5,5 (**Figura 2.1**). Em todos os casos não foi registrada variação significativa de TN entre os grupos analisados, no entanto, verificou-se maiores médias em cruzamentos intraclado Sul (**Tabelas 2.5** e **2.6**).

Assim, os maiores valores de SR tanto no Norte quanto no Sul foram obtidos quando os cruzamentos envolveram os dois parentais matrizes, reduzindo gradativamente conforme diminui o número de matrizes no cruzamento. O TN, por sua vez, não foi influenciado pela presença de matrizes ou gerações F₁, F₂ ou F₃ nos cruzamentos.

Há diferença de SR e TN quando os cruzamentos envolvem matrizes ou gerações de diferentes níveis de descendentes (F_1 , F_2 e F_3) em cruzamentos interclados?

Cruzamentos interclados totalizaram 47 casos envolvendo parentais $2n=14$ em várias combinações (E1 a E22, **Tabela 2.5**), sendo 7 casos em que matrizes Norte e Sul participaram como parentais (E1 e E2), 9 em que matrizes e descendentes F_1 , F_2 , F_3 Norte e matrizes e F_1 Sul participaram como parentais (E3 a E6), 31 em que descendentes interclado participaram como parentais (E8 a E22).

Analisando os cruzamentos levando-se em consideração o clado de origem dos parentais, observou-se aumento de SR quando os parentais eram descendentes interclados quando comparados com cruzamentos quando somente matrizes estavam envolvidas, sendo de 77,0% quando pelo menos um parental era um descendente de cruzamento interclado ($F_n^{N \times S}$ ou $F_n^{S \times N}$) e 43 % quando somente matrizes estavam envolvidas nos cruzamentos. Em nenhuma das situações propostas houve diferença no TN entre os grupos considerados (**Tabela 2.7; Figura 2.3**).

Tabela 2.7 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em grupos de cruzamentos interclado levando-se em consideração a origem dos parentais.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A	E1 x E2	0,212	0,667
Interclado ^a , Interclado ^b e Interclado ^c analisados separadamente	E3 x E4 x E5 x E6 x E7 E8 x E9 x ... x E21 x E22	0,516 0,399	0,667 0,144
Situação B	(E1+E2) x (E3+E4+E5+E6+E7)	0,585	0,275
Interclado ^a , Interclado ^b e Interclado ^c comparados aos pares	(E1+E2) x (E8aE2) (E3+E4+E5+E6+E7) x E8aE23	0,069 0,006	0,200 0,798
Situação C	(E1+E2) x (E3+E4+E5+E6+E7) x (E8aE23)	0,004	0,222
Interclado ^a , Interclado ^b e Interclado ^c comparados entre si			

Considerando as gerações (M , F_1 , F_2 e F_3) independente da origem dos parentais o que se observou foi que, para a maioria dos casos não houve diferença significativa de SR e TN entre os grupos considerados. O único caso de diferença significativa foi em relação ao TN, sendo que em cruzamentos entre parentais matriz houve menor número de filhotes por ninhada (média=3,00) do que em cruzamentos nos quais um dos parentais foi de F_1 (média=5,00) ou F_2 (média=5,2) (**Tabelas 2.5 e 2.8**).

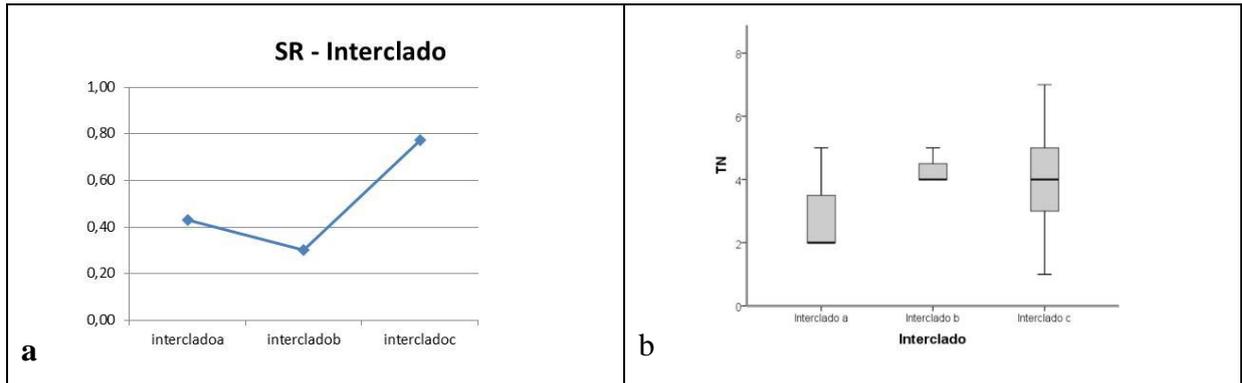


Figura 2.3 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) em cruzamentos interclado, diferenciando cruzamentos em que os parentais foram matrizes (interclado^a), descendentes intraclado (interclado^b) e descendentes interclado (interclado^c).

Assim, conclui-se que existem diferenças de sucesso reprodutivo nos cruzamentos interclado conforme a origem dos parentais, sendo o pior cenário aquele envolvendo parentais descendentes de cruzamentos intraclado e o melhor envolvendo parentais descendentes de cruzamentos interclado. Em relação ao tamanho da ninhada ela tende a ser menor entre cruzamentos envolvendo apenas parentais matriz e maior quando pelo menos um dos parentais é descendente F_1 ou F_2 .

Tabela 2.8 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em grupos de cruzamentos interclado.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
MxM	E1 x E2	0,212	0,667
MxF ₁	E3 x E4 x E7 x E8 x E9	0,120	0,415
MxF ₂	E5 x E12 x E13 x E14	0,733	0,404
Total com um parental matriz		0,527	0,038
F ₁ xF ₁	E10 x E11	0,121	0,685
F ₁ xF ₂	E15 x E16 x E17 x E18 x E19	0,627	0,761
F ₁ xF ₃	E6	*	*
F ₂ xF ₂	E20 x E21 x E22	*	*
Total com um parental F₁ F₂ ou F₃		0,223	0,315

* cálculos estatísticos não se aplicam devido a particularidades do grupo amostral

CRUZAMENTOS CONSIDERANDO A INFLUÊNCIA NO SR E TN DO NÚMERO DIPLOIDE E DO CLADO DE ORIGEM DOS PARENTAIS

Para se avaliar a influência do cariótipo (número diploide) e do clado de origem dos parentais no SR e TN, todos os arranjos possíveis de cruzamentos foram organizados em 21 grupos (**Tabela 2.9**). Do total de 185 cruzamentos, a taxa de SR médio foi de 45,41% e o TN médio foi de 3,69 ($\pm 1,42$).

Tabela 2.9 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) calculados a partir de cruzamentos experimentais considerando o cariótipo (C) dos parentais (2n=14, 15 e 16) e o clado de origem dos mesmos (N=Norte; S=Sul; E=Inteclado).

TIPO	CRUZAMENTOS				TAMANHO NINHADA			
	♀ x ♂	TOTAL ¹	SEM FILHOTE	COM FILHOTE	SR ²	TOTAL	MÉDIA (D.P)	MÍN-MÁX
C1	14 ^N x 14 ^N	32	14	18	56,25%	60	3,33 ($\pm 1,328$)	1-5
C2	14 ^S x 14 ^S	42	27	15	35,71%	56	3,73 ($\pm 1,486$)	1-7
C3	14 ^N x 14 ^S	14	9	5	35,71%	20	4,00 ($\pm 1,225$)	2-5
C4	14 ^S x 14 ^N	3	2	1	33,33%	2	2,00	2
C5	14 ^N x 14 ^E	4	3	1	25,00%	4	4,00	4
C6	14 ^E x 14 ^N	4	0	4	100,0%	20	5,00 ($\pm 0,000$)	5-5
C7	14 ^E x 14 ^E	18	3	15	83,33%	52	3,47 ($\pm 1,187$)	1-5
C8	14 ^S x 14 ^E	2	1	1	50,00%	7	7,00	7
C9	14 ^E x 14 ^S	3	0	3	100,0%	16	5,33 ($\pm 0,577$)	5-6
C10	14 ^N x 16 ^N	11	3	8	72,72%	30	3,75 ($\pm 1,982$)	1-6
C11	14 ^S x 16 ^N	2	2	0	0,00%	0	-	0
C12	14 ^N x 15 ^N	13	8	5	38,46%	15	3,00 ($\pm 1,581$)	1-5
C13	14 ^S x 15 ^N	5	2	3	60,00%	9	3,00 ($\pm 1,000$)	2-4
C14	14 ^E x 15 ^N	1	0	1	100,0%	5	5,00	5
C15	15 ^N x 14 ^N	5	3	2	40,00%	8	4,00 ($\pm 0,000$)	4-4
C16	15 ^N x 14 ^S	3	3	0	0,00%	0	-	0
C17	15 ^E x 14 ^E	1	1	0	0,00%	0	-	0
C18	15 ^N x 16 ^N	3	3	0	0,00%	0	-	0
C19	15 ^N x 15 ^N	17	16	1	5,88%	2	2,00	2
C20	14 ^S x 15 ^E	1	1	0	0,00%	0	-	0
C21	14 ^E x 15 ^E	1	0	1	100,0%	4	4,00	4
TOTAL		185	101	84	45,41%	310	3,69 ($\pm 1,423$)	1-7

¹ Número absoluto de cruzamentos. Sete cruzamentos não foram considerados pois o 2n dos parentais não foi determinado.

² Porcentagem de cruzamentos em que pelo menos um descendente foi gerado.

Os valores de SR e TN diferem quando os parentais de mesmo 2n participam de cruzamentos intra em relação aos interclados?

Aqui foram considerados somente os casos em que ambos parentais apresentaram 2n=14, por ser o único 2n presente em exemplares dos clados Norte e Sul (**Tabela 2.10; Figura 2.4**). Tomando-se todos os nove grupos de cruzamentos intra e intercalado com cruzamento 14x14 (C1 a C9) observou-se que há diferença dos valores de SR e de TN entre eles (situação A, **Tabela 2.10**).

Para detalhar essa análise, comparou-se os cruzamentos intraclado do norte $14^N \times 14^N$ (C1) e do sul $14^S \times 14^S$ (C2) e os dados mostraram que dentro de cruzamentos intraclado envolvendo matrizes não há diferença significativa no SR e no TN (situação B, **Tabela 2.10**). Em conjunto, o SR desses dois grupos foi de aproximadamente 45% com média de 3,5 e variação de 1 a 7 filhotes por ninhada (**Tabela 2.9**).

Todas as demais combinações de cruzamentos que não envolveram parentais matriz foram analisadas e mostraram diferenças significativas de SR e TN entre elas (situação C, **Tabela 2.10**), portanto, não se pode considera-las, em conjunto, como intercalado. Assim, detalhou-se ainda mais a análise para identificar quais grupos poderiam ser considerados em conjunto e quais seriam distintos entre si.

Três novos grupos foram testados: interclado com parentais intraclado matrizes (C3+C4), intercalado quando um parental é descendente de cruzamento intraclado e outro descendente de cruzamento interclado (C5+C6+C8+C9) e intercalado quando os parentais são descendentes de cruzamentos interclado combinados entre si (C7). Os dados mostraram que não há diferença significativa de valores de SR e TN dentro desses agrupamentos (situação D, **Tabela 2.10**) mas há diferenças significativas entre eles (situação E, **Tabela 2.10**).

Na situação F (**Tabela 2.10**), ao comparar dois a dois os grupos de cruzamentos intercalados, verificou-se que cruzamentos (C5+C6+C8+C9) quando comparados a (C3+C4) e a C7 apresentaram diferenças significativas de TN mas não de SR. Por outro lado, quando comparados (C3+C4) e C7 houve diferença significativa de SR, mas não de TN. Pode-se verificar que o SR aumentou gradativamente à medida que os cruzamentos intercalados tornavam-se mais introgressivos, variando de 35% em (C3+C4), 62% em (C5+C6+C8+C9) e 83% em C7. Por outro lado, o TN diminuiu conforme os cruzamentos intercalados tornaram-se mais introgressivos, variando de média de 5,22 e 1-7 filhotes por ninhada (C5+C6+C8+C9), seguido de média de 3,67 e 2-5 filhotes por ninhada em (C3+C4), e média de 3,47 e 1-5 filhotes por ninhada em C7 (**Figura 2.4**).

Na situação G, os cruzamentos intraclado foram comparados com cruzamentos intercalados e apresentaram diferença significativa de SR, sendo os valores de SR e TN menores para os cruzamentos intraclado. Por outro lado, dentre os cruzamentos intercalado, os maiores valores de SR e TN foram os que envolveram pelo menos um parental interclado. Os cruzamentos com ambos parentais descendentes F_2 ou F_3 intercalados tiveram menores SR e TN. Essas análises permitem concluir que o clado de origem dos parentais influencia na fertilidade de indivíduos com o mesmo número diploide.

Tabela 2.10 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) em cruzamentos intra e interclado envolvendo apenas parentais $2n=14$.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A todos os grupos Intra e Interclados	C1 x C2 x C3 x C4 x C5 x C6 x C7 x C8 x C9	0,006	0,023
Situação B somente cruzamentos intraclados, tanto norte quanto sul	C1 x C2	0,078	0,421
Situação C envolvendo todos os cruzamentos interclados juntos	C3 x C4 x C5 x C6 x C7 x C8 x C9	0,017	0,008
Situação D cruzamentos intercalado envolvendo matrizes x intercalado com um parental intraclado e um inteclado F ₁	C3 x C4 C5 x C6 x C8 x C9	0,938 0,506	0,210 0,087
Situação E três grupos de intercalado comparados entre si	(C3+C4) x C7 x (C5+C6+C8+C9)	0,011	0,002
Situação F grupos intercalados comparados entre si dois a dois	(C3+C4) x (C5+C6+C8+C9) C7 x (C5+C6+C8+C9) (C3+C4) x C7	0,065 0,354 0,004	0,016 0,001 0,741
Situação G	(C1+C2) x (C3+C4) (C1+C2) x C7 (C1+C2) x (C5+C6+C8+C9)	0,485 0,017 0,101	0,807 0,934 0,001

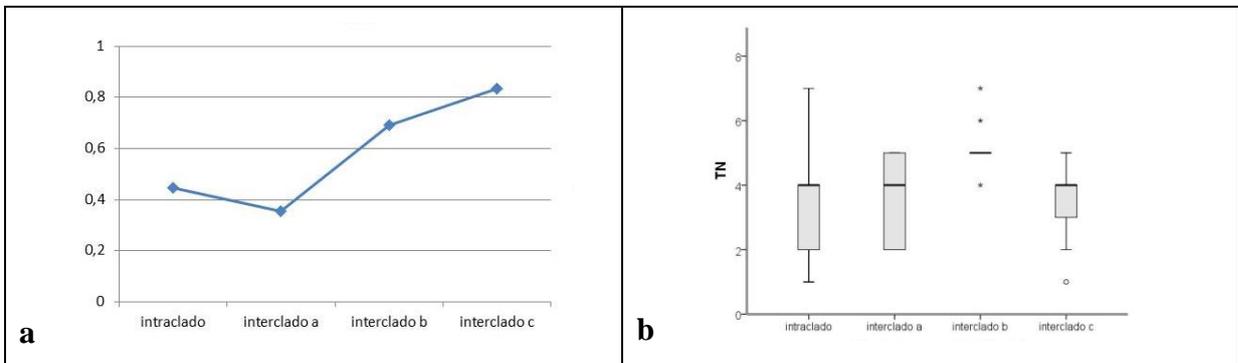


Figura 2.4 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do tamanho da ninhada (b) entre parentais $2n=14$ que participaram de cruzamentos intraclado e interclado. Cruzamentos interclado^a = apenas matrizes como parentais; interclado^b = um parental descendente de cruzamento intraclado e outro de cruzamento interclado; interclado^c = parentais descendentes de cruzamentos interclado combinados entre si.

Indivíduos 2n=15 são férteis?

Para responder à pergunta, avaliou-se os 50 cruzamentos em que pelo menos um parental apresentou 2n=15 (C12 a C21, **Tabela 2.11**). Nesses cruzamentos, 30 envolveram um parental 2n=14 (60,0%), 17 envolveram outro parental 2n=15 (34,0%) e 3 envolveram um parental 2n=16 (6,0%).

Em cruzamento 2n=15x2n=14 (ou 2n=14x2n=15) o SR foi de 40,0% e o TN médio de 3,4 com variação de 1-5 filhotes/ninhada, sendo que nessa análise não se levou em consideração qual parental, materno ou paterno, era o portador de 2n=15. Nos 17 cruzamentos em que ambos os parentais apresentam 2n=15, apenas um gerou descendentes, com apenas 2 filhotes, correspondendo a um SR de 5,9%. Nos 3 cruzamentos 2n=15 x 2n=16 (C18) em que a fêmea é a portadora de 2n=15 não foram gerados descendentes.

Nossos dados mostraram que há diferença significativa de SR, mas não de TN quando foram considerados todos os possíveis cruzamentos em que apenas um dos parentais possui 2n=15 (situação A, **Tabela 2.11**). Comparados os grupos em que o parental macho possuía 2n=15 com o grupo em que ambos parentais tinham 2n=15 verificou-se que o SR foi significativamente menor na combinação 2n=15x2n=15, embora não tenha havido diferença significativa de TN (situação B, **Tabela 2.11**). No entanto, não foi identificada diferença significativa de TN entre cruzamentos 2n=15x2n=15 com aqueles em que o parental feminino tinha 2n=15 e o macho 2n=14 ou 2n=16 (situação C, **Tabela 2.11; Figura 2.5**).

Nossos dados permitem afirmar que há forte redução da fertilidade dos indivíduos com 2n=15, com maior impacto na fertilidade quando as fêmeas são as portadoras do cariótipo 2n=15. Assim, os indivíduos 2n=15 não são estéreis, e o maior sucesso reprodutivo desses indivíduos ocorre quando estão em cruzamento com indivíduos 2n=14.

Tabela 2.11 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) de cruzamentos em que pelo menos um dos parentais apresentou 2n=15.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A Comparação entre todas as possíveis combinações em que um parental tem 2n=15	C12xC13xC14xC15xC16xC17xC18xC20xC21	0,315	0,606
Situação B Comparação entre macho 2n=15 e ambos com 2n=15	(C12+C13+C14+ C20+C21) x C19	0,005	0,378
Situação C Comparação entre fêmea 2n=15 e ambos com 2n=15	(C15+C16+C17+C18) x C19	0,348	*

* cálculos estatísticos não se aplicam devido a particularidades do grupo amostral

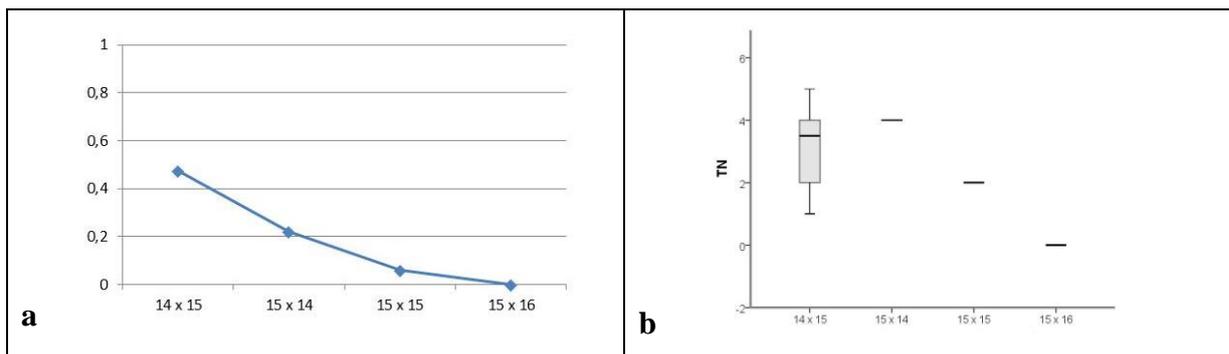


Figura 2.5 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) em cruzamentos envolvendo pelo menos um parental $2n=15$. Em todos os casos a combinação entre os cariótipos segue o padrão fêmea x macho.

Considerando que $2n=15$ não é estéril, o SR e TN é influenciado pelo sexo do parental portador da forma $2n=15$?

Foram realizados 50 cruzamentos envolvendo um parental $2n=15$ e outro com $2n=14$, $2n=15$ e $2n=16$, **Tabela 2.12**). Em 38 casos o cariótipo $2n=15$ foi encontrado em machos (C12, C13, C14, C19, C20 e C21) e em 29 casos em fêmeas (C15, C16, C17, C18 e C19).

Cruzamentos em que só a fêmea possuía $2n=15$ (situação A, **Tabela 2.12**) e em que só o macho tinha $2n=15$ (situação B, **Tabela 2.12**) não revelaram diferenças significativas de SR ou TN, o que permitiu analisá-los em conjunto na situação C (**Tabela 2.12**) e verificar que o sexo do portador da forma $2n=15$ não interfere no SR e TN quando esses grupos são comparados entre si. Ao comparar esses grupos aos casos em que ambos parentais tinham $2n=15$ (situação D, **Tabela 2.12**), a diferença de SR foi evidenciada, mas não a de TN.

Ao se comparar o sexo que detém o cariótipo $2n=15$, o que se observa é que o SR é maior na combinação $2n=14 \times 2n=15$ (47,6%), reduzindo em $2n=15 \times 2n=14$ (22,2%), $2n=15 \times 2n=15$ (5,9%) e finalmente não apresentando nenhum sucesso reprodutivo na combinação $2n=15 \times 2n=16$. Seguindo essa mesma ordem, o valor de TN foi de 3,3, 4,0 e 2,0 filhotes por ninhada (**Figura 2.4**). Vale ressaltar que o único caso em que fêmeas $2n=15$ geraram descendentes quando em contato com macho $2n=14$, esse era do clado Norte. Nas demais combinações em que cruzou com macho do Sul ou Interclado, não houve sucesso reprodutivo.

Assim, admite-se que a condição $2n=15$ quando ocorre nas fêmeas é mais prejudicial do que quando está presente nos machos e que, dentre as combinações possíveis, a mais favorável é fêmea $2n=14$ x macho $2n=15$ e a menos favorável é fêmea $2n=15$ e macho $2n=16$.

Tabela 2.12 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) visando identificar a relação de fertilidade em exemplares $2n=15$ quando estão presentes no macho ou na fêmea.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A Comparação entre todas as possíveis combinações em que só a fêmea tem $2n=15$	C15 x C16 x C17 x C18	0,339	*
Situação B Comparação entre todas as possíveis combinações em que só o macho tem $2n=15$	C12 x C13 x C14 x C20 x C21	0,426	0,594
Situação C Comparação entre cruzamentos onde a fêmea tem $2n=15$ e onde o macho tem $2n=15$	(C15+C16+C17+C18) x (C12+C13+C14+C20+C21)	0,075	0,493
Situação D Comparação entre cruzamentos onde um ou ambos parentais tem $2n=15$	(C15+C16+C17+C18) x (C12+C13+C14+C20+C21) x C19	0,010	0,464

* cálculos estatísticos não se aplicam devido a particularidades do grupo amostral

Em cruzamentos $2n=14 \times 2n=16$, o SR e TN são influenciados quando o cruzamento é intra ou intercalado?

Treze casos de cruzamentos entre indivíduos $2n=14$ e $2n=16$ foram realizados (**Tabela 2.9**), sendo 8 intraclado $14^N \times 16^N$ (C10) e 2 interclado $14^S \times 16^N$ (C11). Nos cruzamentos intraclado o SR foi de 72,73% e o TN teve média de 3,75. Nos cruzamentos interclados o SR foi de 0,0%. As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas, tendo em vista o número amostral baixo. Um aumento amostral permitirá afirmar se há a tendência de formas 14 e 16 terem maior SR quando pertencentes ao mesmo clado.

Cruzamentos em que ambos os parentais possuem o mesmo $2n$ apresentam maior SR e TN?

A comparação entre cruzamentos com parentais com mesmo $2n$, 14×14 (C1 a C9), 15×15 (C19), e cruzamentos com parentais com $2n$ distintos (C10 a C18, C20 e C21) revelou diferença significativa de SR entre eles (situação A, **Tabela 2.13**). Quando comparados aos pares foi possível perceber que apenas o SR apresenta diferenças significativas quando os

cruzamentos envolvem ambos parentais $2n=15$ (situação B, **Tabela 2.13**). Em cruzamentos nos quais ambos parentais eram $2n=14$ o SR foi de 51,6%, diminuindo para 43,5% entre $2n$ distintos e chegando a 5,9% entre ambos parentais $2n=15$. O TN, similarmente, diminuiu de 3,76 para 3,09 e 2,00, respectivamente (**Figura 2.6**).

Sendo assim, cruzamentos entre indivíduos de mesmo número diploide tendem a ser mais bem sucedidos que entre indivíduos de números diploide distintos se os parentais apresentarem a condição homomórfica para o rearranjo, que no presente estudo foi $2n=14$.

Tabela 2.13 – Testes de significância de sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) entre cruzamentos em que ambos parentais possuem o mesmo $2n$ ($2n=14 \times 2n=14$, $2n=15 \times 2n=15$) e em que possuem $2n$ diferente.

Tipos de análises	Grupos	SR (χ^2)	TN (ANOVA)
Situação A			
Comparação entre parentais $2n=14$, parentais com $2n$ distintos e parentais $2n=15$	(C1aC9) x (C10aC18/C20eC21) x C19	,002	,122
Situação B			
Comparação ao pares entre parentais $2n=14$, $2n=15$ e com $2n$ distintos	(C1aC9) x (C10aC18/C20eC21) x C19	,345	,074
	(C1aC9) x C19	,000	,213
	(C10aC18/C20eC21) x C19	,005	,577

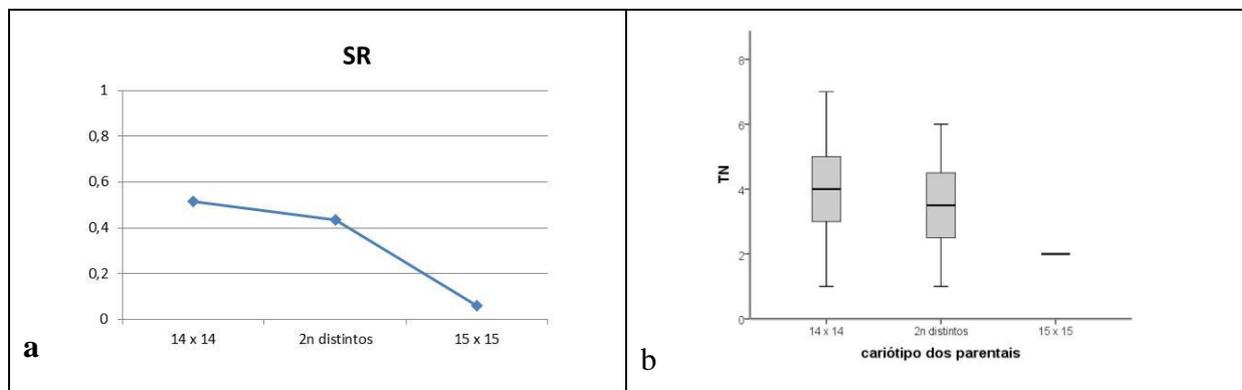


Figura 2.6– Frequência de sucesso reprodutivo (a) e variação do número de crias/ninhada (b) de cruzamentos entre parentais de mesmo cariótipo e de cariótipo distinto.

DISCUSSÃO

A proposta de realizar de cruzamentos entre exemplares de *A. cursor* em cativeiro foi bem sucedida, refletido pela obtenção de sucessivas gerações de descendentes (registrados até F₃), pelo número médio de filhotes por ninhada ser semelhante aos registrados na literatura em condições naturais (Pereira *et al.*, 1993; Feliciano *et al.*, 2002) e pela sobrevivência/capacidade reprodutiva prolongada em relação ao tempo médio descrito na literatura para roedores, de até 28 meses (Holdara *et al.*, 1989; Espinosa, 1995).

Além disso, foi o primeiro estudo em roedores a abordar, sistematicamente, a interferência do cariótipo e origem geográfica na fertilidade da espécie através de cruzamentos experimentais. Até então, dados disponíveis para cruzamentos experimentais em *A. cursor* destinavam-se a investigações de seu papel enquanto hospedeiro/reservatório de doença (Machado-Silva *et al.*, 2011) ou de dados reprodutivos (Pereira *et al.*, 1993, Feliciano *et al.*, 2002, Bergallo e Magnusson *et al.*, 1999, D'Andrea *et al.*, 1999, Gentile *et al.* 1997 e 2000).

A realização de cruzamentos entre indivíduos com cariótipos e regiões geográficas distintas permitiu testar através de inferências, fruto de observação/experimentação, os pressupostos do Conceito Biológico de Espécie difundidos por Mayr (1942), que afirma que para serem da mesma espécie é necessário que haja, em populações naturais, a capacidade potencial ou real, de cruzarem entre si e gerarem descendentes férteis. Além disso, na maioria dos casos de heteromorfismos cromossômicos, a segregação dos cromossomos é estudada através de seu emparelhamento na meiose ou pela análise do complexo sinaptonêmico, e dificilmente encontram-se registros de casos em que acasalamentos específicos foram planejados no intuito de se conhecer o mecanismo de herança cromossômica, como o que se realizou no presente estudo.

Todas as formas cariotípicas observadas nos indivíduos matriz já haviam sido registradas em compilações anteriores (Fagundes *et al.*, 1998; Colombi, 2010), e reiteram o registro de apenas indivíduos 2n=14 em populações do Espírito Santo (Paresque *et al.*, 2004; Colombi *et al.*, 2010) e a ocorrência, em simpatria, das formas 2n=14, 15 e 16 em populações de Una, BA (Fagundes *et al.*, 1998).

Nos 20 indivíduos provenientes de Uma (Bahia) registrou-se predominância da forma 2n=14 (85,0%), seguida por 2n=15 (10,0%) e 2n=16 (5,0%). Estes dados contrastam com os resultados encontrados há 15 anos atrás (Fagundes *et al.*, 1998) para populações da mesma

localidade, em que se registrou frequências maiores do cariótipo $2n=15$ (50,5%), seguido de $2n=16$ (44,0%) e $2n=14$ (5,5%) em uma amostra de 18 indivíduos.

De fato, salvo populações isoladas da Bahia, Pernambuco e Paraíba (Maia e Langguth, 1981; Sousa *et al.*, 2004; Oliveira e Langguth, 2004; Pereira e Geise, 2007) onde a forma $2n=16$ ocorre exclusiva ou predominantemente (em Lençóis, BA há registro em baixa frequência da forma $2n=15$ com monossomia do cromossomo X), percebe-se que em áreas ao sul da distribuição da espécie há maior frequência da forma $2n=14$, tanto em populações onde esse é o único complemento cromossômico descrito, quanto em populações em que são encontradas em simpatria com as formas $2n=15$ e/ou $2n=16$ (Fagundes *et al.*, 1998; Manduca, 2008; Colombi, 2010; Paresque *et al.*, 2004; Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010).

Em populações de insetos, a fixação de diferentes rearranjos cromossômicos tem sido relacionada a variáveis ambientais e climáticas (Confalonieri, 1994; Colombo e Confalonieri, 1996; Ananina *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2008; Rako *et al.*, 2009), porém em roedores nem sempre é possível fazer tal correlação (Bovincino *et al.*, 1996; Paresque *et al.*, 2007). Em populações de *Rattus rattus* do Japão, por exemplo, foi possível relacionar a fixação de certos rearranjos cromossômicos a variações climáticas, sendo as formas homomórficas de um par (A/A) mais adaptadas a localidades mais frias, e todas as combinações do rearranjo de inversão (A/A, A/S, S/S) em localidades com temperaturas mais amenas (Yosida *et al.*, 1971). No entanto, há registros de que alguns rearranjos cromossômicos podem levar a supressão da recombinação e assim contribuir para a diminuição do fluxo de genes em regiões cromossômicas mais extensas (Rieseberg, 2001). Porém, não se pode afirmar que esse seja o caso de *A. cursor*.

Heteromorfismos em *A. cursor* foram primeiramente registrados nos pares 2 e 4 de indivíduos $2n=14$ (Yonenaga, 1972), apresentando a forma acrocêntrica (2A/4A), submeta/metacêntrica (2S/4M) ou heterozigota (um cromossomo acro e outro submeta/metacêntrico, 2H/4H). Aquela autora identificou sete bivalentes na meiose de todos os machos analisados, sem qualquer anormalidade de emparelhamento entre os pares heteromórficos. Fagundes *et al.* (1998) analisaram o complexo sinaptonêmico em indivíduos com esses mesmos rearranjos e também não observaram formação de alças de inversão e, em cruzamentos experimentais entre essas formas, identificaram um padrão mendeliano de herança das formas heterozigotas dos pares 2 e 4, atribuindo a mecanismos de ajuste sináptico e supressão de *crossing over* nos segmentos invertidos o fato do emparelhamento e a segregação

desses cromossômicos ocorrerem normalmente, sem gerar prejuízos aos portadores dos rearranjos.

No entanto, problemas meióticos constituem apenas um dos mecanismos de isolamento pré-zigótico conhecidos, que seria o da incompatibilidade entre os gametas, podendo haver ainda barreiras no hábitat (isolamento geográfico), barreiras temporais (maturidade sexual diferenciada entre os sexos), barreiras comportamentais (diferenças nos rituais de corte), barreiras ecológicas (utilizam diferentes recursos do hábitat) e barreiras mecânicas pós-cópula (incompatibilidade dos órgãos reprodutores). Assim, ao se investigar a viabilidade de indivíduos com diferentes formas cariotípicas utilizando cruzamentos experimentais, emprega-se a observação direta, em contraposição à suposição indireta fornecida pelos dados citológicos, e tem-se a oportunidade de compreender a fertilidade dos organismos sob diferentes enfoques. O presente estudo trouxe informações inéditas baseadas em métodos de cruzamentos experimentais, cujos resultados consistem na efetivação do cruzamento e geração de descendentes, muito embora os exemplares não se encontrem em ambiente natural. De qualquer modo, trata-se de dados robustos, com 185 cruzamentos, 310 descendentes e análises cujos parâmetros se baseiam na forma cariotípica, na origem geográfica dos parentais e na influência das gerações obtidas em cativeiro.

De modo inédito e inequívoco o presente trabalho demonstra que indivíduos $2n=15$ são férteis, mesmo que com acentuada redução de fertilidade. Nos casos de cruzamentos envolvendo parental $2n=15$ a combinação de menor sucesso reprodutivo foi a estabelecida com outro parental $2n=16$, menor do que entre parentais $2n=15$. Apesar disso, exemplares com $2n=15$ demonstraram que formaram gametas $n=7$ e $n=8$ e têm o potencial de recuperar os complementos cariotípicos 14 e 16.

O sucesso reprodutivo foi maior com parentais intraclado $2n=14$ ou $2n=16$ do que em cruzamentos interclado. No entanto, como foram apenas 2 casos registrados, os dados são insipientes para afirmar se os cariótipos de maior frequência no Norte ($2n=16$) e no Sul ($2n=14$) estejam contribuindo para a manutenção da barreira reprodutiva entre esses agrupamentos. Cruzamentos entre exemplares $2n=15$ tiveram baixo sucesso reprodutivo, no entanto verificou-se que a condição heterozigota não afeta da mesma forma os dois sexos, sendo o sucesso reprodutivo mais facilmente comprometido quando a fêmea apresenta $2n=15$, independente do cariótipo do macho. O único caso em essas fêmeas $2n=15$ tiveram filhote foi quando cruzaram com macho $2n=14$ do Norte, sinalizando o favorecimento da combinação intraclado em detrimento da interclado. Nessa combinação houve dois cruzamentos bem sucedidos em cinco

tentativas realizadas, havendo a média de 4 filhotes por ninhada, considerada alta para a espécie. Esse dado evidencia a maior afinidade de exemplares $2n=15$ com $2n=14$ do que com $2n=16$.

O cariótipo intermediário $2n=15$, resultante da condição heterozigota do rearranjo envolvendo os cromossomos 1 e 3 foi descrito pela primeira vez por Yonenaga-Yassuda (1979) que, ao analisar a meiose desses machos, identificou seis bivalentes e um trivalente grande com 3 a 5 quiasmas, mas nenhum *loop* de inversão, sugerindo emparelhamento não homólogo entre os segmentos invertidos. A autora também afirmou que nesses exemplares heterozigotos para o rearranjo havia a formação de gametas $n=7$ e $n=8$ normais e balanceados. Sbalqueiro e Nascimento (1996) relataram que indivíduos $2n=15$ não apresentaram problemas de fertilidade já que, quando cruzados entre si, recuperaram entre os descendentes as formas 14, 15 e 16.

King (1987) classificou as alterações cromossômicas em duas categorias, aquelas que efetiva ou potencialmente podem estar envolvidas em processo de especiação e as que não apresentam esse potencial. As alterações capazes de afetar a viabilidade reprodutiva do portador, imposta pela heterose negativa, são fusão em *tandem*, translocações recíprocas, fusão ou fissão cêntrica, uma vez que podem promover segregação desigual dos homólogos em indivíduos heterozigotos e conseqüentemente gerar gametas defeituosos com aneuploidias, duplicações, deleções ou interrupção da meiose. As alterações cromossômicas que não teriam esse potencial, são as inversões paracêntricas e pericêntricas, pois tem propensão de produzir produtos meióticos letais ou prejudiciais, resultando em fragmentos dicêntricos e acêntricos. No entanto o autor afirma que inversões podem não gerar nenhum efeito nefasto na meiose caso a localização dos quiasmas mude para uma posição terminal dos cromossomos ou para fora do *loop* de inversão. Outra forma de se evitar prejuízos seria o emparelhamento não homólogo entre heterozigotos para a inversão (heterosinapse). Análise do complexo sinaptonêmico de células paquítenicas em *Peromyscus maniculatus* (Cricetidae, Rodentia) carregando inversão em um cromossomo autossômico revelaram emparelhamento heterosinapto nos segmentos invertidos, prevenindo perdas gaméticas e evitando que inversões pericêntricas fossem causa de isolamento genético entre as populações (Greenbaum e Reed, 1984). Também em *Peromyscus sitkensis* foram observadas inversões pericêntricas em dois pares autossômicos e, o acompanhamento das fases da meiose (paquíteno, diplóteno e diacinese) nas células de exemplares dessa espécie revelou a ausência de *loop* de inversão e a ausência de *crossing over* nos segmentos invertidos, corroborando a hipótese de heterosinapse (Hale, 1986). *A. cursor* é uma espécie que carrega tanto rearranjos do tipo inversões (em 3

pares autossômicos), quanto uma combinação de inversões, fusões e perda de centrômeros/telômeros (Fagundes *et al.*, 1997a), sugerindo que os mecanismos e forças atuando sobre a meiose desses indivíduos não são simples e devem ser tratados com bastante cuidado.

White (1978) também afirmou que rearranjos tendem a trazer prejuízos para a espécie pela formação de gametas com desbalanço gênico. Até o momento, acreditava-se que nenhum desses efeitos negativos ocorreria em *A. cursor*, já que os polimorfismos são registrados com frequências elevadas nas populações naturais e, supostamente estaria recuperando em proporções mendelianas os parentais portadores dos mesmos (Fagundes *et al.*, 1998).

Porém, nossos dados mostraram que essa premissa parece se aplicar apenas às inversões pericêntricas dos pares 2 e 4, não podendo ser validada integralmente para a forma $2n=15$. Embora a forma $2n=15$ seja fértil, há um comprometimento reprodutivo principalmente quando os dois parentais de um cruzamento portam a forma heterozigota ou quando essa forma é combinada a $2n=16$. As formas homomórficas $2n=14$ e $2n=16$, cada qual combinadas entre seus iguais são as que apresentam as melhores condições para garantir o sucesso reprodutivo.

Embora nossos resultados apontem que a forma intermediária seja menos adaptativa, na natureza ela tem o potencial de sempre ser recuperada nas populações onde ambas formas homomórficas estão presentes. Na população em Lençóis, BA (Pereira e Geise, 2007) onde não há registro da forma $2n=14$, há predominância de indivíduos com $2n=16$, e já foram encontrados exemplares $2n=15$, no entanto essa condição se deve a monossomia do cromossomo X (Geise, comunicação pessoal) e não a condição heterozigota do rearranjo entre os pares autossômicos 1 e 3.

Apesar dos exemplares de *A. cursor* terem se adaptado bem às condições laboratoriais, observou-se que em cruzamentos envolvendo apenas parentais matriz, coletados na natureza, o sucesso reprodutivo foi maior em todos os casos, havendo uma ligeira (intraclado Norte e interclado) ou abrupta (intraclado Sul) redução de fertilidade entre os descendentes (F_1 , F_2 e F_3).

No entanto, em cruzamentos interclado observou-se que os descendentes gerados e que participaram de novos cruzamentos apresentaram sucesso reprodutivo significativamente maior. Considerando que cruzamentos interclado representam a condição intermediária entre populações de áreas geográficas distintas, pode-se afirmar que a origem dos parentais não atuou como limitante ao fluxo gênico, contrariando o que era esperado, já que acreditava-se que essas populações apresentassem isolamento reprodutivo evidenciado pela considerável divergência genética recuperada em análise filogenética utilizando os genes Citocromo *b* e Citocromo oxidase I (Cap. 1). Essa diferença entre clados se manteve mesmo ao se considerar indivíduos

com o mesmo número diploide ($2n=14$). Ao garantir que o cariótipo fosse uma constante percebeu-se que os resultados encontrados refletem, de fato, uma variação geográfica, favorecendo o sucesso reprodutivo entre descendentes interclado.

Assim, a partir de cruzamentos experimentais pode-se concluir que não há barreira reprodutiva completa entre indivíduos do clado Norte e clado Sul, caso venham a se intercruzar na natureza. Muito embora o rearranjo dos pares 1 e 3 em heterozigose tenha menor valor adaptativo, a forma $2n=15$ ainda não constitui uma fonte de isolamento entre as formas homomórficas, já que mantém o potencial de recuperar os estoques de $2n=14$ e $2n=16$ nas populações, minimizando os efeitos negativos de cruzamentos apenas entre parentais heterozigotos para o rearranjo. Por outro lado, o maior potencial do cariótipo $2n=15$ gerar descendentes quando combinado a $2n=14$ reflete um papel relevante do cariótipo em dirigir o processo de diferenciação das populações em *A. cursor*, caracterizando um caso raro de especiação em tempo real.

Referências bibliográficas

- Ananina G, Peixoto AA, Bitner-Mathé BC, Souza WN, Silva LB, Valente VLS and Klaczko LB (2004) Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: seasonal, altitudinal and latitudinal variation. *Genetics and Molecular Biology* 27(1):61-69.
- Barros MC, Sampaio I, Schneider H and Langguth A (2009) Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). *Iheringia, Série Zoologia* 99(4): 373-380.
- Bergallo HG and Magnusson WE (1999) Effects of climate and food availability on four rodent species in Southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* 80(2):472-486.
- Bovincino CR, D'Andrea OS, Cerqueira R and Seuánez HN (1996) The chromosomes of *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae) with $2n=52$, $2n=56$, and interspecific hybrids ($2n=54$). *Cytogenetics and Cell Genetics* 73:190-193.
- Christoff AU (1997) Contribuição à sistemática das espécies do gênero *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Colombi VH (2010) Diversidade cariotípica em *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae). Monografia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):785-789.
- Colombo PC and Confalonieri VA (1996) An adaptative pattern of inversion polymorphisms in *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera). *Hereditas* 125:289-296.
- Confalonieri VA (1994) Inversion polymorphisms and natural selection in *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera): correlation with geographical variables. *Hereditas* 121:79-86.
- D'Andrea OS, Gentile R, Cerqueira R, Grelle CEV, Horta C and Rey L (1999) Ecology of small mammals in a Brazilian rural área. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(3): 611-620.
- Espinosa MB (1995) *Akodon azarae* (Rodentia-Cricetidae): breeding, management and reproductctive performance in laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology* 55(2): 201-206.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AM and Yonenaga-Yassuda Y (1997) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* ($2n=14, 15$ and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.
- Fagundes V, Christoff AU and 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.
- Feliciano BR, Fernandez FAS, Freitas D and Figueiredo MSL (2002) Population dynamics of small rodents in a grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mammalian Biology* 67:304-314.
- Geise L, Smith MF and Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82(1):92-101.
- Geise L (2012) *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species* 44(893):33-43.

- Gentile R, D'Andrea OS and Cerqueira R (1997) Home rangers of *Philander frenata* and *Akodon cursor* in a Brazilian Restinga (Coastal Shrubland). *Mastozoologia Neotropical* 4(2):105-112.
- Gentile R, D'Andrea OS, Cerqueira R and Maroja LS (2000) Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 35:1-9.
- Greenbaum IF and Reed MJ (1984) Evidence for heterosynaptic pairing of the inverted segment in pericentric inversion heterozygotes of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Cytogenetic and Genome Research* 38(2):106-111.
- Hale DW (1986) Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericentric inversion of the Sitka deer mouse. *Chromosoma* 94:425-436.
- Hodara VL, Espinosa MB, Merani MS and Quitans C (1989) *Calomys laucha* (Rodentia, Cricetidae): growth and breeding in laboratory conditions. *Laboratory Animals* 23:340-344.
- King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* 59:1-6.
- Machado-Silva JR, Neves RH, Rodrigues-Silva R, Oliveira RMF and Maldonado Júnior A (2011) Assessment of *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae) as permissive host to *Schistosoma mansoni* infection: morphology of adult worms. *Acta Parasitologica* 56(2): 147-153.
- Maia V and Langguth A (1981) New karyotypes of Brazilian akodont rodents with notes on taxonomy. *Sonderdruck-Zeitschrift für Säugetierkunde* 46: 241-289.
- Manduca EG (2008) Estudo das variações morfológica, craniana e citogenética em *Akodon cursor* (Rodentia: Sigmodontinae) no Estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. New York: Columbia University Press.
- McAllister BF, Sheeley SL, Mena PA, Evans AL and Schlötterer C (2008) Clinal distribution of a chromosomal rearrangement: a precursor to chromosomal speciation? *Evolution* 62(8):1852-1865.

- Nogueira CDA and Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- Oliveira FF and Langguth A (2004) Pequenos mamíferos (Didelphimorphia e Rodentia) de Paraíba e Pernambuco, Brasil. *Revista Nordestina de Biologia* 18(2):19-86.
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL and Fagundes V (2004) Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 17:5-33.
- Paresque R, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y and Fagundes V (2007) Karyological geographic variation of *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1818 (Rodentia, Cricetidae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 30(1): 43-53.
- Pereira LA, Chagas WA and Costa JE (1993) Ecologia de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica, Brasial. I. Ciclos reprodutivos de *Akodon cursor*, *Nectomys squamipes* e *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidade). *Revista brasileira de Zoologia* 10(3):389-398.
- Pereira LG and Geise L (2007) Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brasil). *Brazilian Journal of Biology* 67(3):509-518.
- Rako L, Poulsen,NA, Shirriffs J and Hoffmann AA (2009) Clinal variation in post-winter male fertility retention; an adaptive overwintering strategy in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 22(12):2438-2444.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16(7):351-358.
- Rieger TT, Langguth A and Weimer TA (1995) Allozymic characterization and evolutionary relationships in the brazilian *Akodon cursor* Species Group (Rodentia-Cricetidae). *Biochemical Genetics* 33:283-295.
- Rissino JD (2012) Análise de células-tronco adultas (CTA) em cultura de células de tecido epitelial de pequenos roedores (Rodentia-Stricognathi-Sciurognathi). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

- Sbalqueiro IJ and Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19(4):565-569.
- Sousa MAN, Langguth A and Gimenez EA (2004) Mamíferos dos Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba pp 229-254 in *Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação* (Porto KC, Cabral JJP and Tabarelli M eds). Série Biodiversidade 9. Ed Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- White MJD (1978) *Modes of Speciation*. W. H. Freeman and Company, São Francisco.
- Yonenaga Y (1972) Chromosomal polymorphism in the rodent *Akodon arviculoides* ssp. (2n=14) resulting from two pericentric inversions. *Cytogenetics* 11:488-499.
- Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetic and Cell Genetic* 23:241-249.
- Yosida TH, Tsuchiya K and Moriwaki K (1971) Karyotypic differences of black rats, *Rattus rattus*, collected in various localities of East and Southeast Asia and Oceania. *Chromosoma* 33:252-267.

CAPÍTULO 3

BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE *AKODON CURSOR*

RESUMO

Akodon cursor apresenta elevado polimorfismo cariotípico e ampla área de ocorrência ao longo da costa Atlântica brasileira, da Paraíba até o norte do Paraná, com registro da variação cariotípica em toda sua área de ocorrência. Dois agrupamentos de populações são reconhecidos para a espécie, um ao Norte e outro ao Sul da área de distribuição, sendo ainda obscuros os fatores responsáveis por essa quebra, mas com dados que sugerem ausência ou redução do fluxo gênico. Poucos dados sobre a biologia reprodutiva de *A. cursor* encontram-se disponíveis para populações naturais e para colônias mantidas em cativeiro, mas nesses casos as colônias sempre se restringiram a indivíduos do grupo Sul. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi levantar dados de biologia reprodutiva de *A. cursor* de ambos os clados Norte e Sul, caracterizando-os. Para tal foram realizados cruzamentos experimentais entre indivíduos de clados e cariótipos distintos. De 185 cruzamentos realizados foram colhidas informações sobre receptividade entre macho e fêmea, sucesso reprodutivo, tempo gestacional, número de filhotes por ninhada, razão sexual entre filhotes, mortalidade durante a lactação e longevidade dos espécimes. Representantes do grupo Norte apresentaram maior tamanho corporal e comportamento mais dócil durante período de cópula quando comparados aos do Sul. Casos de agressividades resultando em morte do(a) parceiro(a) ocorreram apenas quando o agressor pertencia ao clado Sul e tinha $2n=14$. O tempo gestacional variou de 21 a 28 dias, independente do cariótipo ou clado de origem da fêmea. Um caso de estro pós-parto foi registrado em fêmea do clado Sul com $2n=14$. Em cativeiro, nasceram 315 filhotes, observando-se predominância de machos (54%) ao final do desmame. Em todos os casos, a emergência da aparência externa adulta (surgimento de pelos, dentes e orelhas e abertura dos olhos) e o período de lactação ocorreu entre 14 e 21 dias, respectivamente. Durante a lactação, a mortalidade dentre os filhotes alcançou 10,8%, decorrente de canibalismo materno (79,4%), canibalismo fraterno (14,7%) e amamentação desigual (5,9%), tendo a maior mortalidade de filhotes por ninhada acontecido no clado Norte com mãe $2n=14$ e ninhada $2n=15$. Indivíduos mantidos em cativeiro sobreviveram por até 31 meses e geraram descendentes até o 24º mês. Os parâmetros, sucesso reprodutivo e agressividade foram, respectivamente, influenciados pelo cariótipo e clado de origem dos parentais, sugerindo que a reprodução entre os indivíduos e a viabilidade de descendentes é distinta entre exemplares $2n=15$ e $2n=14$ ou 16 e entre os grupos Norte e Sul.

INTRODUÇÃO

Akodon cursor é uma espécie de roedor da família Cricetidae que ocorre ao longo da costa Atlântica brasileira, do estado da Paraíba até o norte do Paraná. Apresenta elevado polimorfismo com variações em pares autossômicos que resultaram em três números diploides ($2n=14$, 15 e 16) e oito números de braços autossômicos, totalizando 31 citótipos já descritos para a espécie (Fagundes *et al.*, 1998; Colombi, 2010). Estudo envolvendo a distribuição das formas cariotípicas na espécie revela variação latitudinal das formas cromossômicas, com $2n=16$ ocorrendo em 100% das população de Pernambuco (PE) e decréscimo em populações da Bahia (BA) (44,4%) e de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR) (2,3%). Situação oposta foi verificada para a forma $2n=14$, ausente em PE, 5,5% na BA e 72% em SP-RJ-PR (Fagundes *et al.*, 1998).

Dados moleculares indicam que as populações de *A. cursor* estão divididas em agrupamentos Norte e Sul, sendo registrados os três cariótipos em cada clado (Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010).

Dois registros de cruzamentos experimentais em *A. cursor* envolveram a descrição cariotípica dos parentais, o primeiro foi uma menção a cruzamentos entre parentais com $2n=15$ de populações do Paraná capazes de recuperar os cariótipos $2n=14$, 15 e 16 entre os descendentes (Sbalqueiro e Nascimento, 1996). O segundo envolveu parentais $2n=14$ de populações de São Paulo com heteromorfismos nos pares 2 e 4, visando registrar o padrão de segregação desses pares, que se mostrou mendeliano (Fagundes *et al.*, 1998). Em ambos os casos, apenas descendentes do clado Sul foram utilizados e nenhum registro sobre a biologia reprodutiva foi feito.

No gênero *Akodon*, casos de cruzamentos experimentais voltados para o conhecimento da reprodução das espécies foram reportados para *A. boliviensis* e *A. alterus* (Piantanida *et al.*, 1995), *A. azarae* (Espinosa, 1995; Suárez e Kravetz, 2001), *A. dolores* (Piantanida e Barrantes, 1998) e *A. lindberghi* (De Conto e Cerqueira, 2007). Em *A. cursor*, esses dados encontram-se disponíveis para populações naturais e para colônias mantidas em cativeiro (Pereira *et al.*, 1993, Feliciano *et al.*, 2002, Bergallo e Magnusson *et al.*, 1999, D'Andrea *et al.*, 1999, Gentile *et al.* 1997 e 2000, Aulchenko *et al.*, 2002). Em todos os casos, as populações amostradas foram de localidades de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, populações do grupo Sul. Porém, a maioria dos casos não associou parâmetros reprodutivos ao cariótipo dos parentais.

Dados sobre a biologia reprodutiva em espécies de pequenos mamíferos não voadores geralmente são obtidas em incursões a campo envolvendo a técnica de marcação-captura-remarcação (Pereira *et al.*, 1993; Bergallo e Magnusson, 1999; Gentile *et al.*, 2000; Feliciano *et al.*, 2002; Aragona e Marinho-Filho, 2009). Na maioria dos estudos, o objetivo é compreender o ciclo reprodutivo das espécies, relacionando picos de atividade reprodutiva a fenômenos ambientais e disponibilidade de alimento, estabelecendo o tempo gestacional, o número de descendentes por ninhada, o tempo necessário para se alcançar a maturidade sexual, a proporção sexual entre os descendentes, etc.

A reprodução de roedores também pode ser estudada em cativeiro a partir de cruzamentos experimentais e geralmente voltados para a saúde pública, já que muitas espécies podem atuar como hospedeiro/reservatório de doenças: *Necromys lasiurus* – peste bubônica (Almeida *et al.*, 1986), *Akodon molinae* (Merani e Lizarralde, 1980; Carballal *et al.*, 1986) e *Calomys laucha* – febre hemorrágica (Hodara *et al.*, 1989), *Nectomys squamipes* (Silva *et al.*, 1992; D’Andrea *et al.*, 1996) e *Akodon cursor* (Machado-Silva *et al.*, 2011) – esquistossomose. Abordagens genéticas também tem sido motivo para a manutenção de colônias em cativeiro, sendo recorrente em *Akodon azarae* e destinando-se à investigação dos mecanismos de transmissão e manutenção da condição heterogamética (XY*) em fêmeas (Espinosa e Vitullo, 1996; Hoekstra e Hoekstra, 2001; Ortiz *et al.*, 2007).

Considerando que as populações de *A. cursor* apresentam variação na frequência das formas cariotípicas e que há indícios de barreira (reprodutiva e/ou geográfica) separando os grupos Norte e Sul, o objetivo desse estudo foi verificar se algum parâmetro reprodutivo da espécie sofre influência do cariótipo e/ou a origem dos parentais, utilizando-se para tanto cruzamentos experimentais envolvendo indivíduos de localidades representativas dos grupos Norte e Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra total é formada por 33 indivíduos matrizes (coletados na natureza), capturados em Una, Bahia (Norte) e em quatro localidades (Castelo, Domingos Martins, Guarapari e Santa Teresa) do Espírito Santo (Sul). São 20 matrizes do clado Norte, sendo seis

fêmeas (todas com $2n=14$) e 14 machos (nove com $2n=14$, dois com $2n=15$ e um com $2n=16$) e 13 (treze) matrizes do clado Sul, sendo seis machos e sete fêmeas, todos com $2n=14$ (**Anexo 3**).

O número diploide dos exemplares foi obtido a partir de cultura de linfócitos adaptado de Rissino (2002) e preparação direta de medula óssea, conforme protocolo adaptado por Fagundes *et al.* (1998). Após coloração comum, pelo menos 20 metáfases por indivíduo foram analisadas para a determinação do número diploide ($2n$), do número de braços autossômicos (NF) e morfologia de cada par cromossômico, seguindo nomenclatura dos pares proposta por Fagundes *et al.* (1998).

Cruzamentos experimentais

Os espécimes foram mantidos em Sala de Experimentação Animal em conformidade com as recomendações e normas do Comitê de Ética da UFES (protocolo 07/2012). Os cruzamentos foram realizados entre julho de 2013 até agosto de 2015. As observações de sobrevivência se estenderam até dezembro de 2015.

A temperatura foi mantida em $24 \pm 2^\circ\text{C}$, e o ciclo de claro/escuro foi o natural da cidade de Vitória, ES. A água foi fornecida *ad libitum* e a dieta dos animais foi baseada em laranja e ração específica para roedores. Cada indivíduo foi mantido em uma caixa de polipropileno específica para roedores de 30x20x13cm forrada com maravalha, enquanto os casais para copular e as fêmeas supostamente prenhes ou lactantes permaneciam em caixas de 49x34x16cm, também forradas com maravalha e tendo disponível algodão para a confecção de ninhos.

A junção dos casais ocorreu sempre ao início da manhã por volta de 8 horas e o comportamento dos indivíduos foi acompanhado pelas 5 horas seguintes, em intervalos de 30 minutos, para verificar a aceitação mútua e identificar possíveis comportamentos agressivos. No caso de agressividade excessiva na primeira hora após a união do casal, os mesmos eram separados e retornavam para caixas de contenção individualizadas. Após uma hora, não havendo sinais de agressividade, o casal era mantido junto por um período de 6 a 8 dias, com monitoramento diário. Após esse período o macho era retirado da caixa da fêmea, retornando para uma caixa de contenção individual pequena, enquanto a fêmea permanecia na caixa grande, sob monitoramento por até 21 dias, tempo superior ao estimado para a gestação na espécie (Pereira *et al.*, 1993).

A partir do 14º dia de separação do macho, as caixas onde estavam as fêmeas supostamente prenhes eram checadas pelo menos duas vezes por dia. Na ausência de filhotes

após 28 dias do início do acasalamento, a fêmea era transferida para a caixa individual de contenção, e anotado que não havia prole. Na presença de filhotes, registrou-se o dia de nascimento e o número de crias. O registro do número de filhotes era observado diariamente até o desmame. Filhotes e mãe permaneceram juntos por, no mínimo, 21 dias até o completo desmame, quando cada filhote era transferido para caixa individual de contenção, com identificação do sexo e do cruzamento do qual se originou.

Análise dos dados

Foram registrados para cada cruzamento, independente do sucesso reprodutivo: 1) receptividade entre macho e fêmea: aceitação, indiferença ou agressividade durante o período de acasalamento; 2) sucesso reprodutivo (SR): taxa entre cruzamentos bem sucedidos que geraram filhotes entre todos os cruzamentos; 3) tempo gestacional em dias (TG): período entre o primeiro dia de contato do casal até a comprovação do nascimento de filhotes, durante as checagens diárias; 4) tamanho da ninhada (TN): número de filhotes nascidos em cada cruzamento bem sucedido; 5) proporção sexual entre os filhotes que sobreviveram ao período de amamentação (recém-nascidos canibalizados pela mãe não foram sexados); 6) tempo de emergência da aparência externa adulta em dias, dada pelo aparecimento de pelos, dentes e orelhas, e abertura dos olhos; 7) mortalidade durante o período de lactação – considerando canibalismo ou outras intercorrências; 8) longevidade – considerando apenas casos de morte natural; 9) números de cruzamentos realizados por cada indivíduo, fazendo-se a distinção entre matrizes e descendentes.

As informações de número diploide ($2n=14, 15$ e 16) e procedência dos indivíduos (Norte ou Sul) foram combinadas em seis grupos de cruzamentos (**Tabela 3.1**). Considerou-se Intraclado o cruzamento em que ambos parentais eram do mesmo clado (Intraclado Norte, Intraclado Sul) e Interclado o cruzamento que envolveu parentais de clados distintos (macho N e fêmea Sul ou vice-versa).

Diferenças significativas de SR entre os grupos foram estimadas usando o teste do χ^2 . Para as variáveis tempo gestacional (em dias) e tamanho da ninhada foram calculados média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e realizada análise de variância (ANOVA) a fim de identificar diferenças significativas entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS® e o nível crítico de significância considerado nos testes foi de 5%.

Os demais parâmetros analisados foram dados qualitativos, não tendo sido realizado tratamento estatístico dos mesmos.

Tabela 3.1 - Grupos de cruzamentos envolvendo parentais com diferentes número diploide (2n) e origem (Norte e Sul).

Tipo de Cruzamento		Parentais	Tipos de casais baseado no 2n* (♀ x ♂)
G1	Intraclado Norte	2n=14 e 2n=16	14 ^N x14 ^N , 14 ^N x16 ^N
G2	Intraclado Norte	2n=15 e 2n=14ou16	15 ^N x14 ^N , 14 ^N x15 ^N , 15 ^N x16 ^N
G3	Intraclado Norte	2n=15	15 ^N x15 ^N
G4	Intraclado Sul	2n=14	14 ^N x14 ^N
G5	Interclado	2n=14 e 2n=16	14 ^N x14 ^S , 14 ^S x14 ^N , 14 ^S x16 ^N
G6	Interclado	2n=15 e 2n=14ou16	15 ^N x14 ^S , 14 ^S x15 ^N

*2n^N=do clado norte, 2n^S=do clado Sul

RESULTADOS

Do total de 185 cruzamentos, 84 (45,4%) foram bem sucedidos e resultaram no nascimento de 315 filhotes, dos quais 281 (89,2%) concluíram o desmame e 97 (34,5%) participaram como parentais em novos cruzamentos após atingirem a maturidade sexual. A maioria dos descendentes gerados em cativeiro que tiveram o cariótipo determinado apresentaram 2n=14 (90,3%) e todos os descendentes que apresentaram 2n=15 tiveram parentais do clado Norte, sendo que pelo menos um desses parentais tinha 2n=15 ou 2n=16, já que no clado Sul apenas o cariótipo 2n=14 foi registrado (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 – Número total de descendentes dos cruzamentos experimentais (n) gerados em cativeiro, com respectivo clado de origem e número diploide (2n) e número de descendentes que participaram de cruzamentos experimentais até Agosto/2015 (n^c). ND=2n não determinado.

Clado	2n	Machos		Fêmeas	
		n	n ^c	n	n ^c
Norte	14	35	8	26	18
	15	12	8	6	5
	16	0	0	1	0
	ND	8	1	6	2
Subtotal 1		55	17	39	25
Sul	14	28	9	23	7
Subtotal 2		28	9	23	7
Interclado	14	58	20	60	13
	15	1	1	2	2
	ND	10	1	5	2
Subtotal 3		69	22	67	17
TOTAL		152	48	129	49

Receptividade entre os casais

Parentais de ambos os sexos do clado Norte mostraram-se dóceis (de fácil manuseio) e desenvolveram obesidade ao longo do tempo de permanência em cativeiro, com machos alcançando 80g e fêmeas 60g. Em exemplares adulto coletados, machos atingiram máximo de 65g e fêmeas de 50g.

Os representantes do clado Sul foram proporcionalmente menores e mais agitados (de difícil manuseio, sempre buscando meios de escapar durante os procedimentos de limpeza das caixas de contenção), sendo que os machos apresentaram peso máximo de 60g e fêmeas de 45g. As observações e anotações de peso não foram realizadas de forma sistematizada, logo, não foi possível realizar o tratamento estatístico desses dados. Em descendentes interclado essas características apresentaram-se arbitrariamente e não foi observada relação entre essa característica e número diploides dos exemplares.

Em nenhum dos 185 cruzamentos realizados foi possível visualizar o momento da cópula durante o monitoramento diário dos casais, que ocorriam pelo menos uma vez por dia, prioritariamente pela manhã. Entre os casais foram observados interações positivas e negativas.

Foram consideradas interações positivas (92,5% dos casos) aquelas em que houve reconhecimento entre o casal, caracterizado pela aproximação com toque (focinho-focinho ou focinho-genitália) nos primeiros 10 minutos de contato, seguida de formação de ninho em conjunto, ou pela aproximação sem toque nos primeiros 10 minutos de contato e subsequente formação de ninhos distintos.

O comportamento agressivo (7,5% dos casos) ocorreu por parte de ambos ou apenas um dos indivíduos. Caracterizou-se pela perseguição mútua, ou perseguição persistente de um indivíduo e fuga sistemática ou enfrentamento por parte do outro. Cinco cruzamentos com comportamento agressivo levaram à morte do(a) parceiro(a) e nove foram não fatais. Todos os casos em que houve agressividade fatal ocorre durante o período noturno, culminando na morte de um dos indivíduos no período compreendido entre as checagens diárias.

Em todos os casos de agressividade com morte, ambos os parentais eram do clado Sul e tinham $2n=14$. Em dois dos cinco casos de canibalismo fatal as fêmeas tiveram filhotes após o período de 21 dias, confirmando que o acasalamento pode ocorrer mesmo quando há reações agressivas entre o casal (**Tabela 3.3**).

Todos os casos de agressividade não fatal se caracterizaram pela lesão da cauda e, no caso mais extremo, pela lesão do flanco, que foi o único caso de cruzamento interclado com agressão registrada, sendo o macho do clado Sul (E27, **Tabela 3.3**). Nos 89% de casos de agressividade no clado Norte, metade dos casos o parental agressor foi a fêmea, com ambos parentais 2n=14 (50%), seguido de fêmeas 2n=14 x machos 2n=16 (25%), fêmeas 2n=15 x machos 2n=14 e por último ambos parentais 2n=15 (12,5% cada)

Assim, nossos dados mostram que indivíduos do clado Sul, machos e fêmeas, apresentam elevados níveis de agressividade com mutilação ou morte do parceiro(a), enquanto no clado Norte a frequência de fêmeas agressoras é maior, porém a agressão é menos comprometedora, estando associada a lesões da cauda.

Tabela 3.3 – Cruzamentos em que houve comportamento agressivo entre um ou ambos os sexos durante o período em que permaneceram unidos para cruzamento. * = um indivíduo da prole foi vítima de canibalismo.

Cruzamento (vide Anexo 5)	Fêmeas		Machos		Sexo agressor	Tipo de agressão	Prole	
	clado	2n	clado	2n			sim/não	2n
S17	Sul	14	Sul	14	F	fatal	não	
S18	Sul	14	Sul	14	F	fatal	sim, 5	14
S36	Sul	14	Sul	14	M	fatal	não	
S39	Sul	14	Sul	14	F	fatal	sim, 3	14
S41	Sul	14	Sul	14	M	fatal	não	
N3	Norte	14	Norte	14	F e M	não fatal	não	
N21	Norte	14	Norte	16	F e M	não fatal	sim, 1*	15
N24	Norte	14	Norte	14	F	não fatal	sim, 5*	14
N25	Norte	14	Norte	14	F	não fatal	sim, 4	14
N28	Norte	14	Norte	14	F e M	não fatal	sim, 2	14
N33	Norte	14	Norte	16	F	não fatal	sim, 3	15
N45	Norte	15	Norte	14	F e M	não fatal	não	
N70	Norte	15	Norte	15	F	não fatal	não	
E27	Norte	15	Sul	14	M	não fatal	não	

Sucesso reprodutivo

O sucesso reprodutivo (SR) variou entre os cruzamentos e foi influenciado pelo cariótipo dos parentais e clado de origem (**Tabela 3.4**).

Em relação ao cariótipo, os maiores valores de SR (aproximadamente 60%) ocorreu em cruzamentos em que os parentais apresentaram as formas homomórficas 2n=14 e 2n=16 (G1 e G5), seguido pelos cruzamentos nos quais pelo menos um parental tinha 2n=15 (G2 e G6) (33 a 45%) e finalmente pelos cruzamentos em que ambos os parentais tinham 2n=15 (G3) (5,9%).

O grupo G4, embora formado por cruzamentos entre indivíduos de $2n=14$, apresentava valores significativamente inferiores de SR (35,7%) em relação aos demais grupos e inclusive ao grupo G1, que também contém cruzamentos entre parentais com $2n=14$ (**Figura 3.1**).

Na análise comparativa par-a-par dos grupos G1 a G6 (**Tabela 3.5**) verificou-se que o SR é significativamente menor que todas as combinações cariotípicas quando ambos os parentais são $2n=15$. Quando os parentais possuíam $2n=14$ ou $2n=16$, o SR dos cruzamentos intraclado Sul eram inferiores aos comparados aos cruzamentos intraclado Norte e Interclado. Nos grupos G2 e G6, com pelo menos um parental $2n=15$, os cruzamentos interclado (G6) apresentaram SR significativamente maior que os intraclado Norte (G2), indicando que não há isolamento reprodutivo completo entre indivíduos dos clados Norte e Sul, mesmo quando o indivíduo do clado Norte apresenta o cariótipo $2n=15$.

Tabela 3.4 – Sucesso Reprodutivo para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.

TIPO	ORIGEM PARENTAIS	$2n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$	CRUZAMENTOS			
			REALIZADOS	COM SUCESSO	SR ¹	χ^2 (p-VALOR)
G1	Intraclado Norte	14 x 14 ou 14 x 16	43	26	60,5%	
G2	Intraclado Norte	14 x 15, 15 x 14 ou 15 x 16	21	7	33,3%	
G3	Intraclado Norte	15 x 15	17	1	5,9%	
G4	Intraclado Sul	14 x 14	42	15	35,7%	
G5	Interclado	14 x 14 ou 14 x 16	50	30	60,0%	
G6	Interclado	14 x 15 ou 15 x 14	12	5	41,7%	
TOTAL			185	84	45,4%	0,001

¹ Sucesso reprodutivo = porcentagem de cruzamentos em que pelo menos um descendente foi gerado. Valor significativo de $p < 0,05$.

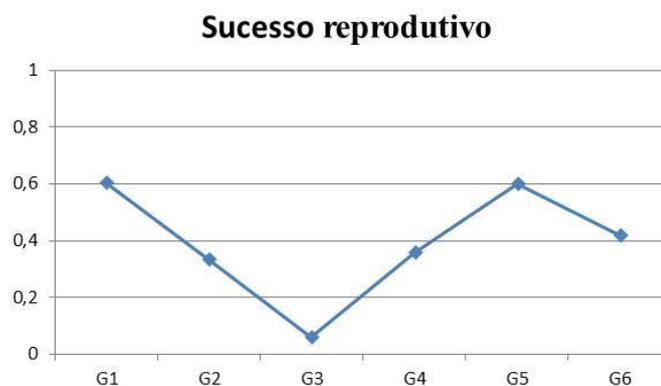


Figura 3.1 – Frequência de sucesso reprodutivo levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais. As características dos grupos estão detalhadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.5 – Valores de significância do sucesso reprodutivo para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais. Valor de χ^2 significativo $p < 0,05$ (em negrito).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	-					
G2	,041	-				
G3	,000	,039	-			
G4	,022	,852	,020	-		
G5	,964	,040	,000	,020	-	
G6	,246	,632	,019	,706	,250	-

Tempo gestacional gestacional

O período de gestação, ou seja, aquele compreendido entre o primeiro dia de união do casal e o dia do nascimento, variou de 21 a 28 dias, com média de 24,70 ($\pm 1,527$). Não houve variação significativa no período de gestação de fêmeas nos grupos formados, seja quando comparados em conjunto (**Tabela 3.6, Figura 3.2.a**) ou aos pares (**Tabela 3.7**).

Um caso de estro pós-parto foi observado em uma fêmea (clado Sul, $2n=14$) no qual, depois de quatro após ser coletada foi colocada para cruzar em cativeiro (cruzamento S3, **Anexo 5**). Completados os sete dias de união do casal (período destinado a cópula), quando o macho deveria retornar a caixa individual, verificou-se o nascimento de 2 filhotes, o que revela que essa fêmea foi capturada prenhe e que permaneceu na companhia do macho por 23-24 horas (intervalo entre as checagens diárias) após o nascimento desses filhotes. Passados 24 dias do nascimento dos primeiros dois filhotes verificou-se o nascimento de outros 6, descendentes do cruzamento realizado em cativeiro.

Tamanho da ninhada

O número de filhotes nascidos por ninhada variou de 1 a 7, com média de 3,69 ($\pm 1,423$) (**Figura 3.2.b**), não havendo qualquer relação significativa entre número de filhotes nascidos e o cariótipo ou o clado de origem dos parentais (**Tabelas 3.6 e 3.7**).

Tabela 3.6 – Tempo gestacional e tamanho da ninhada para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.

TIPO	CRUZ. COM SR	TEMPO GESTACIONAL			TAMANHO DA NINHADA			RAZÃO SEXUAL ♂:♀
		Média (D.P)	Mín-Máx	ANOVA (p-valor)	Média (D.P)	Mín-Máx	χ^2 (p-valor)	
G1	26	24,62 ($\pm 1,699$)	21-28		3,46 ($\pm 1,529$)	1-6		1,403:1
G2	7	24,00 ($\pm 0,816$)	23-25		3,29 ($\pm 1,380$)	1-5		1,056:1
G3	1	24,00	24		2	2		1:1
G4	15	24,67 ($\pm 1,676$)	23-28		3,73 ($\pm 1,486$)	1-7		1,353:1
G5	30	25,03 ($\pm 1,472$)	23-28		4,03 ($\pm 1,351$)	1-7		1,247:1
G6	5	24,25 ($\pm 1,258$)	23-26		3,60 ($\pm 1,140$)	2-5		1,367:1
	84	24,70 ($\pm 1,527$)	21-28	0,439	3,69 ($\pm 1,423$)	1-7	0,499	1,304:1

³ Sucesso reprodutivo = porcentagem de cruzamentos em que pelo menos um descendente foi gerado.

Valor significativo de $p < 0,05$.

Tabela 3.7 – Valores de significância do tempo gestacional (diagonal inferior) e do tamanho da ninhada (diagonal superior com destaque em cinza) para cada grupo de cruzamento (G) considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais. Nenhum valor de χ^2 foi significativo ($p > 0,05$).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	-	,785	,357	,583	,143	,850
G2	,364	-	,417	,509	,189	,686
G3	,725	1,00	-	,278	,150	,269
G4	,926	,334	,706	-	,501	,857
G5	,254	,062	,461	,374	-	,504
G6	,449	1,00	1,00	,427	,119	-

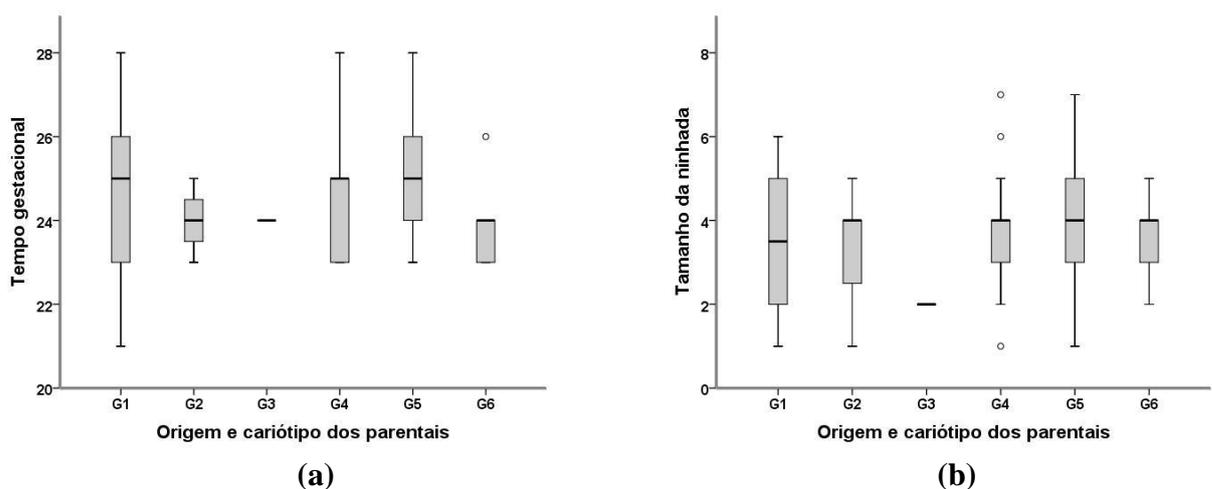


Figura 3.2 – a) Tempo gestacional (em dias) de *A. cursor* levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais. b) Número de filhotes nascidos por ninhada em cruzamentos de *A. cursor* levando-se em consideração o cariótipo e a origem dos parentais.

Razão sexual entre os filhotes e emergência da aparência externa adulta

A proporção sexual entre os filhotes após o desmame foi equilibrada no grupo G3 e G2, com predominância de machos nos demais casos, média de 1,3 machos:1 fêmea. (**Tabela 3.6**).

A emergência da aparência externa adulta, com o aparecimento de pelos, dentes, orelhas e abertura dos olhos foi concluída após 14 dias de nascido em todos os casos, sendo necessários outros 7 dias para independência alimentar. Dois casos foram registrados em que a mãe morreu durante a lactação (cruzamentos I41 e I61, **Anexo 5**), porém os filhotes com 15 dias de nascido sobreviveram.

Mortalidade no período de lactação

A mortalidade dos filhotes durante a lactação foi de 10,98% (34 filhotes, 18 ninhadas), estando associado a canibalismo materno, canibalismo fraterno e amamentação desigual.

O canibalismo materno ocorreu em até 7 dias após o nascimento das crias, e variou de 1 a 6 filhotes por ninhada, totalizando 27 filhotes em 15 ninhadas e envolvendo fêmeas com $2n=14$ e machos com $2n=14$, 15 e 16 (**Tabela 3.8**). O maior número de registros foi observado no clado Norte, com 18 filhotes canibalizados em 8 ninhadas, sendo o caso mais extremo registrado para uma fêmea (cruzamento N61, **Anexo 5**) que devorou, em um intervalo de 24 horas, todos os seis filhotes recém-nascidos. Em nova ninhada da mesma fêmea ($2n=14$) com o mesmo macho ($2n=16$; cruzamento N64, **Anexo 5**), foram canibalizados três dos seis filhotes gerados.

O canibalismo fraterno ocorreu em uma situação singular em que os filhotes de uma mesma ninhada (cruzamento N29, $2n=14 \times 2n=16$, **Anexo 5**) permaneceram na mesma caixa de contenção após o desmame no tempo regular e, em um intervalo de 24 horas, dos seis filhotes, apenas uma fêmea sobreviveu. A mãe dessa ninhada foi, posteriormente, canibalizada pelos filhotes que teve em outro cruzamento (N49, $2n=14 \times 2n=15$, **Anexo 5**) durante a lactação. Os casos de amamentação desigual ocorreram em dois cruzamentos interclado (E65 e E68, ambos $2n=14 \times 2n=14$, **Anexo 5**) cujo desenvolvimento dos filhotes seguiu o mesmo padrão: cada fêmea gerou 3 filhotes, e ao longo do período de lactação, um permaneceu sempre maior e mais desenvolvido, outro extremamente pequeno e subdesenvolvido e o terceiro com características intermediárias. Antes do 21º dia (tempo estimado para o desmame) o filhote de menores proporções morreu nos dois casos.

Tabela 3.8 – Mortalidade de filhotes durante o período de lactação considerando a variação do número diploide e o clado de origem dos parentais.

MORTALIDADE NO PERÍODO DE LACTAÇÃO						
TIPO	Causa	Nº de ninhadas	Nº de filhotes/ninhada	Total de mortes	2n parentais (♀ x ♂)	2n da ninhada
G1	Canibalismo materno	5	1-2	8	14 x 14	14
		3	1-6	10	14 x 16	15
	Canibalismo fraterno	1	5	5	14 x 16	15
G4	Canibalismo materno	3	1-3	5	14 x 14	14
G5	Canibalismo materno	3	1	3	14 x 14	14
	Amamentação desigual	2	1	2	14 x 14	14
G6	Canibalismo materno	1	1	1	14 x 15	n/d
TOTAL		18	1-6	34		

Longevidade e capacidade reprodutiva

A longevidade em indivíduos matriz não pode ser estimada, pois não se sabia a idade dos indivíduos ao serem capturados, nesse caso, o que se estimou foi o tempo de permanência dos mesmos em cativeiro, que variou de 2 a 31 meses, sendo que exemplares do clado Norte, por terem sido capturados 24 meses antes dos exemplares do Sul, apresentaram expectativa de vida mais alta (**Anexo 4**).

Dentre os indivíduos matrizes que morreram (n=19), 42,1% (n=8) foram de causas naturais, 36,9% (n=7) foram para a realização de outros procedimentos (análises citogenéticas e/ou histológicas, de morfologia externa e/ou anatomia interna), 10,5% (n=2) por agressão do parceiro durante permanência juntos para cruzamento e outros 10,5% (n=2) foram eutanasiados por exibirem debilidade motora avançada.

O nascimento de filhotes ocorreu do 2º até 24º mês de permanência dos indivíduos matrizes em cativeiro. Dos 33 matrizes que compunham a amostra (**Anexo 3**) somente um não participou de qualquer cruzamento, pois morreu com poucos dias de coletado, enquanto os demais indivíduos participaram de 1 a 16 acasalamentos (**Figura 3.3a**).

Dentre os espécimes nascidos em cativeiro, a maior longevidade foi 27 meses. A capacidade de gerar filhotes ocorreu entre 3-18 meses. Dos 281 filhotes que concluíram a lactação, 97 (cerca de 34,5%) participaram de cruzamentos, variando entre 1 a 10 cruzamentos (**Figura 3.3b**).

Anomalias

Algumas anomalias foram registradas exclusivamente em indivíduos com $2n=14$: tumor adjacente a perna em uma fêmea (resultante do cruzamento N1), eutanasiada com 14 meses de vida (**Figura 3.4a**); pelagem escassa em um macho (resultante do cruzamento N73), que foi sacrificado com 1 mês de vida por receio de tratar-se de possível doença contagiosa (**Figura 3.4b**); tumor abdominal em fêmea (gerada pelo cruzamento N42), não detectado até o momento da eutanásia aos 8 meses (**Figura 3.4c**); ausência congênita de uma das patas traseiras em fêmea nascida do cruzamento I53 e ainda viva (**Figura 3.4d**). Essa última anomalia também foi observada em uma fêmea matriz capturada em Santa Teresa/ES.

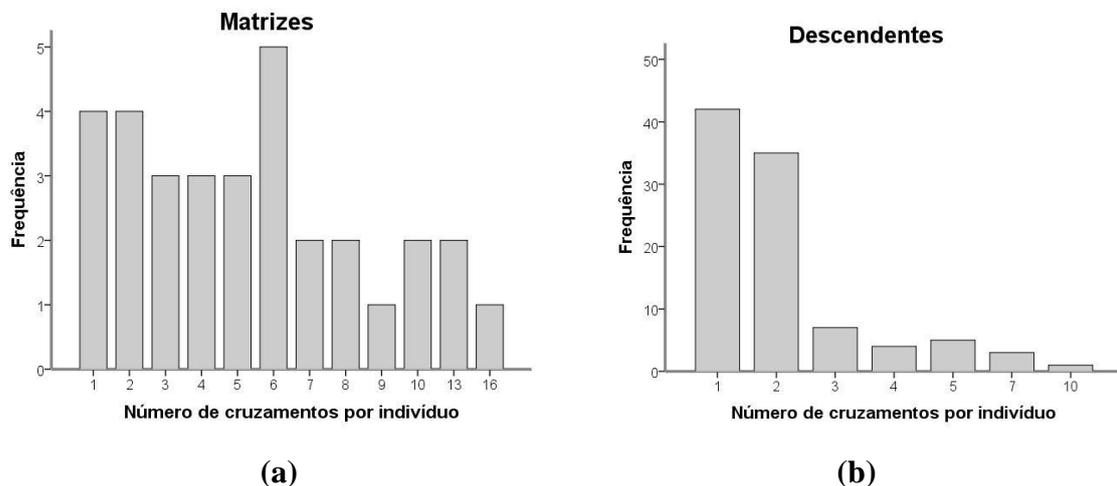


Figura 3.3 – Número total de participações em cruzamentos por indivíduo matriz (a) e por descendentes gerados em cativeiro (b).



Figura 3.4 – Anomalias em prole de *A. cursor* nascidos em cativeiro. a) massa tecidual adjacente à perna direita do exemplar LGA 4074 ($2n=14$, clado Norte); b) pelo atípico e escasso em LGA4525 ($2n=14$, clado Norte); c) tumor abdominal em LGA 4269 ($2n=14$, clado Norte). Foto tirada durante preparação do espécime para taxidermia; d) ausência da pé posterior em LGA4919 ($2n=14$, Interclado). O exemplar LGA 4480 ($2n=14$, matriz coletada em Santa Teresa, ES) também apresentou a mesma anomalia.

DISCUSSÃO

A manutenção de *A. cursor* em condições laboratoriais para reprodução foi de grande sucesso, tendo sido gerados 315 indivíduos em 86 cruzamentos bem sucedidos ao longo de dois anos de experimento. A facilidade dessa espécie em se reproduzir em cativeiro já havia sido mencionada em trabalhos anteriores (Pereira *et al.*, 1993; Sbalqueiro e Nascimento, 1996; Fagundes *et al.*, 1998), porém, nunca envolvendo um número tão elevado de cruzamentos e descendentes gerados.

Trata-se do primeiro registro na literatura de cruzamentos extensivamente realizados com o objetivo de se discutir aspectos reprodutivos de *A. cursor*, considerando possíveis influências do cariótipo e da origem geográfica dos parentais. Apesar da presente amostra contar exemplares dos três complementos cromossômicos conhecidos para a espécie, apenas em matrizes do Norte foi possível encontrar as formas $2n=15$ e $2n=16$.

Indivíduos matriz Norte e Sul apresentaram considerável diferença de tamanho e atividade, sendo os indivíduos do Norte maiores e mais lentos que os do Sul. Além disso verificou-se um nível de estresse maior entre exemplares do sul, refletido em agressividade que levou à morte do parceiro quando em contato para acasalamento.

Registros de agressões já foram relacionadas à necessidade de distanciamento por parte de fêmeas grávidas ou pelo casal. Estudo das interações macho-fêmea de *Akodon azarae* mantidos em confinamento, Suárez e Kravetz (2001) revelaram diferenças na tolerância social desses indivíduos, sendo que no período reprodutivo o casal tendeu a permanecer mais distante um do outro do que em períodos não reprodutivos. Os autores verificaram ainda que, em média, casais em que a gravidez foi constatada, a distância entre o casal chegou a 4,22 m, enquanto no período não-reprodutivo essa distância diminuiu para aproximadamente 1,25 m. Esses autores também sugeriram que a agressividade por parte das fêmeas sinaliza cuidado parental ou defesa do território de nidificação, onde os filhotes nascerão.

Esse resultado vai ao encontro do observado em *A. cursor*, no qual duas das três fêmeas que agrediram e canibalizaram seus parceiros vieram a ter filhotes em seguida. Além disso, como os casais unidos de *A. cursor* ficaram confinados em caixas de contenção que permitiam o distanciamento máximo de 50 cm, acredita-se que a pouca distância possa ter contribuído para o aumento do estresse. As agressões fatais ocorreram sempre no período noturno, o que vai ao encontro de resultados envolvendo experimento de cronobiologia (usado para avaliar o

horário de atividade dos animais) realizado por Oliveira e Rocha (2009), que identificaram que o período noturno (a partir das 18h) é o de maior a atividade em *A. cursor*.

O sucesso reprodutivo foi significativamente menor entre parentais $2n=15$ quando comparados aos parentais $2n=14$ e $2n=16$, sendo os melhores resultados obtidos entre parentais homomórficos para o rearranjo, sugerindo que a condição heterozigota tende a apresentar problemas maiores na reprodução, concordando com afirmações de White (1978) de que rearranjos tendem a trazer prejuízos para a espécie pela formação de gametas com desbalanço gênico. No entanto, a redução da taxa de SR também foi observada quando ambos representantes eram do clado Sul. A agressividade nesse grupo foi maior, podendo contribuir para esses achados.

O nascimento de filhotes ocorreu ao longo de todo o ano, refletindo o sucesso de reprodução da espécie em confinamento. Diversos trabalhos com *A. cursor* também reportaram que a reprodução dessa espécie ocorre ao longo de todo o ano, com picos reprodutivos na estação seca, de maio a agosto (Pereira *et al.*, 1993; Bergallo e Magnusson, 1999; D'Andrea *et al.*, 1999; Gentile *et al.*, 2000; Feliciano *et al.*, 2002). Gentile *et al.* (2000) realizaram monitoramento de populações naturais de *A. cursor* durante cinco anos e descreveram que a maior atividade reprodutiva estava relacionada à disponibilidade de alimento e de habitat. No presente estudo esse fator não foi restritivo, já que o ambiente foi controlado, era seguro e apresentou oferta constante de alimento ao longo de todo o ano. Logo, tanto em ambiente natural quanto em ambiente artificial *A. cursor* apresentou poliestria panestacional.

O tempo médio de gestação foi de 24,7 dias (com predominância de 25), um pouco maior do que o já registrado para *A. cursor* em outros trabalhos: 21 dias (Pereira *et al.*, 1993), 22,7 dias (Feliciano *et al.* 2002) e 23 dias (De Conto e Cerqueira, 2007). Em compilação realizada por De Conto e Cerqueira (2007), a média gestacional em sete espécies de *Akodon* variou de 23 a 25,2 dias. No presente trabalho, a variação foi de 21 a 28 dias de gestação, o que sugere que o intervalo entre estros é igual ou inferior a 7 dias, tendo havido fecundação do primeiro ao último dia de permanência junto do casal.

O estro pós-parto aqui registrado evidencia que a concepção pode ocorrer no primeiro dia de junção dos casais, pois nesse caso o macho permaneceu somente um dia com a fêmea após o nascimento dos filhotes, em intervalo inferior a 24 horas. Casos de estro pós-parto foram registrados para *A. cursor* (Pereira *et al.*, 1993) e outras espécies de *Akodon*, *A. lindberghi* (De Conto e Cerqueira, 2007), *A. boliviensis* (Piantanida *et al.*, 1995), *A. molinae* (Buzio *et al.*,

2001) e *A. dolores* (Piantanida, 1987), sendo um processo de alto custo energético, já que a manutenção corporal, lactação e gestação ocorrem simultaneamente (De Conto e Cerqueira, 2007). No entanto, esse fato não parece ter gerado estresse para a fêmea de *A. cursor* no único caso aqui registrado, visto que ela amamentou dois filhotes enquanto mantinha uma nova gestação de seis filhotes, sem qualquer registro de agressividade ou canibalismo para com as crias. Suárez e Kravetz (2001) citaram o caso no qual uma fêmea de *A. azarae* que teve estro pós-parto expulsou o macho do ninho. Esse padrão, juntamente com a agressividade observada, sugere que *A. cursor* apresente um padrão reprodutivo do tipo promíscuo poligínico, no qual o macho não participa do cuidado da prole e seu comportamento reprodutivo, na natureza, não se limita a um único acasalamento por período.

Gentile *et al.* (1997) afirmaram que em Akodontini, as fêmeas são territorialistas, enquanto os machos podem sobrepor sua área de ocupação, cobrindo maior território e exercendo a poliginia. A aceitação de múltiplos parceiros pela fêmea, aqui registrado, parece não ter sido problema nem para os machos nem para as fêmeas de *A. cursor*, já que o nascimento de filhotes ocorreu indistintamente, independente do parceiro. Não houve qualquer padrão gestacional diferenciado associado ao cariótipo dos parentais ou origem dos clados.

A variação de 1 a 7 filhotes, com média de 3,69 por ninhada, foi semelhante ao já registrado para a espécie em trabalhos anteriores e nenhuma diferença significativa foi registrada em relação ao cariótipo ou clado de origem dos parentais. Pereira *et al.* (1993) relataram uma média de 3,6 crias, com amplitude de 1 a 6 por ninhada. Feliciano *et al.* (2002) reportaram ninhadas com até 10 filhotes, muito embora o comum fosse encontrar de 3 a 5 filhotes por ninhada. De Conto e Cerqueira (2007) mencionaram que o número de crias variou de 2 a 9 para a espécie, com média de 5 a 6 filhotes por ninhada. Silva *et al.* (2015) registraram para *A. cursor* a média de 4,7 filhotes por ninhada com variação de 2-7 filhotes por ninhada, e afirmaram que esse padrão é concordante com o observado nos demais sigmodontinos, que são estrategistas *r*, com tendência a apresentarem pequeno porte, terem curto período de vida, alcançarem a maturidade sexual precocemente e gerar ninhadas grandes e múltiplas no ano.

O tempo registrado para o desmame foi de três semanas, no entanto, estudos anteriores registraram que o desmame ocorreu com quatro (Pereira *et al.*, 1993) e duas semanas (Feliciano *et al.*, 2002). Assim, 15 dias é o tempo mínimo necessário para garantir a independência alimentar e sobrevivência dos filhotes, muito embora ao final desse período ainda estejam com peso e dimensões reduzidas.

A maturidade sexual usualmente é estimada pelo aparecimento do testículo escrotal nos machos e pela abertura da vagina nas fêmeas, pois são indícios da puberdade (Gentile *et al.*, 2000). Esses autores usaram esses parâmetros e descreveram que em *A. cursor* a maturidade variou de 31,6 a 36,7 dias e 28g, para machos, e 38,8 a 51,2 dias e 30g, para fêmeas. Nowak (1991) mencionou que a maturidade foi alcançada por volta dos 2 meses para ambos os sexos. No entanto, verificou-se no presente trabalho que indivíduos com menos de 90 dias eram mais agitados, principalmente os do clado Sul, e resistiram à presença de um parceiro(a) com enfrentamento ou tentativa de fuga da caixa de contenção. Assim, o prazo mínimo de 90 dias é o ideal para o início dos acasalamentos.

Em outros Akodontine a proporção sexual tende a se manter de 1:1 (*A. lindberghi*, *A. dolores* – Piantanida, 1987 – e *A. molinae* – Merani e Lizarralde, 1980). No presente estudo houve um desvio da razão sexual para a maioria dos grupos (exceto G2 e G3), com maior nascimento de machos, tanto em cruzamentos intra como interclado.

O canibalismo materno ocorreu em ninhadas de cruzamentos intra (G1 e G4) e interclado (G6), em ninhadas com filhotes de $2n=14$ e $2n=15$, sendo que em todos os casos as mães apresentaram $2n=14$. No entanto, os maiores valores de filhotes canibalizados por ninhada foram os que apresentaram $2n=15$.

Em outras espécies de *Akodon* há registros de canibalismo pré-desmame, indicando que pode ser uma forma de repor as energias gastas no parto. Merani e Lizarralde (1980) registraram cerca de 10,5% de canibalismo durante o período de lactação em *A. molinae*, mas afirmaram que o canibalismo era maior no início dos experimentos e diminuía ao longo das dez gerações de cruzamentos, tratando-se de adaptação ao confinamento. Em *A. azarae*, Espinosa (1995) reportou 32% de mortalidade pré-desmame. No entanto, um caso extremo no presente trabalho em que um mesmo casal ($2n=14$ e $2n=16$) do Norte gerou duas ninhadas com seis crias cada, todos os filhotes com $2n=15$, e a fêmea canibalizou todos os filhotes da primeira ninhada e três da segunda. No único caso de canibalismo fraterno registrado, toda a ninhada de seis apresentou $2n=15$ e somente uma fêmea sobreviveu, sendo canibalizados 4 machos e uma fêmea. Em outro caso, filhotes $2n=15$ participaram do canibalismo da mãe ($2n=14$) durante o período de lactação. Assim, nossos dados sugerem que indivíduos $2n=15$ apresentaram um maior nível de agressividade em relação a $2n=14$ e $2n=16$.

Indivíduos matrizes chegaram a sobreviver por 31 meses em cativeiro e os descendentes por 27 meses sem, necessariamente, refletir na redução de sua fertilidade ou no

desenvolvimento de doenças. Em indivíduos de *Calomys laucha* mantidos em condições laboratoriais cerca de 90% dos indivíduos morreram entre 27-28 meses (Hodara *et al.*, 1989), enquanto Espinosa (1995) obtiveram como média de vida em cativeiro para *A. azarae* 8 meses para fêmeas e 10 meses para machos. Esses dados mostram que, em nossos estudos com *A. cursor*, a média de vida alcançada pelos indivíduos foi consideravelmente alta e constitui um indício do sucesso na manutenção desses animais em cativeiro.

Finalmente, de todos os parâmetros relacionados à biologia reprodutiva de *A. cursor*, apenas a tendência à agressividade está relacionada ao cariótipo (2n=15 mais agressivo que 2n=14 e 2n=16) e ao clado de origem (intraclado Sul mais agressivo que intraclado Norte e Interclado) dos parentais. A capacidade de gerar crias (sucesso reprodutivo) apresentou correlação com o cariótipo, sendo menor quando ambos os parentais apresentam 2n=15. Todos os demais parâmetros não mostraram qualquer correlação com cariótipo ou clado de origem dos parentais, mas ampliaram significativamente os registros sobre a biologia reprodutiva da espécie.

Referências bibliográficas

- Almeida CR, Almeida AMP, Brasil DP, Sobrinho JD and Leal MAM (1986) Estudo do roedor *Akodon arviculoides*, Wagner, 1842 (Cricetidae) – Importância nos focos pestosos do Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81(4):409-416.
- Aragona M and Marinho-Filho J (2009) História natural e biologia reprodutiva de marsupiais no Pantanal, Mato Grosso, Brasil. Zoologia 26(2):220-230.
- Aulchenko YS, Araripe LO, D'Andrea PS, Shishkin AA, Cerqueira R, Borodin PM and Axenovich TI (2002) Inheritance of litter size at birth in the Brazilian grass mouse (*Akodon cursor*, Sigmodontinae, Rodentia). Genetics Research Cambridge 80:55-62.
- Bergallo HG and Magnusson WE (1999) Effects of climate and food availability on four rodent species in Southeastern Brazil. Journal of Mammalogy 80(2):472-486.
- Buzzio OL, Koninckx A, Carreno NB and Castro-Vazquez A (2001) Embryo implantation during the short luteal phase of the corn mouse, *Calomys musculinus*, and the apparent lack of a lactational diapause in South American murid rodents. Reproduction 121(5):815-823.

- Carballal G, Videla C, Dulout F, Cossio PM, Acuña AM and Bianchi NO (1986) Experimental infection of *Akodon molinae* (Rodentia, Cricetidae) with junín virus. *Journal of Medical Virology* 19:47-54.
- Colombi VH (2010) Diversidade cariotípica em *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae). Monografia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):785-789.
- D'Andrea PS, Horta C, Cerqueira R and Ley L (1996) Breeding of the water rat (*Nectomys squamipes*) in the laboratory. *Laboratory Animals* 30:369-376.
- D'Andrea OS, Gentile R, Cerqueira R, Grelle CEV, Horta C and Rey L (1999) Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(3): 611-620.
- De Conto V and Cerqueira R (2007) Reproduction, development and growth of *Akodon lindberghi* (Hershkovitz, 1990) (Rodentia, Muridae, Sigmodontinae) raised in captivity. *Brazilian Journal of Biology* 67(4):707-713.
- Espinosa MB (1995) *Akodon azarae* (Rodentia-Cricetidae): breeding, management and reproductive performance in laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology* 55(2): 201-206.
- Espinosa MB and Vitullo D (1996) Offspring sex-ratio and reproductive performance in heterogametic females of the South American field mouse *Akodon azarae*. *Hereditas* 124:57-62.
- Fagundes V, Christoff AU and 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.
- Feliciano BR, Fernandez FAS, Freitas D and Figueiredo MSL (2002) Population dynamics of small rodents in grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mammalian Biology* 67:304-314.

- Gentile R, D'Andrea OS and Cerqueira R (1997) Home rangers of *Philander frenata* and *Akodon cursor* in a Brazilian Restinga (Coastal Shrubland). *Mastozoologia Neotropical* 4(2):105-112.
- Gentile R, D'Andrea OS, Cerqueira R and Maroja LS (2000) Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 35:1-9.
- Hodara VL, Espinosa MB, Merani MS and Quitans C (1989) *Calomys laucha* (Rodentia, Cricetidae): growth and breeding in laboratory conditions. *Laboratory Animals* 23:340-344.
- Hoekstra HE and Hoekstra JM (2001) An unusual sex-determination system in South American field mice (Genus *Akodon*): the role of mutation, selection, and meiotic drive in maintaining XY females. *Evolution* 55(1): 190-197.
- Machado-Silva JR, Neves RH, Rodrigues-Silva R, Oliveira RMF and Maldonado Júnior A (2011) Assessment of *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae) as permissive host to *Schistosoma mansoni* infection: morphology of adult worms. *Acta Parasitologica* 56(2): 147-153.
- Merani MS and Lizarralde MS (1980) *Akodon molinae* (Rodentia Cricetidae), a new laboratory animal: breeding, management and reproductive performance. *Laboratory Animals* 14:129-131.
- Nogueira CDA and Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- Nowak RM (1991) Walker's mammals of the World. 5th ed. London: The Johns Hopkins University Press.
- Oliveira CGL and Rocha PLB (2009) Diferenças sexuais na habilidade espacial de *Akodon cursor*. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*.
- Ortiz MI, Pinna-Senn E, Dalmasso G and Lisanti JA (2007) Chromosomal aspects and inheritance of the XY female condition in *Akodon azarae* (Rodentia, Sigmodontinae). *Mammalian Biology* 74:125-129.

- Pereira LA, Chagas WA and Costa JE (1993) Ecologia de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica, Brasil. I. Ciclos reprodutivos de *Akodon cursor*, *Nectomys squamipes* e *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae). *Revista Bras. de Zoologia* 10(3):389-398.
- Piantanida MJ (1987) Distintos aspectos de la reproducción em la naturaliza y em cautiverio del roedor cricétido (*Akodon dolores*) (Thomas, 1916). *Physis* 45:47-58.
- Piantanida M, Pettovello A and Bordarrampe P (1995). Reproduccion y crecimiento en cautiverio de *Akodon boliviensis* y *Akodon alterus* (Rodentia, Cricetidae). *Physis* 50(118-119): 55-61.
- Piantanida M and Barrantes GE (1998) Growth studies in *Akodon dolores* (Rodentia: Muridae) in captivity. *Acta Theriologica* 43(2): 185-193.
- Rissino JD (2012) Análise de células-tronco adultas (CTA) em cultura de células de tecido epithelial de pequenos roedores (Rodentia-Stricognathi-Sciurognathi). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Sbalqueiro IJ and Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19(4):565-569.
- Silva RR, Machado-Silva, JR, Faerstein NF, Lenzi HL and Rey L (1992) Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*. Parasitological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87:271-276.
- Silva MPL, Leite YLR and Costa LP (2015) Litter size and embryo implantation in Neotropical rodents. *Oecologia Australis* 19(1):183-194.
- Suárez OV and Kravetz FO (2001) Male-female interaction during breeding and non-breeding seasons in *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). *Iheringia, Série Zoologia* 91:171-176.
- White MJD (1978) *Modes of Speciation*. W. H. Freeman and Company, São Francisco.

CAPÍTULO 4

**VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA EM *AKODON*
CURSOR INVESTIGADA À LUZ DO PADRÃO
REPRODUTIVO DE HÍBRIDOS
ENTRE *A. CURSOR* E *A. MONTENSIS***

RESUMO

Híbridos entre *Akodon cursor* (Winge, 1887) e *A. montensis* Thomas, 1913 foram registrados em populações naturais no estado de São Paulo, e gerados em cativeiro. Do ponto de vista citogenético, as espécies parentais apresentam $2n=16$, 15 e 14 (*A. cursor*, ACU) e $2n=24$, 25 e 26 (*A. montensis*, AMO), são espécies irmãs, crípticas e com simpatria nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Os cariótipos registrados para os híbridos compreendem as formas intermediárias dos cariótipos parentais, $2n=19$ e $2n=20$. Dados prévios de histologia de testículo apontam que híbridos são estéreis, reforçando o isolamento reprodutivo entre *A. cursor* e *A. montensis*. No presente trabalho foram realizados cruzamentos experimentais entre *A. cursor* e *A. montensis* com o objetivo de avaliar parâmetros reprodutivos na geração de híbridos, considerando-se o cariótipo dos parentais. Dado que cada espécie parental tem variantes cromossômicas típicas, foi possível observar o padrão de segregação dos homólogos, a composição cariotípica dos híbridos, o processo de introgressão, a histologia de testículo dos machos híbridos, e calcular o sucesso reprodutivo na obtenção de híbridos associada ao cariótipo e sexo dos parentais. Foram realizados 80 cruzamentos experimentais, gerando 39 híbridos, com média de filhotes de 2,17 e sucesso reprodutivo de 22,5%. A introgressão foi bidirecional, embora o maior sucesso (SR=75%) tenha ocorrido entre fêmea de *A. montensis* $2n=24$ e macho de *A. cursor* $2n=16$ (clado Norte). Todas as formas $2n=24$, 25 (AMO) e $2n=14$, 15 e 16 (ACU) foram capazes de gerar descendentes em cruzamentos intraespecíficos. No entanto, as formas cariotípicas que tiveram sucesso na geração de descendentes em cruzamentos interespecíficos foram $2n=24$ (fêmeas e machos), $2n=14$ e 16 (fêmeas e machos), e $2n=15$ (somente machos). As formas variantes de cada espécie que não geraram híbridos foram $2n=23$ (fêmea), $2n=25$ (fêmea e macho) e $2n=15$ (fêmea). As duas formas cariotípicas básicas de cada espécie parental AMO $2n=24$ x ACU $2n=16$ foram a composição com maior sucesso reprodutivo na geração de híbridos (75%), seguida de fêmea AMO $2n=24$ x macho ACU $2n=15$ (37%) e AMO $2n=24$ x ACU $2n=14$ (25%). Os menores valores de SR ocorreu quando os parentais eram ACU $2n=14$ do Sul (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e AMO $2n=24$, provenientes de áreas de simpatria entre as espécies. Por outro lado, os menos valores de SR ocorreu em cruzamentos entre parentais $2n=16$ do norte (Bahia, Pernambuco e Paraíba) e $2n=24$. Nessas localidades do Norte não há simpatria entre as duas espécies irmãs. Os híbridos gerados apresentaram $2n=19$ ($n=7$ e $n=12$) e $2n=20$ ($n=8$ e $n=12$), com NF variando de 30 a 34 e sete cariótipos distintos. As formas $2n=19$ e $2n=20$ já haviam

sido registradas em trabalhos prévios de indivíduos coletados na natureza (em São Paulo) e em cativeiro. Cruzamentos envolvendo pelo menos um parental híbrido, macho ou fêmea, intercruzamento ou retrocruzamento, não geraram descendentes. Dados de histologia de testículo indicaram a ausência de espermatozoides nos túbulos seminíferos dos híbridos, confirmando sua esterilidade. Considerando que a forma $2n=14$, derivada em *A. cursor*, é a mais frequente nas populações do sul em *A. cursor*, onde ocorre simpatria com *A. montensis*, acreditamos que a barreira ao fluxo gênico seja mais efetiva nas áreas de simpatria, mantendo a identidade de cada espécie. Nesses casos, a barreira reprodutiva mais eficiente ao sul seria imposta pelo cariótipo.

INTRODUÇÃO

Akodon cursor (Winge 1887) e *A. montensis* Thomas, 1913 são espécies irmãs, indistintas pela morfologia externa e com registros de simpatria em localidades de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e norte do Paraná (Fagundes e Nogueira, 2007). Híbridos entre as duas espécies foram descritos em ambiente natural e já foram gerados em cativeiro (Fagundes *et al.*, 1998), sendo também indistintos morfologicamente das espécies parentais, mas de fácil distinção cariotípica (Christoff, 1997).

Os cariótipos dessas duas espécies são bastante distintos entre si e típicos, cada qual mostrando variações cariotípicas próprias. O polimorfismo cariotípico em *A. cursor* é decorrente de um rearranjo do tipo fusão cêntrica e inversão pericêntrica dos pares 1 e 3, assim como inversões pericêntricas envolvendo os pares 2, 4 e 6, gerando três números diploides ($2n=14$, 15 e 16) e 9 números fundamentais ($NF=18-26$), que se distribuem ao longo da área de distribuição da espécie (Fagundes *et al.*, 1998). Dados moleculares em *A. cursor* envolvendo populações ao longo da área de distribuição da espécie revelaram uma dicotomia basal com alto suporte, com distinção geográfica das populações em clados Norte e Sul, não associados a uma forma cariotípica específica por clado (Nogueira e Fagundes, 2008). O polimorfismo em *A. montensis* é decorrente da monossomia do cromossomo X ($2n=23$) e presença de um ou dois cromossomos supernumerários ($2n=25$ e 26, respectivamente), alterando a forma cariotípica basal com $2n=24$ e $NF=48$ (Fagundes, 1993, 1997; Kasahara e Yonenaga-Yassuda, 1983; Yonenaga *et al.* 1975; Yonenaga-Yassuda *et al.* 1992).

Estudos envolvendo localização de sequências teloméricas por hibridação *in situ* fluorescente e análise de homologia de braços por comparação de padrões de bandeamento G de alta resolução e pintura cromossômica propuseram que o cariótipo $2n=16$ ($NF=26$) e $2n=24$ ($NF=48$) são as condições ancestrais para *A. cursor* e *A. montensis*, respectivamente (Fagundes *et al.*, 1997a, 1997b; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Ventura *et al.*, 2009). Os rearranjos do tipo inversão pericêntrica, fusão cêntrica, fusão em *tandem*, translocação, perda de telômeros e centrômeros seriam responsáveis por originar as formas cariotípicas derivadas nas duas espécies.

Os primeiros híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis* foram obtidos em cativeiro a partir de parentais coletados em populações do clado Sul do Rio de Janeiro e de São Paulo (Yonenaga *et al.*, 1975). Os dois machos obtidos apresentaram $2n=19$, $NF=31$, representando o conjunto

haploide completo dos parentais materno ($n=7$) e paterno ($n=12$). A histologia testicular desses híbridos revelou ausência de espermatozóides nos túbulos seminíferos e epidídimo, enquanto análises citogenéticas de células germinativas exibiram apenas formação de univalentes e falha na formação de gametas, indicando esterilidade desses híbridos.

Posteriormente, híbridos naturais ($2n=19$ e $2n=20$) entre essas espécies foram registrados em Iguape, SP (Fagundes, 1997). A análise meiótica do macho mostrou poucas células paquitênicas, sugerindo espermatogênese anormal desses indivíduos, corroborando os resultados de esterilidade encontrados em híbridos gerados em cativeiro. Fagundes e Nogueira (2007) utilizaram um método de detectar as linhagens de *A. cursor* e *A. montensis* por PCR-RFLP, e baseado nesse método, Nogueira (2005) identificou que os híbridos coletados na natureza apresentam linhagens maternas tanto de *A. cursor* quanto de *A. montensis*, sugerindo introgressão bidirecional.

Em ambos os registros de híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*, os exemplares de *A. cursor* eram de populações representativas do clado Sul e, embora estudos meióticos indicassem esterilidade dos mesmos, nenhuma tentativa de cruzamento envolvendo esses exemplares foi realizada. Yonenaga *et al.* (1975) não mencionou quantas tentativas de acasalamento foram realizadas até que houvesse sucesso na obtenção dos híbridos.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a variação intraespecífica (geográfica e cariotípica) observada em *A. cursor* a partir de parâmetros reprodutivos obtidos para híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*,

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Exemplares matrizes de *A. cursor* (ACU) foram obtidos na natureza em localidades do clado Norte (Una, Bahia) e do Sul (Castelo, Domingos Martins, Guarapari e Santa Teresa, Espírito Santo), totalizando 33 indivíduos. Matrizes de *A. montensis* (AMO) foram coletados em Luminárias, Minas Gerais ($n=6$) e Iguape e Ilha Comprida, São Paulo ($n=2$ e $n=22$, respectivamente) (**Anexo 3**).

As matrizes de *A. cursor* do clado Norte (ACU-N) apresentaram $2n=14$ (85%), $2n=15$ (10%) e $2n=16$ (5%) e do clado Sul exclusivamente $2n=14$. As matrizes de *A. montensis* (AMO) apresentaram $2n=24$ ($n=24$, 86,7%), $2n=25$ ($n=3$) e uma fêmea $2n=23$ ($n=1$).

Cruzamentos Experimentais

Os espécimes foram mantidos em Sala de Experimentação Animal em conformidade com as recomendações e normas do Comitê de Ética da UFES (protocolo 07/2012). Os cruzamentos foram realizados entre julho de 2013 até agosto de 2015. As observações de sobrevivência se estenderam até dezembro de 2015.

A temperatura foi mantida em $24 \pm 2^\circ\text{C}$, e o ciclo de claro/escuro foi o natural da cidade de Vitória, ES. A água foi fornecida *ad libitum* e a dieta dos animais foi baseada em laranja e ração específica para roedores. Cada indivíduo foi mantido em uma caixa de polipropileno específica para roedores de 30x20x13cm forrada com maravalha, enquanto os casais para copular e as fêmeas supostamente prenhes ou lactantes permaneciam em caixas de 49x34x16cm, também forradas com maravalha e tendo disponível algodão para a confecção de ninhos.

A junção dos casais ocorreu sempre ao início da manhã por volta de 8 horas e o comportamento dos indivíduos foi acompanhado pelas 5 horas seguintes, em intervalos de 30 minutos, para verificar a aceitação mútua e identificar possíveis comportamentos agressivos. No caso de agressividade excessiva na primeira hora após a união do casal, os mesmos eram separados e retornavam para caixas de contenção individualizadas. Após uma hora, não havendo sinais de agressividade, o casal era mantido junto por um período de 6 a 8 dias, com monitoramento diário. Após esse período o macho era retirado da caixa da fêmea, retornando para uma caixa de contenção individual pequena, enquanto a fêmea permanecia na caixa grande, sob monitoramento por até 21 dias, tempo superior ao estimado para a gestação na espécie (Pereira *et al.*, 1993).

A partir do 14º dia de separação do macho as caixas onde estavam as fêmeas supostamente prenhes eram checadas pelo menos duas vezes por dia. Na ausência de filhotes após 28 dias do início do acasalamento, a fêmea era transferida para a caixa individual de contenção, e anotado que não havia prole. Na presença de filhotes, registrou-se o dia de nascimento e o número de crias. O registro do número de filhotes era observado diariamente até o desmame. Filhotes e mãe permaneceram juntos por, no mínimo, 21 dias até o completo desmame, quando cada filhote era transferido para caixa individual de contenção, com identificação do sexo e do cruzamento do qual se originou.

Cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis* (HIB) foram realizados levando-se em consideração o sexo e o cariótipo dos parentais, bem como as variações de origem em *A. cursor* (clado Norte – ACU-N e clado Sul – ACU-S). Intercruzamentos entre híbridos (INT) e

retrocruzamentos (RET) também foram realizados para testar a fertilidade dos híbridos e para verificar se o padrão parental poderia ser recuperado em F₂.

Cruzamentos intraespecífico em *A. montensis* foram realizados considerando-se as formas 2n=23, 2n=24 e 2n=25 para fins de comparação dos dados de cruzamentos interespecíficos.

Obtenção do cariótipo

A informação cariotípica dos espécimes foi obtida a partir de células de linfócitos cultivadas *in vitro* (com manutenção do animal vivo) a partir de adaptações de Rissino (2002) ou de medula óssea (com eutanásia do animal) segundo protocolo adaptado em Fagundes *et al.*, 1998. As melhores metáfases foram fotografadas e os cariótipos montados com a ajuda do *software Case Data Manager* (Applied Spectral Imaging®).

Análise dos dados

Para cada cruzamento foram registrados: a) sucesso reprodutivo (SR) – capacidade de gerar filhotes após uma tentativa de cruzamento; b) tempo gestacional (TG) em dias, período entre o primeiro dia de contato do casal até o nascimento de filhotes; c) tamanho da ninhada (TN). Para TG e TN foram calculados média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e realizada análise de variância (ANOVA) a fim de identificar diferenças significativas entre os grupos. Diferenças significativas de SR entre os grupos foram estimadas usando o teste do χ^2 . O nível crítico de significância (p-valor) considerado em ambos os testes foi de 5%.

Histologia de testículos

Cinco indivíduos de cada grupo amostral (ACU-N, ACU-S, AMO e HIB) foram utilizados para a análise histológica dos testículos. Após a eutanásia do espécime com sobredose de anestésico quetamina: xilazina (conforme indicação veterinária), um dos testículos de cada indivíduo foi retirado e fixado com solução de Karnovsky, a 10°C por pelo menos 24 horas. Em seguida, o testículo foi tratado com solução de álcool com concentrações crescentes para desidratação, realizada a inclusão em resina glicol metacrilato e, em seguida seccionado com navalhas de vidro em fragmentos com 3 μ m de espessura. Os cortes foram colocados em lâmina de vidro, o material corado com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e analisado ao microscópio de luz para análise da estrutura dos túbulos seminíferos.

RESULTADOS

Sucesso reprodutivo de cruzamentos interespecíficos

Foram realizados 80 cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis* que geraram 39 híbridos (HIB, **Anexo 5**), dos quais 34 completaram o desmame (12,8% de canibalismo materno durante a lactação). Dos 80 cruzamentos, 32 foram realizados entre fêmeas ACU-N e machos AMO (ACU-N x AMO), 27 entre fêmeas AMO e machos ACU-N (AMO x ACU-N) e 21 entre fêmeas AMO e machos ACU-S (AMO x ACU-S). Não foram realizados cruzamentos entre fêmeas ACU-S e machos AMO.

Nos 17 cruzamentos em que ambos os parentais eram híbridos (intercruzamentos, INT) e nos 12 cruzamentos envolvendo HIB e um de seus parentais ACU ou AMO (retrocruzamento, RET) não foi gerado nenhum descendente (**Anexo 5**).

O sucesso reprodutivo (SR) médio foi de 22,5%, com média 2,1 filhotes nascidos por ninhada (TN), e o tempo gestacional médio (TG) foi de 25,78 dias (**Tabela 4.1, Figura 4.1**). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de SR, TG e TN entre combinações aos pares dos grupos de cruzamentos ACU-NxAMO, AMOxACU-N e AMOxACU-S.

Analisando o cariótipo dos parentais, verificou-se que em combinações envolvendo exemplares $2n=14$, 16 e $2n=24$ o SR variou de 22,22% a 75,0%, o TN variou de 1,67 a 3,00 e o TG de 24,5 a 27,0, sendo a combinação $2n=24 \times 2n=16^N$ aquela que apresentou valores maiores de SR e TN, correspondendo a 23,0% ($n=9$) dos híbridos gerados (**Tabela 4.2, Figura 4.2**). Combinados entre si, esses grupos não apresentaram diferença significativa de SR (χ^2), TG ou TN (ANOVA) (**Tabela 4.2**).

Nos casos de cruzamentos envolvendo exemplares com $2n=15 \times 2n=24$, somente quando o macho apresentava $2n=15$ houve descendentes (SR=37,5%; TN médio=1,67; TG médio=26,33 dias), enquanto a fêmea $2n=15$ não conseguiu gerar híbridos. Em todos os cruzamentos envolvendo $2n=23$ e $2n=25$, independente do cariótipo do outro parental, não houve nascimento de híbridos (**Tabela 4.2**).

Dois casos de agressão entre casais foram registrados, sendo as fêmeas mortas por machos do clado Sul de *A. cursor* ($2n=14$) (cruzamentos HIB69 e HIB70, **Anexo 5**). Outros dois cruzamentos, dos quais participaram os mesmos indivíduos, geraram descendentes na segunda tentativa de cruzamento após primeira sem filhote (cruzamentos HIB44 e HIB48, **Anexo 5**).

Tabela 4.1 – Sucesso reprodutivo (SR), tempo gestacional (TG) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos entre parentais *A. cursor* (ACU) e *A. montensis* (AMO), considerando-se o sexo das espécies parentais e clados de *A. cursor* (clado Norte - ACU-N e clado Sul - ACU-S).

♀ x ♂	CRUZAMENTOS				TEMPO GESTACIONAL (dias)			TAMANHO NINHADA			
	REALIZA DOS	COM FILHOTE	SR	χ^2 (p-valor) ¹	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	Mín-MÁX	TOTAL ²	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	Mín-MÁX
ACU-N x AMO	32	6	18,75%		25,50 (±1,643)		23-27	10 (8)	1,67 (±0,816)		1-3
AMO x ACU-N	27	8	29,63%		26,63 (±1,188)		25-28	18 (17)	2,25 (±1,035)		1-4
AMO x ACU-S	21	4	19,5%		24,50 (±2,646)		21-27	11 (9)	2,75 (±1,258)		1-4
TOTAL	80	18	22,50%	0,552¹	25,78 (±1,833)	0,151¹	21-28	39 (34)	2,17 (±1,043)	0,276¹	1-4

¹ valor significativo abaixo de 0,05. ² número de filhotes ao nascer e, entre parêntesis, número de filhotes após o desmame.

Tabela 4.2 – Sucesso reprodutivo (SR), tempo gestacional (TG) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis* considerando o cariótipo das espécies parentais e no caso de *A. cursor*, diferenças entre clado Norte (2n^N) e Sul (2n^S).

TIPO	♀ x ♂	CRUZAMENTOS				TEMPO GESTACIONAL (dias)			TAMANHO NINHADA			
		REALIZA DOS	COM FILHOTE	SR	χ^2 (p-valor) ¹	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	Mín-MÁX	TOTAL ²	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	Mín-MÁX
14 ou 16 x 24	14 ^N x24	26	6	23,07%	0,181	25,50 (±1,643)	0,376	23-27	10 (8)	1,67 (±0,816)	0,276	1-3
	24x14 ^N	9	2	22,22%		27,00 (±1,414)		26-28	4	2,00 (±1,414)		1-3
	24x14 ^S	15	4	26,67%		24,50 (±2,646)		21-27	11 (9)	2,75 (±1,258)		1-4
	24x16 ^N	4	3	75,00%		26,67 (±1,155)		26-28	9	3,00 (±1,000)		2-4
15 x 24	15 ^N x24	4	0	0,00%	0,157	26,33 (±1,528)	-	25-28	0	-	-	1-2
	24x15 ^N	8	3	37,50%					5 (4)			
14 ou 15 x 25	14 ^N x25	2	0	0,00%					0			
	25x14 ^N	1	0	0,00%					0			
	25x14 ^S	5	0	0,00%					0			
	25x15 ^N	2	0	0,00%					0			
14 ou 15 x 23	23x15 ^N	3	0	0,00%					0			
	23x14 ^S	1	0	0,00%					0			
TOTAL		80	18	22,50%	,311	25,78 (±1,833)	,450	21-28	39 (34)	2,17 (±1,043)	,269	1-4

¹ Valores significativos abaixo de 0,05*. ² Número de filhotes ao nascer e, entre parêntesis, número de filhotes após o desmame.

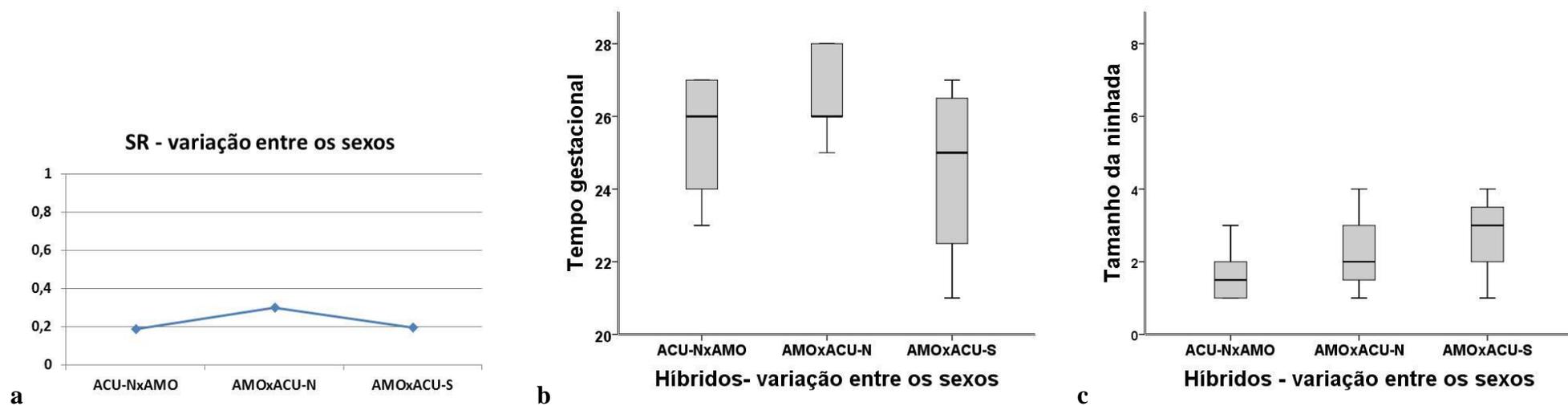


Figura 4.1 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação média do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (c) em cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis*, considerando o sexo dos parentais.

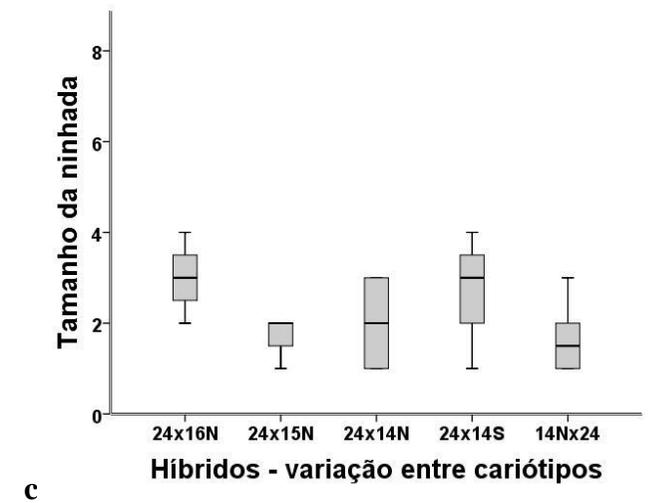
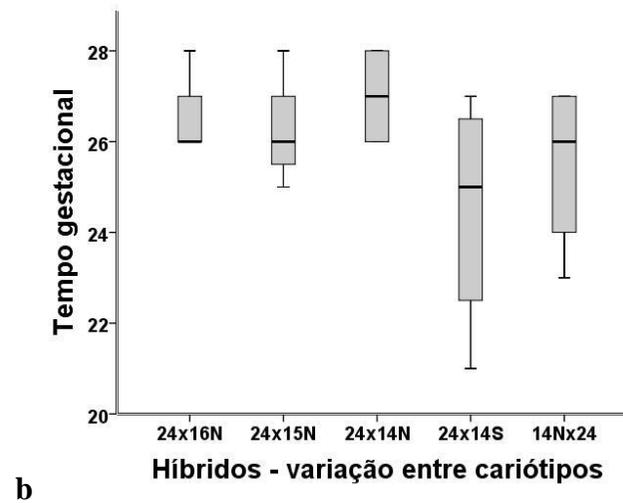
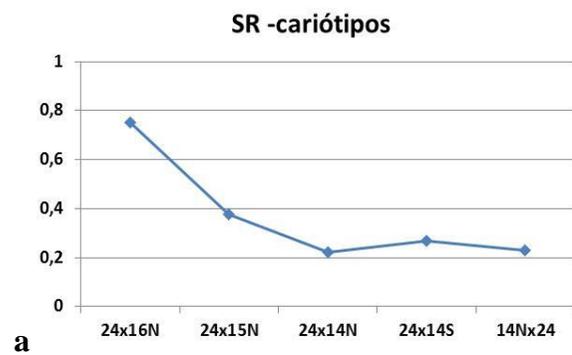


Figura 4.2 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação média do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (c) em cruzamentos entre *A. cursor* e *A. montensis*, considerando o cariótipo dos parentais.

Sucesso Reprodutivo de cruzamentos intraespecíficos em *A. montensis*

Dos 66 cruzamentos realizados nasceram 87 filhotes, dos quais 80 completaram o desmame. Foram realizados 35 cruzamentos entre indivíduos matriz (AMO-M) e 31 cruzamentos nos quais pelo menos um parental era geração F_1 (AMO- F_1) (**Anexo 5**), sem diferença significativa de TN e TG entre esses dois agrupamentos. No entanto, o sucesso reprodutivo em AMO-M (57,14%) foi significativamente maior que em AMO- F_1 (22,58%) (**Tabela 4.3, Figura 4.3**).

Cruzamentos envolvendo as combinações cariotípicas $2n=23 \times 2n=24$, $2n=24 \times 2n=24$, $2n=24 \times 2n=25$, $2n=25 \times 2n=24$ e $2n=25 \times 2n=25$ não apresentaram diferença significativa de SR, TG e TN. Destas combinações, em apenas uma (fêmea $2n=25$ x macho $2n=24$) não houve o nascimento de filhotes (**Tabela 4.4; Figura 4.4**). Assim, em cruzamentos intraclado todas as formas cariotípicas amostradas no presente estudo ($2n=23$, $2n=24$ e $2n=25$) foram capazes de gerar descendentes.

O canibalismo materno total foi de 9,0% durante a lactação, só ocorrendo nas combinações $2n=24 \times 2n=24$ (90% dos casos), $2n=25 \times 2n=24$ (10,0% dos casos). Nos cruzamentos AMO1 e AMO3 as fêmeas foram agredidas até a morte pelo mesmo macho, único coletado em Iguape, SP (**Anexo 5**).

Composição cariotípica dos híbridos

Os híbridos gerados apresentaram $2n=19$ (61,8%) e $2n=20$ (38,2%) e número de braços autossômicos (NF) variaram de 30 a 34, correspondendo a sete cariótipos distintos (**Tabela 4.5; Figura 4.5**) das oito possíveis combinações dos gametas $n=7$ (cromossomos 1+3M, 2A ou 2S, 4A ou 4M) de *A. cursor* e $n=12$ de *A. montensis*. Os cruzamentos entre 24×14^N , 24×14^S e $14^N \times 24$ e 24×15^N geraram híbridos com $2n=19$. Porém os híbridos com $2n=20$ somente foram gerados a partir de cruzamentos 24×16^N , não sendo observados a partir dos cruzamentos 24×15^N .

Histologia de Testículo

Os cortes histológicos de parentais *A. montensis* e *A. cursor* mostraram a formação de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos. Nos testículos dos híbridos não houve a formação do lúmen e nem a formação de espermatozoides. Foram encontradas células fagocitárias no compartimento intersticial dos testículos e nos túbulos seminíferos dos híbridos (**Figura 4.6**).

Tabela 4.3 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) estimados a partir de cruzamentos intraespecíficos em *A. montensis*, AMO-M, AMO-F₁.

TIPO	CRUZAMENTOS				TEMPO GESTACIONAL (dias)			TAMANHO NINHADA			
	REALIZA DOS	COM FILHOTE	SR	χ^2 (p-valor) ¹	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	MÍN-MÁX	TOTAL ²	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	MÍN-MÁX
AMO-M	35	20	57,14%		24,55 (±1,356)		22-27	64 (61)	3,20 (±0,768)		1-4
AMO-F ₁	31	7	22,58%		24,00 (±1,291)		23-26	23 (19)	3,29 (±1,799)		1-5
TOTAL	66	27	40,91%	0,004*	24,41 (±1,338)	,359	22-27	87 (80)	3,22 (±1,086)	0,861	1-5

¹ = valores significativos abaixo de 0,05*.

² = número de filhotes ao nascer e, entre parêntesis, número de filhotes após o desmame.

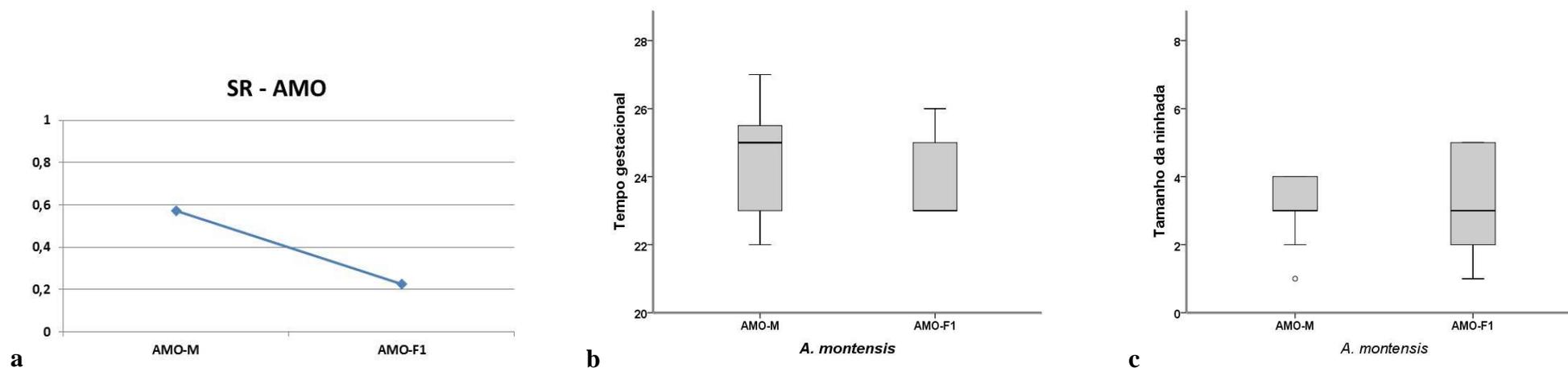


Figura 4.3 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (b) em cruzamentos de *A. montensis* envolvendo indivíduos matriz AMO-M e descendentes gerados em cativeiro (AMO-F₁).

Tabela 4.4 – Sucesso reprodutivo (SR) e tamanho da ninhada (TN) estimados em cruzamentos intraespecíficos (INT) entre *A. montensis* considerando o cariótipo dos parentais.

TIPO	CRUZAMENTOS				TEMPO GESTACIONAL (dias)			TAMANHO NINHADA				
	♀ x ♂	REALIZA DOS	COM FILHOTE	SR	χ^2 (p-valor) ¹	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	MÍN-MÁX	TOTAL ²	MÉDIA (D.P)	ANOVA (p-valor) ¹	MÍN-MÁX
C1	23x24	4	2	50,00%		24,50 (±0,707)		24-25	8	4,00 (±1,414)		3-5
C2	24x24	47	20	42,55%		24,55 (±1,432)		22-27	61 (55)	3,05 (±1,099)		1-5
C3	24x25	4	0	0,00%					0			
C4	25x24	8	4	50,00%		23,50 (±1,414)		23-25	14 (13)	3,50 (±1,000)		3-5
C5	25x25	3	1	33,33%		25,00		25	4	4,00		4
TOTAL		66	27	40,91%	0,508	24,41 (±1,338)	0,542	22-27	87 (80)	3,22 (±1,086)	0,536	1-5

¹ = valores significativos acima de 0,05*. ² = número de filhotes ao nascer e, entre parêntesis, número de filhotes após o desmame.

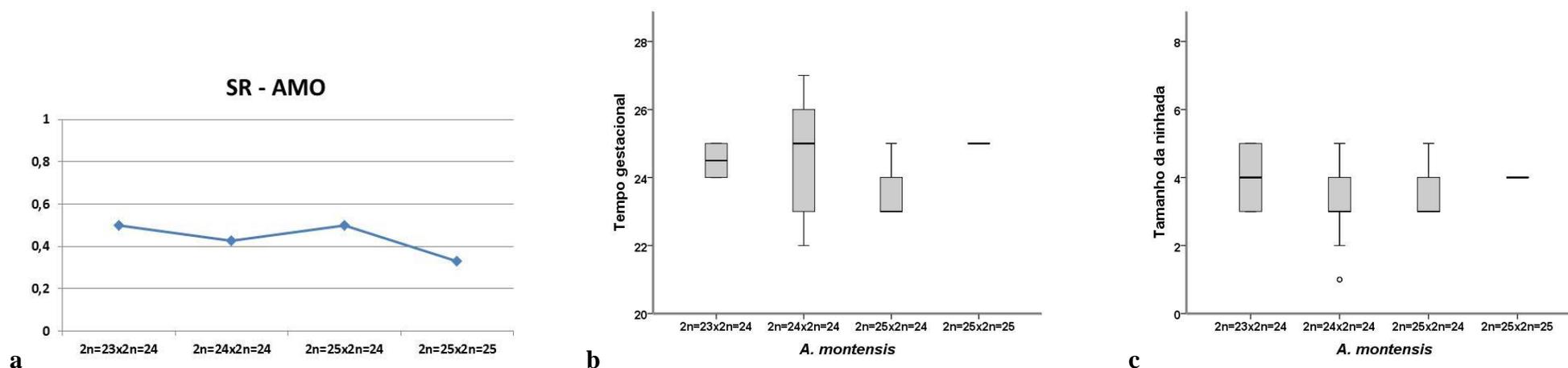


Figura 4.4 – Frequência de sucesso reprodutivo (a) variação do tempo gestacional (b) e do número de crias por ninhada (b) em cruzamentos de *A. montensis* envolvendo cruzamentos com diferentes combinações cariotípicas.

Tabela 4.5 – Descrição do cariótipo e número de híbridos gerados através de cruzamentos experimentais entre *A. cursor* e *A. montensis*.

Tipo	2n	NF*	Cariótipo	Cariótipo do parental ACU	Cariótipo do parental AMO	n	Registro¹
24x16 ^N	20	33	A	1S, 2S, 3S, 4A, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	1	Primeiro registro
		34	B	1S, 2S, 3S, 4M, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	1	Primeiro registro
		n/d	-			5	
		SC	-			2	
24x15 ^N	20	32	C	1S, 2A, 3S, 4A, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	1	Primeiro registro
		33	D	1S, 2A, 3S, 4M, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	2	Fagundes, em preparação
		SC	-			1	
24x14 ^N	19	31	E	1+3M, 2A, 4M, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	2	Fagundes, 1997
		n/d	-			2	
24x14 ^S	19	30	F	1+3M, 2A, 4A, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	3	Yonenaga <i>et al.</i> , 1975
		31	G	1+3M, 2A, 4M, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	1	Fagundes, 1997
		31	C	1+3M, 2S, 4A, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1A (par 10)	1	Fagundes, 1997
		n/d	-			3	
14 ^N x24	19	30	F	1+3M, 2A, 4A, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1 ^a (par 10)	2	Yonenaga <i>et al.</i> , 1975
		31	E	1+3M, 2A, 4M, 5M, 6A, 7M	10 M/S (pares de 1 a 9 e 11), 1 ^a (par 10)	1	Fagundes, 1997
		n/d	-			4	
		SC	-			1	
TOTAL			7			34	

* n/d = número diploide não determinado de espécimes ainda vivos; SC = indivíduo que morreu sem terem sido realizadas preparações citogenéticas. 1= citação dos trabalhos que registram os referidos cariótipos de híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*.

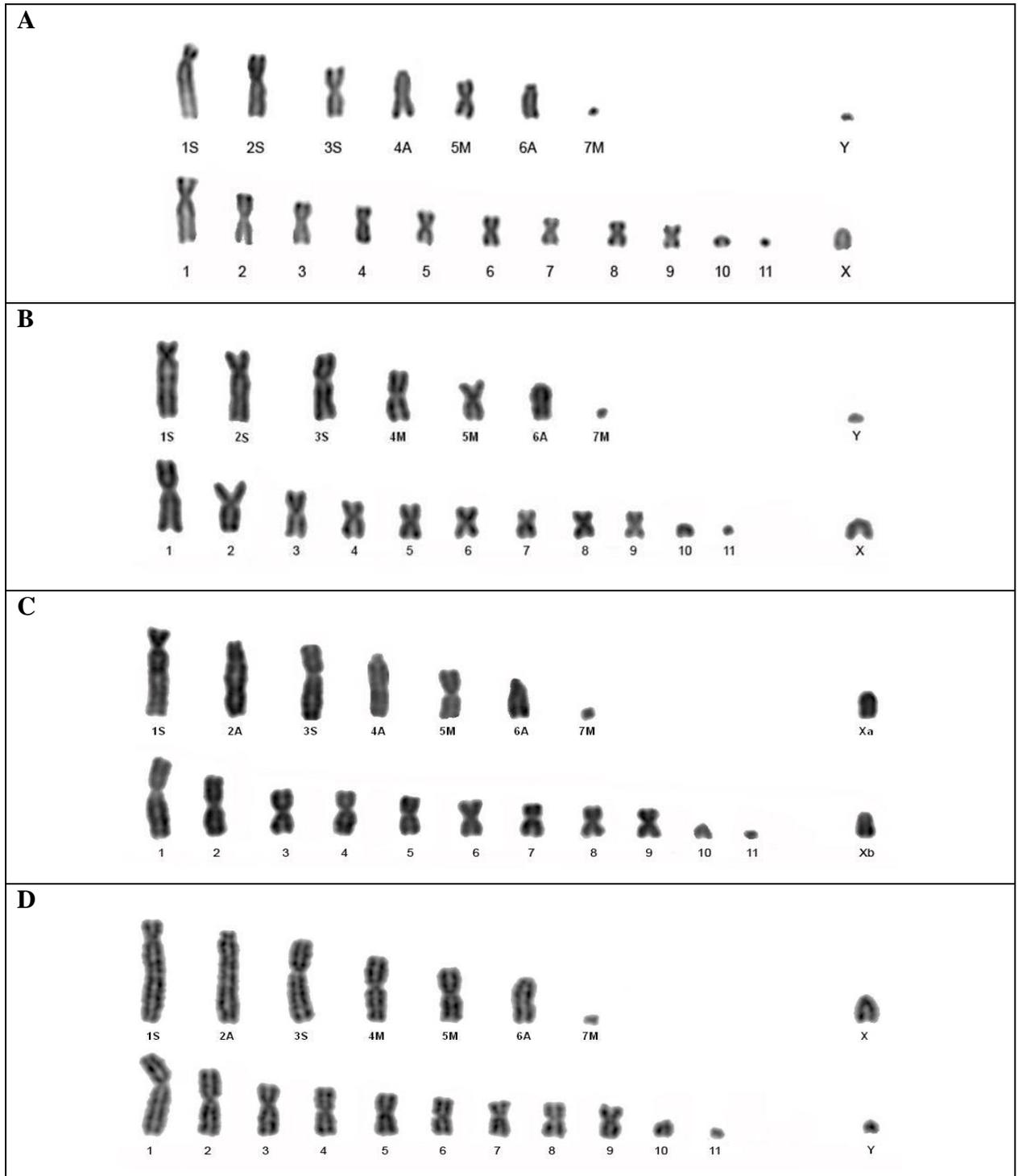


Figura 4.5 – Cariótipos de híbridos entre *A. cursor* (ACU) e *A. montensis* (AMO). A linha superior representa o conjunto haploide de ACU ($n=7$ ou $n=8$, com polimorfismo dos pares 1/3, 2 e 4) e a inferior o de AMO ($n=12$, invariável). (A) macho, $2n=20$ (ACU: 1S/3M, 2S, 4A); (B) macho, $2n=20$ (ACU: 1S/3M, 2S, 4M); (C) fêmea, $2n=20$ (ACU: 1S/3M, 2A, 4A); (D) macho, $2n=20$ (ACU: 1S/3M, 2A, 4M); (E) fêmea, $2n=19$ (ACU: 1+3M, 2A, 4M); (F) macho, $2n=19$ (ACU: 1+3M, 2A, 4A); (G) macho, $2n=19$ (ACU: 1+3M, 2S, 4A).

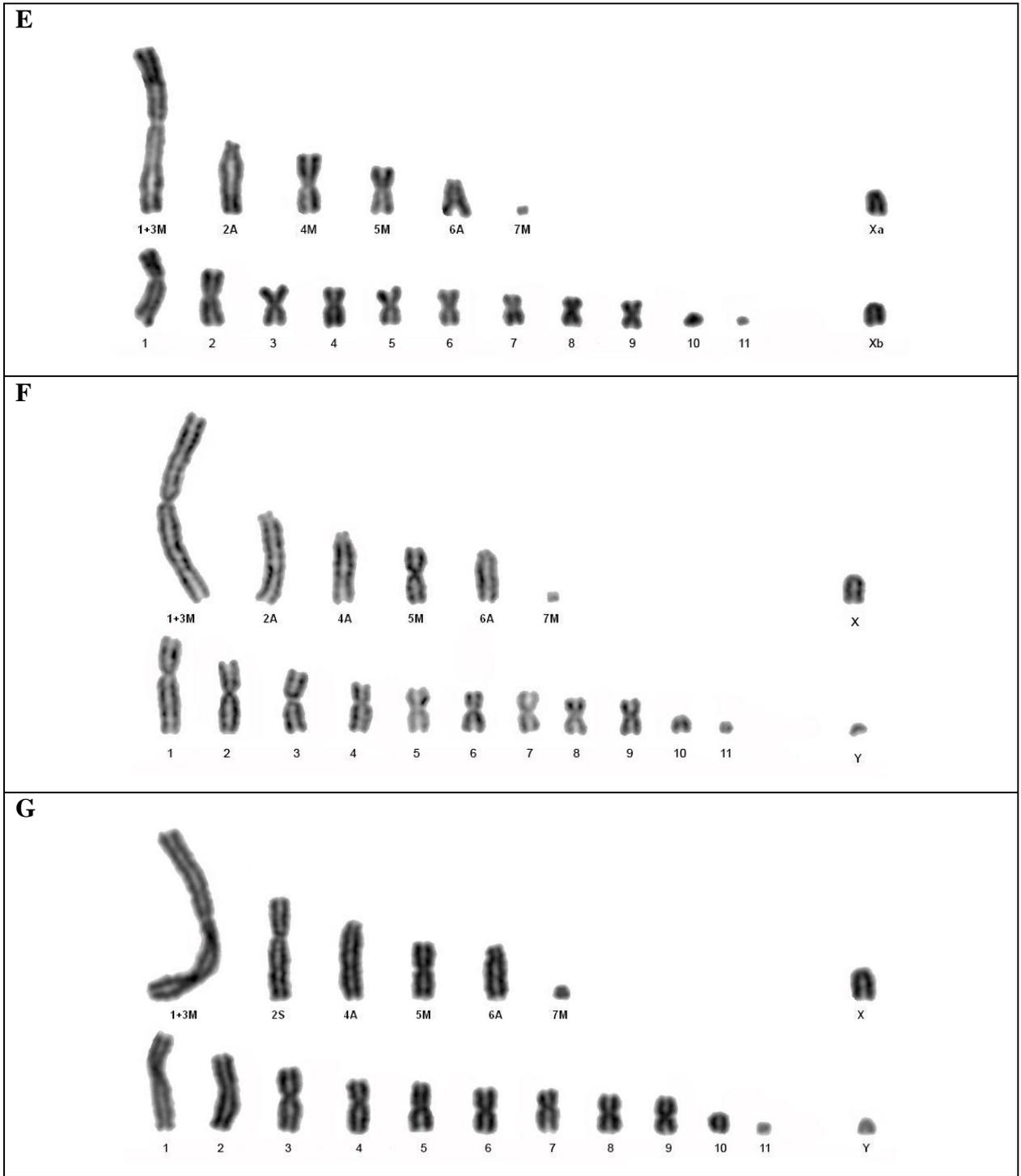


Figura 4.5 – Continuação (E – G).

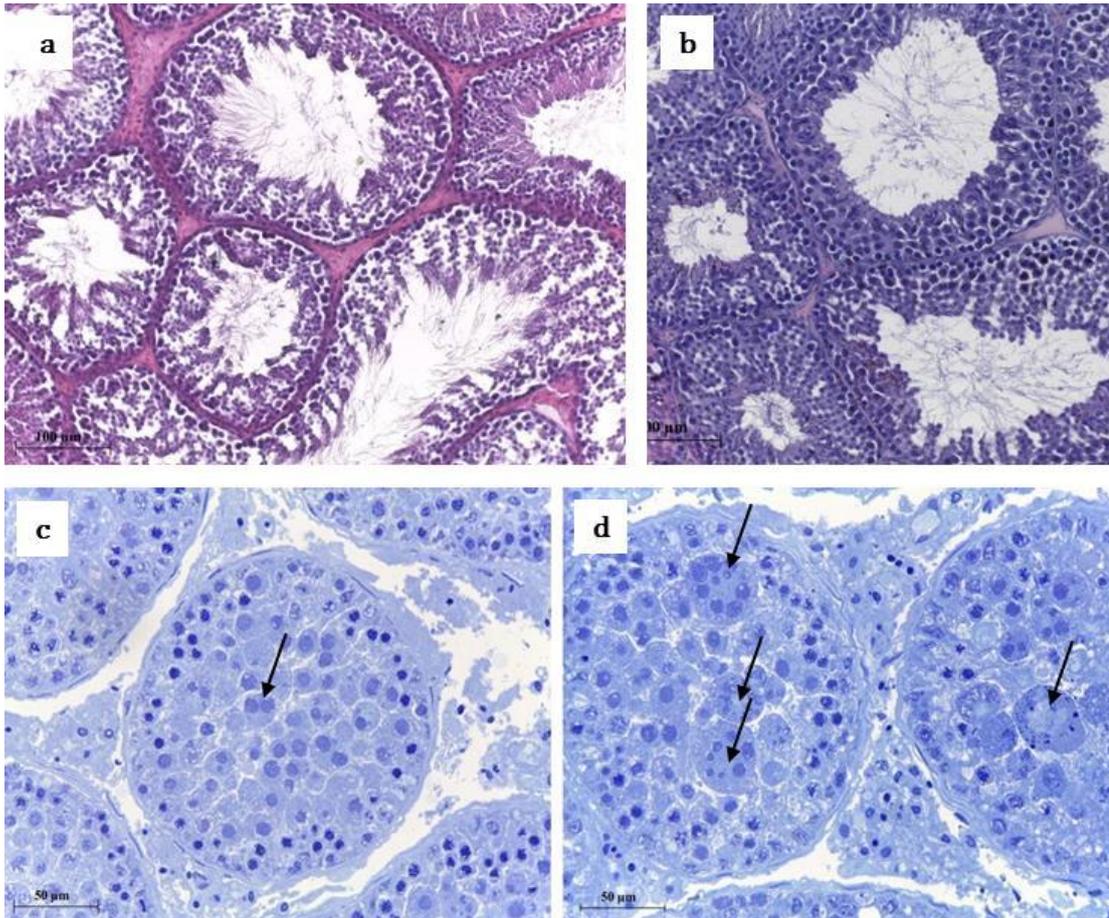


Figura 4.6 – Corte longitudinal de túbulo seminífero. **(a)** *A. cursor* **(b)** *A. montensis* **(c)** e **(d)** híbridos entre essas espécies. As imagens **(a)** e **(b)** mostram a formação de espermatozoides na luz dos túbulos enquanto as formas **(c)** e **(d)** mostram a completa ausência de espermatozoides e presença de células fagocitárias (setas), sem formação de luz do túbulo.

DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou dados inéditos sobre cruzamentos experimentais gerando híbridos entre as espécies parentais *A. cursor* e *A. montensis*, a partir das variantes cariotípicas de cada espécie e da origem geográfica de cada parental de *A. cursor*.

Os registros de híbridos, naturais e de cruzamentos em laboratório, entre *A. cursor* e *A. montensis*, reportaram exemplares $2n=19$ e 20 . Híbridos naturais foram coletados em Iguape, SP, área de simpatria entre as espécies parentais (Christoff, 1997; Fagundes, 1997) e os artificiais foram gerados em cativeiro a partir de exemplares de *A. cursor* de populações do Rio

de Janeiro e São Paulo e de *A. montensis* de populações de São Paulo (Yonenaga *et al.*, 1975). Em ambos os registros, os exemplares de *A. cursor* eram procedentes de populações representativas do clado Sul (Nogueira e Fagundes, 2008; Colombi *et al.*, 2010).

A introgressão entre essas espécies é bidirecional, com sucesso na geração de híbridos seja nas combinações fêmea *A. montensis* x macho *A. cursor* ou fêmea *A. cursor* x macho *A. montensis*. O sucesso reprodutivo na obtenção desses híbridos em cativeiro foi alta, chegando a 75% na combinação fêmea $2n=24$ e macho $2n=16$. As menores frequências de sucesso reprodutivo foram encontradas entre exemplares $2n=14$ e $2n=24$ (SR=22,2 a 26,7%), independente do sexo em que ocorriam e se o cariótipo de $2n=14$ era de exemplares de *A. cursor* do clado Norte ou do clado Sul.

As combinações que culminaram em maior número de nascimentos foram quando *A. montensis* era a espécie materna com $2n=24$ e *A. cursor* a paterna, particularmente na forma $2n=16$ (SR=75%, TN=3,0), seguido de $2n=15$ (SR=37,5, TN=1,67). Cruzamentos em que os parentais macho ou fêmea de *A. cursor* tinham $2n=14$ foram os que apresentaram menor sucesso reprodutivo. Nossos dados revelam que, embora a introgressão seja bidirecional, há uma taxa distinta de sucesso a depender do parental de *A. cursor*, sendo menos viável a combinação $2n=24$ x $2n=14$ na geração de híbridos.

A média de filhotes por ninhada em cruzamentos interespecíficos também foi maior quando os machos de *A. cursor* apresentaram $2n=16$ ($3,00 \pm 1,000$), sendo essa média próxima a encontrada no total de cruzamentos intraespecíficos de *A. montensis* (TN=3,22 \pm 1,086, presente estudo; TN=3,9 \pm 1,2, Silva *et al.*, 2015) e de *A. cursor* (TN=3,69 \pm 1,423, Cap. 2 do presente estudo; TN=4,7 \pm 2,1, Silva *et al.*, 2015).

Formas cariotípicas variantes não geram híbridos

Considerando o parental *A. cursor*, indivíduos machos do clado Norte com $2n=15$ tiveram sucesso na formação de híbridos, mas fêmeas com $2n=15$ não geraram híbridos. Esse resultado é relevante visto que estudos prévios (Cap. 2) revelaram que exemplares com $2n=15$, machos ou fêmeas, foram capazes de gerar descendentes em cruzamentos intraespecíficos, embora com menor sucesso reprodutivo. Além disso, esse resultado vai de encontro à regra de Haldane, segundo a qual quando existe assimetria na inviabilidade ou infertilidade dos híbridos, o sexo heterogamético é o mais afetado (Johnson, 2008), que no caso de roedores seria o macho.

Considerando o parental *A. montensis*, indivíduos com $2n=25$ ou $2n=23$, não geraram híbridos, muito embora tenham sido capazes de gerar descendentes em cruzamentos intraespecíficos. Os cruzamentos em que ambos parentais tinham $2n=25$ apresentaram as menores frequências de sucesso reprodutivo, comparada às outras duas formas avaliadas, com $2n=23$ e $2n=24$.

Fagundes *et al.* (1997a) compararam os cariótipos de *A. cursor* $2n=14$ e $2n=16$ utilizando padrão elevado de resolução de bandeamento G e marcação de sonda telomérica e propuseram que o cariótipo $2n=16$ seria o ancestral na espécie. Fagundes *et al.* (1997b) e Ventura *et al.* (2009) identificaram homeologia completa entre os cariótipos de *A. cursor* $2n=14$, 16 e *A. montensis* $2n=24$ utilizando pintura cromossômica recíproca, e propuseram que há menor número de passos mutacional envolvendo a diferenciação entre os cariótipos $2n=16$ e $2n=24$ a partir de um cariótipo ancestral do que entre $2n=14$ e $2n=24$. Esse dado é concordante com nossos achados de que o sucesso reprodutivo em cruzamentos interespecíficos foi maior quando o parental *A. cursor* apresentou $2n=16$, seguido de $2n=15$ e por fim $2n=14$, em decorrência da menor barreira reprodutiva entre $2n=24$ e o cariótipo básico ancestral de *A. cursor* com $2n=16$.

Em *Nectomys*, outro roedor da subfamília Sigmodontinae, cruzamentos entre cariótipos $2n=52$ e $2n=56$ geraram híbridos com $2n=54$, que apresentaram alterações histológicas dos túbulos seminíferos, sem a formação de espermatozoides e configurações anormais do complexo sinaptonêmico, caracterizando a esterilidade nesses exemplares. Apesar das formas $2n=52$ e $2n=56$ serem alopátricas, a ocorrência de híbridos estéreis contribuem para interrupção do fluxo gênico entre esses cariótipos e explica a ausência de híbridos naturais mesmo em áreas de ocorrência limítrofes. À luz do Conceito Biológico de Espécies as formas $2n=52$ e $2n=56$ foram revisadas e separadas em duas, *N. rattus* e *N. squamipes*, respectivamente (Bonvicino *et al.*, 1996; Andrades-Miranda, 2001a).

Similarmente, a composição mais favorável à formação de híbridos é 24×16 . As formas derivadas ($2n=23$, $2n=25$ e $2n=14$ e $2n=15$) parecem promover um isolamento reprodutivo maior e conseqüente barreira ao fluxo gênico. Considerando que a forma $2n=14$ é a mais frequente nas populações do sul, a barreira ao fluxo gênico seria mais efetiva onde *A. cursor* ocorre em simpatria com *A. montensis*, mantendo a identidade de cada espécie, com barreira reprodutiva robusta, imposta pelo cariótipo.

Indivíduos $2n=15$ não formam híbridos com $2n=20$

Os cariótipos de híbridos $2n=20$ no presente estudo foram obtidos a partir de gametas $n=8$ de ACU $2n=16$ e AMO $n=12$. Dos cruzamentos com $2n=15$ e $2n=24$, somente nasceram híbridos com $2n=19$, o que questiona a viabilidade de gametas $n=8$ em indivíduos com $2n=15$.

Nossos dados sugerem haver um erro na segregação dos homólogos do trivalente gerando gametas desbalanceados e inviáveis e favorecendo gametas $n=7$. Outra explicação seria a amostragem baixa de descendentes (4 híbridos em três cruzamento interespecíficos com sucesso), requerendo maior investimento (macho ACU $2n=15$ e fêmea AMO $2n=24$) nesse tipo de cruzamento. Apesar do número reduzido de descendentes híbridos, considerando as variações dos pares 2 e 4 de ACU (2A/4A, 2A/4M, 2S/4A, 2S/4M) foi possível recuperar nos híbridos do presente estudo 7 das 8 combinações possíveis tendo faltado apenas 2S/4M no cariótipo de $2n=19$.

Yonenaga-Yassuda (1979) havia reportado que a forma $2n=15$ forma um trivalente no paquíteno/diplóteno. Com a formação de um trivalente, a formação de gametas pode ser prejudicada caso a segregação dos cromossomos ocorra desbalanceada. Winking *et al.* (2000) observaram em camundongos com rearranjos Robertsonianos a disjunção desequilibrada de trivalentes na meiose na ordem de 40% dos casos.

Híbridos são estéreis

Todos os testes de cruzamentos envolvendo os híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis* mostraram a esterilidade dos mesmos.

Yonenaga *et al.* (1975) ao realizar estudos meióticos em híbridos gerados em cativeiro observou células em paquíteno, metáfases espermatogoniais, células poliploides e anormais. Logo, a ausência de espermatozoides nos híbridos de *A. cursor* e *A. montensis*, a ausência de descendentes em intercruzamentos e retrocruzamentos somado aos dados histológicos, apontam a esterilidade do híbrido, com isolamento reprodutivo pós-zigótico completo entre as duas espécies parentais.

Em cruzamentos entre *A. molinae* ($2n=42-44$) e *A. dolores* ($2n=34-40$) a formação de híbridos era favorecida quando a fêmea é de *A. molinae*. No entanto, ao contrário do observado nos híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*, esses híbridos eram férteis e em F_1 apresentaram características peculiares, enquanto em F_2 recuperaram o padrão parental (Merani *et al.*, 1983;

2005). Em *Nectomys squamipes*, híbridos entre as formas $2n=52$ e $2n=56$ foram gerados em cativeiro e análises citogenéticas e histológicas da forma intermediária $2n=54$ mostrou que os rearranjos cromossômicos constituíam barreira reprodutiva, levando os autores a sugerir que cada cariótipo dos parentais poderia corresponder, na realidade, a espécies distintas (Bonvicino *et al.*, 1996). Atualmente, as duas formas cariotípicas estão associadas a espécies distintas: *Nectomys rattus* ($2n=52$) e *N. squamipes* ($2n=56$) (Andrades-Miranda, 2001a). Em *Graomys griseoflavus* (Cricetidae, Sigmodontinae), cruzamentos em cativeiro entre as formas $2n=36$, 37 , 38 e 42 mostraram que $2n=36-38$ eram inférteis e que ao cruzarem com machos $2n=42$ não geravam descendentes, mas quando eram colocados para cruzar com fêmeas $2n=42$ o sucesso reprodutivo variava de 80 a 100% em F_1 , embora essa prole fosse estéril (Gerardo e Blanco, 1996).

Silva *et al.* (2015) classificam todos os sigmodontinos como estrategistas *r*, com tendência a apresentarem porte pequeno, terem período de vida curto, podendo alcançar a maturidade sexual precocemente e gerando ninhadas grandes e várias vezes ao ano. Esses resultados vão ao encontro dos dados histológicos que mostram elevada atividade espermática nas espécies parentais e ausência total dessa atividade nos híbridos. Balarine (2013) afirmou que em *A. cursor* há elevada produção espermática, considerada acima do padrão observado em mamíferos com índice de produção elevado, o que já havia sido proposto anteriormente para *A. cursor* e *A. montensis* e outros cricetídeos (Cordeiro-Júnior, 2009).

Assim, conclui-se que o isolamento reprodutivo entre *A. cursor* e *A. montensis* é completo, sendo acentuado nas regiões de simpatria. O mecanismo do isolamento é pós-zigótico, permitindo a formação de híbridos por um processo de introgressão bidirecional, com redução do tamanho da ninhada quando comparado aos dados de cruzamentos intraespecíficos de cada espécie parental. As formas básicas dos cariótipos das espécies parentais são capazes de gerar híbridos, com redução acentuada ou ausência de formação de híbridos quando o cariótipo dos parentais eram as formas derivadas $2n=15$, $2n=25$ e $2n=23$. A forma $2n=15$, embora propensa a formar gametas $n=7$ e $n=8$ não foi capaz de gerar híbridos com $2n=20$. Os híbridos são estéreis. Novos cruzamentos incluindo fêmeas com $2n=15$ permitiriam esclarecer o processo de formação dos gametas desses indivíduos, já que há de comprometimento reprodutivo influenciando no sucesso reprodutivo desses indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrades-Miranda J, Oliveira LFB, Zanchin NIT and Mattevi MS (2001a) Chromosomal description of the rodent genera *Oecomys* and *Nectomys* from Brazil. *Acta Theriologica* 46(3):269-278.
- Balarine MK (2013) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Bonvicino CR, D'Andrea OS, Cerqueira R and Seuánez HN (1996) The chromosomes of *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae) with $2n=52$, $2n=56$, and interspecific hybrids ($2n=54$). *Cytogenetics and Cell Genetics* 73:190-193.
- Christoff AU (1997) Contribuição à sistemática das espécies do gênero *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):785-789.
- Cordeiro-Júnior DA (2009) Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das Famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça – MG. Tese de Doutorado; Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.
- Fagundes V (1993) Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Fagundes V (1997) Contribuição da Citogenética Molecular no entendimento da Evolução Cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AM and Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal

rearrangement in the rodent *Akodon cursor* ($2n=14, 15$ and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.

Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J and Yonenaga-Yassuda Y (1997b) ZOO-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 78:224-228.

Fagundes V, Christoff AU and 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 and Nogueira CDA (2007) The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents of the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini). *Genetics and Molecular Biology* 30(3): 698-701.

Gerardo RT and Blanco A (1996) Patterns of evolution in *Graomys griseoflavus* (Rodentia: Muridae): II. Reproductive isolation between cytotypes. *Journal of Mammalogy* 77(3):776-784.

Johnson NA (2008) Haldane's Rule: the Heterogametic Sex. *Nature Education* 1(1):58.

Kasahara S and Yonenaga-Yassuda Y (1983) Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia*, 48:569-576.

Merani MS, Vercellini O, Acuña AM, Horgan C and Roldan ER (1983) Growth and reproduction of two species of *Akodon* and their hybrids. *Journal of Experimental Zoology* 228(3):527-535.

Merani S, Lizarralde M, Oliveira D and Bianchi N (2005) Cytogenetics of the South American akodont rodents (Cricetidae). IV Interspecific crosses between *Akodon dolores* x *Akodon molinae*. *Journal of Experimental Zoology* 206(3):343-345.

Nogueira CDA (2005) Uma análise filogeográfico das espécies do 'complexo *Akodon cursor*' (Rodentia, Sigmodontinae) utilizando dados moleculares e cariotípicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

- Nogueira CDA and Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- Pereira LA, Chagas WA and Costa JE (1993) Ecologia de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica, Brasil. I. Ciclos reprodutivos de *Akodon cursor*, *Nectomys squamipes* e *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae). *Revista brasileira de Zoologia* 10(3):389-398.
- Rissino JD (2012) Análise de células-tronco adultas (CTA) em cultura de células de tecido epithelial de pequenos roedores (Rodentia-Stricognathi-Sciurognathi). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Silva MPL, Leite YLR and Costa LP (2015) Litter size and embryo implantation in Neotropical rodents. *Oecologia Australis* 19(1):183-194.
- Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y and Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosomes painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17:1063-1078.
- Winge H (1987) Jordfundne og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien: med udsigt over gnavernes indbyrdes slægtskab. *E Museo Lundii* 1(3):1-200.
- Winking H, Reuter C, Bostelmann H (2000) Unequal nondisjunction frequencies of trivalent chromosomes in male mice heterozygous for two Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 91:303-6.
- Yonenaga Y, Kasahara S, Almeida EJC and Peracchi AL (1975) Chromosome banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 15:388-399.
- Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 23:241-249.
- Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'Abbate M and Souza MJ (1992) Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetics and Cell Genetics* 35:143-147.

CAPÍTULO 5

REVISITANDO *AKODON CURSOR* (WINGE, 1887): UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR

RESUMO

A. cursor (Wingle, 1887) apresenta questões controversas envolvendo a sua validade como espécie única. Essas questões se acentuam quando é comparada a sua espécie irmã *A. montensis* com a qual divide áreas de ocorrência e a capacidade de gerar híbridos em ambiente natural. No entanto, *A. cursor* e *A. montensis* preservam características genéticas marcantes com número diploide específico ($2n=14, 15$ e 16 em *A. cursor* e $2n=23-26$ em *A. montensis*) e agrupamentos monofiléticos próprios. Nos híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis* coletados na natureza e naqueles gerados em laboratório, observa-se um cariótipo corresponde à soma dos lotes haplóides das espécies parentais, com introgressão bidirecional. O mecanismo de isolamento reprodutivo é pós-zigótico, caracterizado pela esterilidade dos híbridos. Ainda, caracteres morfológicos têm apresentado pouca acurácia na distinção de *A. cursor*, *A. montensis* e seus híbridos, sendo por isso alvo de investigação. Analogamente, *A. cursor* apresenta três formas cariotípicas, uma intermediária às duas, e há dois agrupamentos monofiléticos que refletem a organização geográfica das populações em clados Norte e Sul, embora em ambos clados seja possível encontrar as mesmas variantes cariotípicas. Questionamentos sobre a existência de isolamento reprodutivo entre linhagens dos clados Norte e Sul e entre as formas homomórficas $2n=14$ e $2n=16$ foram investigadas a partir de cruzamentos experimentais e subsequente análise histológica dos túbulos seminíferos. O objetivo do presente estudo foi tratar o tema sob uma ótica multidisciplinar e ampla visando compreender os padrões e processos responsáveis pela distribuição da diversidade em *A. cursor*. Para tanto, foram resgatadas informações moleculares, cariotípicas, reprodutivas e de distribuição geográfica já disponíveis para a espécie. Foram somados ainda dados histológicos, morfológicos e anatômicos das variantes de *A. cursor* e de híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*, permitindo análise comparativa de modo a investigar “*Akodon cursor* é uma única espécie?” Os dados de morfologia e anatomia interna distinguiram em 91,4% dos casos os exemplares do clado Norte de *A. cursor* (ACU-N), clado Sul (ACU-S) e Interclado (ACU-E), e apresentaram sete medidas com diferença significativa entre os grupos. Foi observado um padrão latitudinal de distinção em *A. cursor*, com maiores valores para os exemplares do Norte e menores para os do sul. As análises histológicas revelaram que há produção de espermatozoides nos três grupos ACU-N, ACU-S ou ACU-E. Exemplares de *A. montensis* (AMO), *A. cursor* (ACU) e híbridos (HIB) foram corretamente classificados nas análises

discriminantes em 91% dos casos e apresentaram diferenças significativas em 14 das 23 medidas tomadas. *A. cursor* apresentou na maioria dos casos, valores maiores nas medições feitas em relação a *A. montensis*. Representantes interclado e híbridos nem sempre apresentaram padrão morfológico ou anatômico intermediário entre seus parentais. Considerando todos os dados obtidos em análises moleculares, cariotípicas, reprodutivas, morfológicas, anatômicas e histológicas, conclui-se que: 1) Há distinção das populações em clados Norte e Sul, com querbra filogeográfica localizada entre norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Tal padrão é observado a partir de dados moleculares e de morfologia/anatomia; 2) A diversificação encontrada não está relacionada a cariótipos exclusivos, muito embora haja predominância da forma $2n=16$ ao Norte e $2n=14$ ao Sul; 3) Exemplos interclado não apresentam comprometimento reprodutivo, alcançando alta frequência de sucesso reprodutivo; 4) Indivíduos com $2n=15$ apresentam redução de fertilidade, principalmente quando a fêmea é portadora do rearranjo e quando combinado com parental $2n=16$ e $2n=15$. Combinações $2n=14 \times 2n=15$ são que apresentaram maior sucesso reprodutivo. 5) Híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis* são estéreis e mais facilmente gerados a partir da combinação fêmea $2n=24$ e macho $2n=16$, muito embora a introgressão seja bidirecional. Assim, o uso de critérios morfológicos e de monofilia recíproca apontam distinção Norte e Sul, no entanto, sem sinais de isolamento reprodutivo. Entre $2n=14$ e $2n=16$ verifica-se comprometimento reprodutivo do intermediário ($2n=15$), indicando um processo incipiente de especiação estasipátrica, com o favorecimento de fixação da forma $2n=16$ ao Norte e de $2n=14$ ao Sul da distribuição atual.

INTRODUÇÃO

A. cursor (Winge, 1887) é uma espécie que apresenta questões taxonômicas controversas em torno de sua validade como uma única espécie. Essas questões tornam-se ainda mais relevantes quando comparada a sua espécie irmã *A. montensis* Thomas, 1913, com a qual divide áreas de ocorrência (Yonenaga *et al.*, 1975; Geise *et al.*, 1998; Fagundes e Nogueira, 2007; Cordeiro-Júnior, 2008; Araújo, 2014) sendo capaz de gerar híbridos em ambiente natural (Christoff, 1997; Fagundes, 1997, Nogueira, presente estudo). Juntos, *A. cursor*, *A. montensis* e híbridos apresentam diferenças cariotípicas marcantes e características morfológicas semelhantes, que dificultam o seu reconhecimento e distinção a partir de caracteres externos.

Do ponto de vista molecular, *A. cursor* e *A. montensis* são espécies facilmente distintas (Geise *et al.*, 2001; Fagundes e Nogueira, 2007; Gonçalves *et al.*, 2007), apresentam diversidade genética elevada e estruturação intraespecífica com formação de agrupamentos monofiléticos (Nogueira e Fagundes, 2008; Valdez and D'Elia, 2013). Cada uma das espécies tem um padrão genético próprio, havendo organização geográfica das populações em clados Norte e Sul em *A. cursor* (Nogueira, presente estudo).

Do ponto de vista cariotípico, as duas espécies são inequivocamente distintas. *A. cursor* apresenta variações do número diploide ($2n=14, 15$ e 16) em decorrência de rearranjos cromossômicos que envolvem predominantemente cinco pares autossômicos responsáveis pela variação do número de braços autossômicos $NF=18-26$ (Fagundes *et al.*, 1998) e que, até o momento, culminam na descrição de 31 citótipos para a espécie (Colombi, 2010). O complemento cromossômico básico em *A. montensis* é $2n=24$, havendo registros de alterações decorrentes de monossomia do cromossomo X ($2n=23$) e da presença de um ou dois cromossomos supernumerários ($2n=25$ e $2n=26$, respectivamente) (Fagundes, 1993, 1997; Kasahara e Yonenaga-Yassuda, 1983 Yonenaga *et al.* 1975; Yonenaga-Yassuda *et al.* 1992). Os híbridos entre essas duas espécies apresentam o complemento haplóide de cada espécie parental, com $2n=19$ e $2n=20$, carregando consigo as formas variantes dos pares autossômicos de *A. cursor*. A introgressão é bidirecional, porém os híbridos são estéreis.

Do ponto de vista morfológico, as diferenças são sutis e dificultam o reconhecimento e distinção das espécies. Christoff (1997) foi um dos pioneiros nesse estudo, não encontrando caracteres morfocraniométricos capazes de diferenciar *A. cursor* e *A. montensis*, mas

requerendo confirmação genética dos táxons. Estudos posteriores envolvendo medidas craniométricas e variáveis corpóreas revelaram que *A. montensis* apresenta medidas craniométricas menores que *A. cursor* e que, dentro de *A. cursor*, existem diferenças significativas entre dois grupos, porém a análise discriminante exibiu sobreposição parcial dos grupos (Geise *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2007). Ástua *et al.* (2015) utilizaram dados craniométricos e da mandíbula e encontraram diferenças significativas entre as espécies, sendo *A. cursor* maior que *A. montensis*, mostrando-se eficaz na distinção morfológica dessas espécies, sem que para isso se fizesse necessário o uso de informações citogenéticas ou moleculares.

Estudos envolvendo a anatomia interna apontaram presença de vesícula biliar em *A. cursor* e sua ausência em *A. montensis*, sendo esse um caráter eficaz na distinção dessas espécies (Geise *et al.*, 2004). Porém, outras análises envolvendo anatomia do falo e padrão de pelagem não apresentaram caráter diagnóstico entre essas espécies (Christoff, 1997).

Analogamente às duas espécies e seus híbridos, *A. cursor per se* apresenta padrão de distinção genética das populações entre os agrupamentos Norte e sul, com duas formas cariotípicas distintas e uma forma intermediária a elas, sendo observado similaridade morfológica que não permite a sua distinção. Os representantes do clado Norte já foram no passado reconhecidos como um táxon distinto, por se entender que havia distribuição geográfica distinta, uma forma cariotípica com $2n=16$ e divergência em relação ao agrupamento irmão do Sul com as formas $2n=14$ e 15 (Geise *et al.*, 2001). Estudos posteriores sugeriram que essa distinção é geográfica, estando as três formas cariotípicas presentes em ambos os agrupamentos (Nogueira e Fagundes, 2008). Além disso, o padrão de distribuição em Norte e Sul também foi recuperado em análises morfocraniométricas e de variação corporal, revelando que exemplares do Norte (ali designados como *A. aff. cursor*) apresentam maiores valores que os do Sul (tratados como *A. cursor*) em oito das 20 variáveis analisadas (Geise *et al.*, 2005)

O objetivo do presente capítulo foi realizar uma abordagem global visando compreender os padrões e processos responsáveis pela distribuição da diversidade em *A. cursor*. Para tanto, foram obtidos dados histológicos, morfológicos e anatômicos das variantes intraespecíficas e comparadas com informações moleculares, cariotípicas, reprodutivas e de distribuição geográfica já disponíveis para a espécie. A análise comparativa com *A. cursor* x *A. montensis* e os híbridos verdadeiros permite explorar a questão se *Akodon cursor* é uma única espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Para as análises da morfologia externa e anatomia interna foram utilizados exemplares de *A. cursor* 2n=14, *A. montensis* 2n=24 e híbridos 2n=19 e 20 gerados em cativeiro, totalizando 72 exemplares. Para estudos de histologia de testículo foram utilizados 16 machos (**Tabela 5.1**).

Exemplares matriz de *A. cursor* foram capturados em populações da Bahia (clado Norte – ACU-N, n=20) e do Espírito Santo (clado Sul – ACU-S), n=13) e *A. montensis* em populações de Minas Gerais e São Paulo (AMO, n=30) (**Anexo 3**). Indivíduos interclado, gerados em cativeiro também foram utilizados.

A informação cariotípica dos espécimes foi obtida a partir de células de linfócitos cultivadas *in vitro* (com manutenção do animal vivo) ou de medula óssea (com eutanásia do animal), seguindo metodologia descrita por Rissino (2002) e Fagundes *et al.* (1998), respectivamente.

Anatomia interna

Para avaliar as variações intraespecíficas em *A. cursor* e as interespecíficas entre *A. cursor* e *A. montensis*, foram realizadas análises de anatomia interna e morfologia externa em exemplares de ambos os sexos com idade igual ou superior a 90 dias, incluindo matrizes e descendentes gerados em cativeiro. Para a análise de histologia testicular foram utilizados machos gerados em cativeiro com idade entre 90 e 150 dias de nascidos.

Para a análise de morfologia externa foram tomadas cinco variáveis corpóreas: comprimento do corpo incluindo cabeça (CCO), comprimento da cauda (CCA), comprimento da pata posterior sem unha (PSU), comprimento da pata anterior sem unha (ASU) e altura da orelha (ALO).

Foram tomadas 18 medidas a partir de estômago, rins, coração e mesentério (**Figura 5.1**). **Estômago**: 1) comprimento do corpo (ESC); 2) comprimento da curvatura menor (ESCM); 3) altura do fundo (ESF); e 4) área total 2D (ESA); **Rins** (esquerdo e direito): 5 medidas para cada rim: 1) comprimento longitudinal (RELO, RDLO); 2) largura superior (RELS, RDLS); 3) largura média (RELM, RDLM); 4) largura inferior (RELI, RDLI); e 5) área

total 2D (REA, RDA); **Coração:** 1) área total 2D (CA); 2) largura máxima (CLM); 3) comprimento longitudinal máximo (CCM); Número de ramificações do **mesentério** (MNR).

Os órgãos internos (estômago, intestino completo, rins e coração) foram acessados através de incisão ventral e retirados para serem fotografados. No momento da dissecação foram contados o número de ramos mesenteriais. As demais medidas foram tomadas após o registro fotográfico das estruturas com o auxílio do software ImageJ®, sendo a escala de medida calibrada a cada fotografia com o auxílio de régua e papel milimetrado ao fundo.

Os padrões de variação anatômica e morfológica foram explorados em análises discriminantes para testar a diferenciação entre as espécies (ou grupos, conforme hipóteses) identificadas *a priori* através do cariótipo, e para identificar as variáveis que melhor discriminam os representantes de cada grupo testado.

Para todas as variáveis foram calculados média, desvio padrão e valores máximo e mínimo e realizada análise de Variância (ANOVA) para se testar diferenças entre os grupos estabelecidos em cada hipótese. O nível crítico de significância adotado foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS®.

Histologia

A análise histológica dos testículos foi realizada em indivíduos representativos dos grupos amostrais ACU-N, ACU-S, ACU-E, AMO e HIB. Após a eutanásia do espécime com sobredose de anestésico quetamina:xilazina (conforme indicação veterinária), um dos testículos de cada indivíduo foi retirado e fixado com solução de Karnovsky a 10°C por 24 horas. Em seguida, o testículo foi tratado com solução de álcool com concentrações crescentes para desidratação, realizada a inclusão em resina glicol metacrilato e, em seguida seccionado com navalhas de vidro em fragmentos com 3µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâmina de vidro, o material corado com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e analisado ao microscópio de luz para análise da estrutura dos túbulos seminíferos.

Análise dos dados

A análise dos dados envolveu tratar dois aspectos:

a) Há diferenças significativas entre os indivíduos do clado Norte, do clado Sul e aqueles resultantes de cruzamentos interclado em *A. cursor* com relação à morfológica externa,

anatômica e histologia de testículos. Para tanto foram usados exemplares matriz (Norte e Sul) e descendentes gerados em cruzamentos intra (ACU-N e ACU-S) e interclado (ACU-E).

b) Não há diferenças significativas entre indivíduos de *A. cursor*, *A. montensis* e os híbridos com relação a morfologia externa, anatomia interna e histologia testicular. Para tanto foram usados exemplares matriz e descendentes intraclado de *A. cursor* (ACU-N e ACU-S), matriz e descendentes de *A. montensis* (AMO) e híbridos entre essas espécies gerados em cativeiro (HIB).

Os dados obtidos foram utilizados para endossar a discussão acerca da validade de *A. cursor* como uma única espécie, já que apenas um trabalho (Nogueira e Fagundes, 2008) menciona a distinção entre populações correspondente a estruturação geográfica recuperada. Além disso, as análises de anatomia interna e histologia testicular são métodos novos nesse tipo de abordagem comparativa, geralmente associada a caracteres morfocraniométricos. Como *A. cursor* e *A. montensis* são espécies crípticas, a maioria dos esforços de distinção em nível de espécie realizada com *A. cursor* tem sido feita no intuito de se reconhecer variáveis capazes de distingui-la de sua espécie-irmã. Utilizando essas informações entre espécies reconhecidamente distintas e que divergiram a cerca de 1,75Ma e comparando-as com a variação intraespecífica em *A. cursor* cuja divergência entre os clados Norte e Sul tem cerca de 1Ma, busca-se melhor compreensão sobre seu *status* enquanto espécie.

A escassez de exemplares $2n=15$ e $2n=16$ em idade apropriada para as análises aqui propostas inviabilizou que, nesse momento, fossem apresentadas comparações de morfologia externa, anatomia interna e histologia testicular envolvendo exemplares de *A. cursor* com os três números diploides.

A ocorrência de dimorfismo sexual foi analisada para todos os grupos amostrais considerados: ACU-N, ACU-S, ACU-E, AMO e HIB.

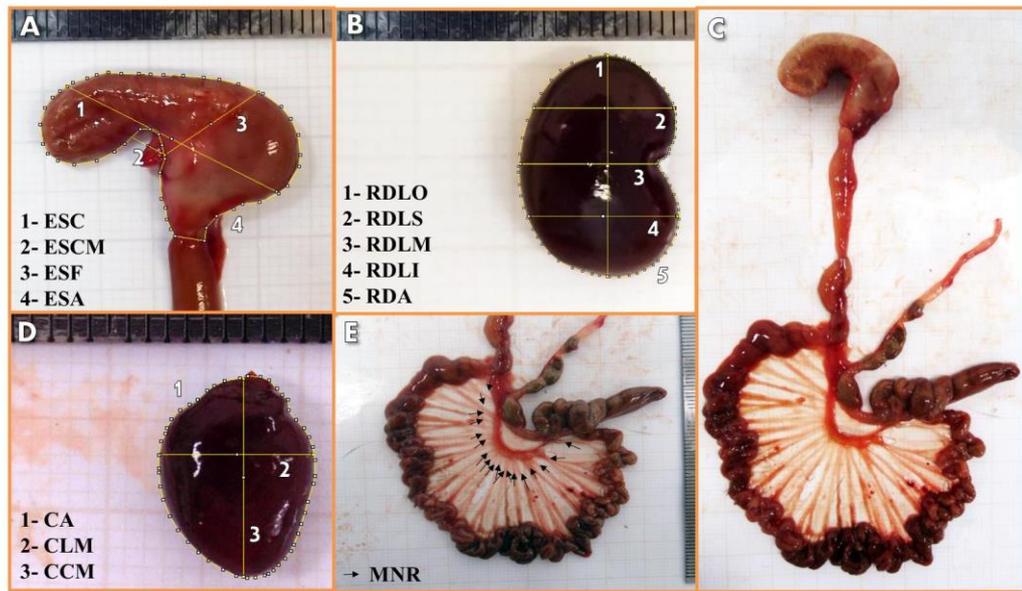


Figura 5.1 – Medidas tomadas nos órgãos considerados nas análises de anatomia interna. A) estômago; B) rim direito (idem para o rim esquerdo); C) estômago com intestinos completos (apenas contextualização); D) coração; E) ramos mesentéricos.

Tabela 5.1 – Exemplos de *A. cursor* (ACU-N, ACU-S, ACU-E) *A. montensis* (AMO) e híbridos (HIB), utilizados nas análises de anatomia interna (A), morfologia externa (M) e histologia testicular (H), visando testar as hipóteses propostas.

Abordagem	Espécie/Clado	Sexo	Análises	
			A, M	H
A	<i>Akodon cursor</i> Norte (ACU-N)	♂	5	
	<i>A. cursor</i> Sul (ACU-S)	♂	12	5
	<i>A. cursor</i> Interclado (ACU-E)	♂	7	5
		♀	5	
		♀	7	5
			43	15
B	<i>A. cursor</i> (ACU-N + ACU-S)	♂	12	
	<i>Akodon montensis</i> (AMO)	♂	19	6
	Híbridos (HIB)	♂	12	
		♂	13	5
		♀	7	
			9	5
			72	16

RESULTADOS

Distinção entre os grupos Norte, Sul e Interclado de *A. cursor*

Nas análises de morfologia externa e anatomia interna não houve diferença significativa entre os sexos, permitindo o agrupamento dos exemplares em 3 grupos: indivíduos do clado Norte (ACU-N), indivíduos do clado sul (ACU-S) e indivíduos gerados pelo cruzamento entre indivíduos do clado norte e sul, chamados interclados (ACU-E).

Dentre as 23 medidas analisadas, quatro foram significativamente diferentes entre os grupos ACU-N, ACU-S e ACU-E nas análises de variância, sendo uma correspondente a morfologia externa (comprimento corporal) e três a anatomia interna (área total do estômago, área total e largura máxima do coração).

Considerando-se somente os agrupamentos ACU-N e ACU-S, observou-se outras sete variáveis significativas distintas entre eles, o comprimento do corpo e altura do fundo do estômago e comprimento longitudinal máximo do coração, reforçando a distinção entre os grupos naturais, Norte e Sul, em *A. cursor*.

Em alguns casos, os indivíduos interclado apresentaram valores intermediários entre ACU-N e ACU-S e em outros casos maiores valores (61%) que ACU-N. Na maioria das medidas tomadas, ACU-S foi o grupo que sempre apresentou os menores valores, salvo para o comprimento da cauda, quando exibiu posição intermediária com ACU-E apresentando o maior valor médio (**Tabela 5.2**).

Na análise discriminante, os dois primeiros componentes sumarizam aproximadamente 62,5% da variância do conjunto de dados, sendo que o primeiro componente explica 53,3% da variância (**Figura 5.2; Tabela 5.3**).

As variáveis com maior poder discriminatório foram altura da orelha (ALO), largura máxima do coração (CLM), altura do fundo do estômago (ESF) e largura média do rim esquerdo (RELM). Verificou-se que ao longo do eixo função discriminante 1 foi possível diferenciar *A. cursor* do clado Norte (ACU-N) dos demais do clado Sul (ACU-S) e interclado (ACU-E), enquanto que ao longo da função discriminante 2 distinguiu-se ACU-S de ACU-E com alguns pontos de sobreposição.

Em 100% dos casos, exemplares de ACU-N foram classificados corretamente na análise discriminante, enquanto ACU-S e ACU-E apresentaram 90,0% e 80,0%, respectivamente de

correlações assertivas. No total, 91,4% dos casos foram identificados corretamente na análise discriminante.

Analisando qualitativamente cortes transversais dos túbulos seminíferos de exemplares do clado Norte, clado Sul e interclado não foi possível identificar diferenças estruturais entre os grupos, e em todos os casos foi possível verificar a presença de espermatozoides no lúmen do túbulo (**Figura 5.3**).

Tabela 5.2 – Variáveis anatômicas e morfológicas entre os grupos de *A. cursor* clado Norte (ACU-N), clado Sul (ACU-S) e interclado (ACU-E). Os valores de significância na ANOVA correspondem à análise incluindo os três grupos (superior) e entre parêntesis (inferior) corresponde à análise dos grupos ACU-N e ACU-S.

Variáveis	Grupos	n	Média	Desvio Pad.	Mínimo	Máximo	ANOVA (p-valor) ¹
Comp. corpo (CCO)	ACU-N	17	114,52941	8,537547	100,000	130,000	0,032 (0,010)
	ACU-S	14	104,78571	11,150568	88,000	122,000	
	ACU-E	12	111,41667	10,317314	97,000	128,000	
Comp. cauda (CCA)	ACU-N	17	86,88235	18,767933	29,000	107,000	0,971 (0,980)
	ACU-S	12	87,07143	23,083342	23,000	112,000	
	ACU-E	11	88,58333	16,047987	49,000	109,000	
Comp. pata posterior sem unha(PSU)	ACU-N	17	24,41176	1,003670	23,000	26,000	0,198 (0,568)
	ACU-S	14	24,71429	1,857565	19,000	26,000	
	ACU-E	12	25,33333	0,984732	24,000	27,000	
Comp. pata anterior sem unha(ASU)	ACU-N	17	11,47059	1,007326	10,000	13,000	0,205 (0,104)
	ACU-S	14	10,92857	0,730046	10,000	12,000	
	ACU-E	12	11,25000	0,621582	11,000	13,000	
Altura orelha (ALO)	ACU-N	17	16,76471	1,855041	14,000	20,000	0,494 (0,402)
	ACU-S	14	16,21429	1,717716	13,000	18,000	
	ACU-E	12	17,08333	2,108784	13,000	21,000	
Estômago – comp. corpo (ESC)	ACU-N	17	21,29118	2,360812	18,319	27,114	0,060 (0,014)
	ACU-S	14	18,96391	2,618615	13,933	23,225	
	ACU-E	11	20,87273	3,314596	16,703	26,224	
Estômago – curv. menor (ESCM)	ACU-N	17	5,14212	2,035178	2,941	11,345	0,858 (0,605)
	ACU-S	14	4,83979	0,794495	3,106	5,896	
	ACU-E	11	5,00282	1,205688	3,396	7,374	
Estômago – altura fundo (ESF)	ACU-N	17	11,17741	1,570167	8,167	14,407	0,071 (0,026)
	ACU-S	14	9,83800	1,592682	7,453	13,005	
	ACU-E	11	10,98736	1,786916	8,400	15,039	
Estômago – área total 2D (ESA)	ACU-N	17	266,48376	53,257294	185,963	414,219	0,041 (0,014)
	ACU-S	14	212,79857	60,891788	130,899	328,978	
	ACU-E	11	262,00091	69,405078	195,885	423,873	
Rim dir. – comp. long. (RDLO)	ACU-N	17	11,19888	0,855315	9,320	12,618	0,161 (0,680)
	ACU-S	14	11,05214	1,106548	9,161	13,020	
	ACU-E	12	11,78908	1,091509	9,762	14,034	
Rim direito – larg. superior (RDLS)	ACU-N	17	6,80929	0,610951	6,103	7,931	0,180 (0,479)
	ACU-S	14	6,61136	0,919177	5,650	8,926	
	ACU-E	12	7,17292	0,754782	5,953	8,498	

Cont. Tabela 5.2

Variáveis	Grupos	n	Média	Desvio Pad.	Mínimo	Máximo	ANOVA (p-valor) ¹
Rim direito – larg. média (RDLM)	ACU-N	17	6,63629	0,635146	5,772	7,643	0,147 (0,201)
	ACU-S	14	6,26543	0,937685	4,770	8,725	
	ACU-E	12	6,87117	0,8769477	5,809	8,380	
Rim direito – larg. inferior (RDLI)	ACU-N	17	6,99988	0,730631	5,919	8,161	0,231 (0,520)
	ACU-S	14	6,78514	1,096557	5,066	9,329	
	ACU-E	12	7,36317	0,646330	6,286	8,307	
Rim direito – área total 2D (RDA)	ACU-N	17	70,08418	10,282401	51,064	83,710	0,192 (0,552)
	ACU-S	14	67,26879	15,617774	45,704	102,450	
	ACU-E	12	76,57308	13,123903	53,923	100,867	
Rim esq. – comp. long. (RELO)	ACU-N	17	12,06818	0,979000	10,257	13,767	0,176 (0,146)
	ACU-S	14	11,50079	1,134317	10,069	13,691	
	ACU-E	11	12,25718	1,080955	9,738	13,552	
Rim esq. – larg. superior (RELS)	ACU-N	17	6,87788	0,534566	5,846	7,757	0,238 (0,957)
	ACU-S	14	6,86379	0,902525	5,723	9,083	
	ACU-E	11	7,34191	0,916834	5,119	8,723	
Rim esq. – larg. média (RELM)	ACU-N	17	6,45094	0,601180	5,156	7,497	0,458 (0,271)
	ACU-S	14	6,16886	0,799095	4,939	8,144	
	ACU-E	11	6,51245	0,891824	5,143	8,337	
Rim esq. – larg. inferior (RELI)	ACU-N	17	6,52829	0,661872	5,570	8,033	0,163 (0,388)
	ACU-S	14	6,28243	0,898098	5,255	8,591	
	ACU-E	11	6,90636	0,847188	6,005	9,013	
Rim esq. – área total 2D (REA)	ACU-N	17	74,15029	11,139779	52,138	97,913	0,150 (0,201)
	ACU-S	14	67,93036	15,280492	49,663	107,072	
	ACU-E	11	78,32609	13,308050	53,726	103,060	
Coração – área total 2D (CA)	ACU-N	16	73,74356	16,590440	46,412	105,337	0,037 (0,009)
	ACU-S	14	59,32750	10,394241	45,739	81,873	
	ACU-E	12	69,45125	16,887176	46,371	112,245	
Coração – larg. Máxima (CLM)	ACU-N	16	8,26288	0,949138	6,475	9,762	0,026 (0,019)
	ACU-S	14	7,39943	0,950629	6,146	9,281	
	ACU-E	12	8,38275	1,098261	6,213	10,374	
Coração – comp. long. máx. (CCM)	ACU-N	16	10,89181	1,332754	8,704	12,930	0,113 (0,028)
	ACU-S	14	9,91029	0,922484	8,395	11,598	
	ACU-E	12	10,35450	1,464848	8,711	14,009	
Nº ramos mesent. (MNR)	ACU-N	16	15,81250	3,816084	7,000	24,000	0,359 (0,175)
	ACU-S	11	18,54545	6,361818	5,000	29,000	
	ACU-E	11	16,81818	4,308554	10,000	25,000	

Tabela 5.3 – Porcentagem de classificação dos grupos na análise discriminante.

Classificação	N	Grupo a que pertence o exemplar após análise discriminante		
		ACU-N	ACU-S	ACU-E
ACU-N	17	100,0%	-	-
ACU-S	14	-	90,0%	10,0%
ACU-E	12	-	20,0%	80,0%
91,4% do exemplares classificados corretamente				

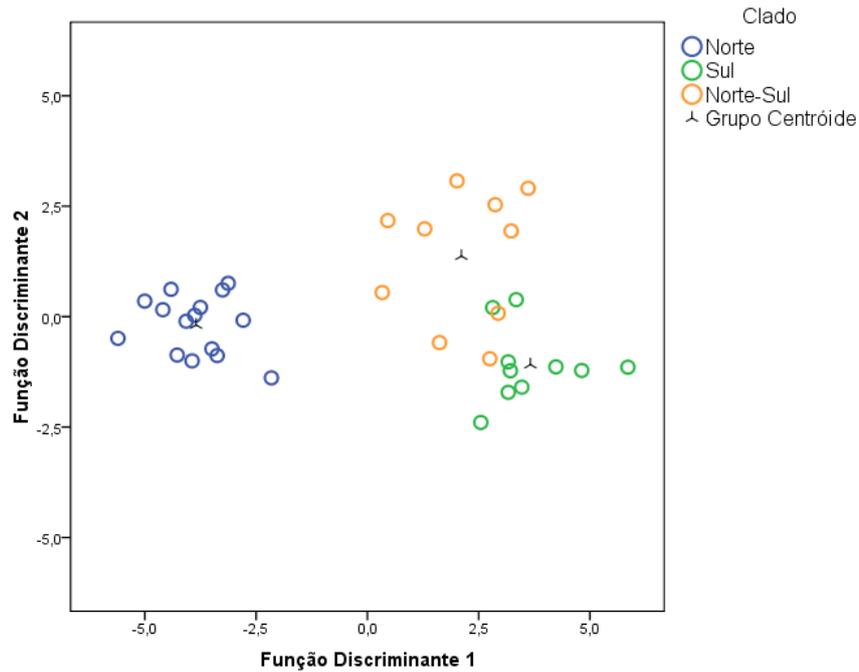


Figura 5.2 – Valores da primeira função discriminante versus escores da segunda função discriminante revelando o padrão de diferenciação anatômica e morfológica entre representantes dos clados Norte, Sul e interclado de *A. cursor*.

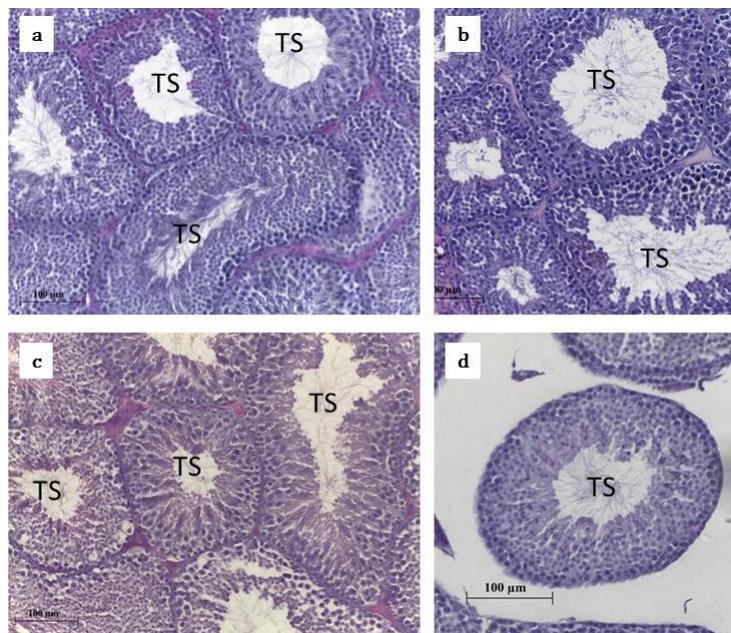


Figura 5.3 – Corte longitudinal de túbulo seminífero de exemplares de *A. cursor* representativos do clado Sul (a), do clado Norte (b) e interclado (c) e (d). As imagens mostram a formação de espermatozoides na luz dos túbulos em todas as formas. Barra = 100µm.

Distinção entre os grupos *A. cursor*, *A. montensis* e seus híbridos

Dentre as 23 medidas analisadas (**Tabela 5.4**), 14 foram significativamente diferente entre os grupos ACU, AMO e HIB: comprimento corporal (CCO), estômago (ESC, ESF e ESA), rins (RELO, RELM, RELI, REA, RDLO, RDLS RDLI) e coração (CA, CLM e CCM).

Em relação aos valores médios das variáveis, ACU foi maior que AMO em 17 das 24 medidas realizadas (comprimento do corpo, cauda, patas posteriores, anteriores, todas as renais, ramos mesentéricos, área e largura máxima do coração), enquanto AMO apresentou para 4 variáveis maiores valores que ACU (todas do estômago e altura da orelha).

Os híbridos não apresentaram padrão único, exibindo medidas maiores, intermediárias ou menores que as obtidas para ACU. O teste de variância feito com a retirada dos híbridos das análises revelaram que de 14 o número de medidas significativas entre ACU e AMO baixou para 11 (exclusão de altura e área do estômago e comprimento longitudinal dos rim direito).

Na análise discriminante os dois primeiros componentes sintetizam cerca de 63,5% da variância do conjunto de dados, sendo que o primeiro componente é responsável por 52,5% dessa variância. As variáveis com maior poder discriminatório foram área total do estômago (ESA) e largura superior do rim direito (RDLS). Ao longo do eixo da primeira função discriminante verificou-se a distinção entre *A. montensis* (AMO) e *A. cursor* (ACU). Ao longo do eixo da segunda função discriminante foi possível distinguir os híbridos (HIB) das espécies parentais ACU e AMO. Híbridos foram corretamente identificados em 100,0% dos casos nas análises discriminantes, seguido por *A. montensis* (88,2%) e *A. cursor* (88,0%). Considerando toda a amostragem 88,7% dos casos foram corretamente classificados (**Figura 5.4; Tabela 5.5**).

A histologia de testículo de *A. cursor* e *A. montensis* revelou algumas células em estágios diferentes da espermatogênese, com acúmulo de espermatozoides no lúmen, enquanto que nos híbridos, apesar de também se observar alguns estágios típicos da espermatogênese, não houve a formação do lúmen nem a formação de espermatozoides. Células fagocitárias geralmente encontradas apenas no compartimento intersticial dos testículos também estavam presentes nos túbulos seminíferos dos híbridos (**Figura 5.5**).

Tabela 5.4 – Tamanho amostral, média, desvio padrão, mínimo, máximo e valores de significância da análise de variância (ANOVA) indicando quais variáveis anatômicas e/ou morfológicas mostram-se significativamente diferentes entre *A. cursor* (ACU), *A. montensis* (AMO) e seus híbridos (HIB). Para os dois valores de significância na ANOVA: superior=3 grupos amostrais (ACU, AMO e HIB); inferior, entre parêntesis=2 grupos amostrais (ACU e AMO).

Variáveis	Grupos	N*	Média	Desvio Pad.	Mínimo	Máximo	ANOVA (p-valor) ¹
Comp. corpo (CCO)	ACU	31	110,12903	10,818940	88,000	130,000	0,004
	AMO	24	103,00000	8,687406	86,000	118,000	(0,016)
	HIB	16	100,93750	8,201372	91,000	115,000	
Comp. cauda (CCA)	ACU	31	86,96774	20,463763	23,000	112,000	0,781
	AMO	23	86,04348	8,471762	62,000	99,000	(0,839)
	HIB	16	89,37500	5,512108	80,000	100,000	
Comp. pata posterior sem unha(PSU)	ACU	31	24,54839	1,433846	19,000	26,000	0,904
	AMO	25	24,52000	1,084743	21,000	26,000	(0,935)
	HIB	16	24,68750	0,873212	23,000	26,000	
Comp. pata anterior sem unha(ASU)	ACU	31	11,22581	0,920495	10,000	13,000	0,349
	AMO	24	10,87500	0,991814	9,000	13,000	(0,181)
	HIB	16	11,06250	0,573730	10,000	12,000	
Altura orelha (ALO)	ACU	31	16,51613	1,786448	13,000	20,000	0,137
	AMO	25	16,84000	1,545962	13,000	19,000	(0,477)
	HIB	16	15,81250	1,223043	14,000	18,000	
Estômago – comp. corpo (ESC)	ACU	31	20,24015	2,707398	13,933	27,114	0,000
	AMO	25	22,58860	3,083439	16,485	28,188	(0,004)
	HIB	15	18,63760	3,103912	14,422	26,439	
Estômago – curv. menor (ESCM)	ACU	31	5,00558	1,583023	2,941	11,345	0,172
	AMO	25	5,34480	2,363571	3,113	7,457	(0,524)
	HIB	15	4,16360	1,701583	1,136	14,444	
Estômago – altura fundo (ESF)	ACU	31	10,57252	1,695057	7,453	14,407	0,004
	AMO	25	11,12532	1,777840	7,617	14,486	(0,240)
	HIB	15	9,23913	1,430314	7,670	13,253	
Estômago – área total 2D (ESA)	ACU	31	242,23884	62,104763	130,899	414,219	0,035
	AMO	25	272,72368	56,436003	169,228	369,120	(0,063)
	HIB	15	222,82313	62,991030	147,232	375,375	
Rim dir. – comp. long. (RDLO)	ACU	31	11,13261	0,962431	9,161	13,020	0,016
	AMO	25	10,87488	0,789755	9,423	12,372	(0,290)
	HIB	14	10,25693	0,964748	8,623	11,628	
Rim direito – larg. superior (RDLS)	ACU	31	6,71990	0,758430	5,650	8,926	0,129
	AMO	25	6,37440	0,725781	5,050	7,659	(0,081)
	HIB	14	6,34171	0,732211	5,538	8,049	
Rim direito – larg. média (RDLM)	ACU	31	6,46881	0,794582	4,770	8,725	0,039
	AMO	25	6,04112	0,646318	5,114	7,447	(0,038)
	HIB	14	5,96093	0,652702	4,821	7,409	
Rim direito – larg. inferior (RDLI)	ACU	31	6,90290	0,904192	5,066	9,329	0,012
	AMO	25	6,26988	0,582795	5,549	7,660	(0,004)
	HIB	14	6,42150	0,811766	5,055	7,774	
Rim direito – área total 2D (RDA)	ACU	30	68,86433	13,026384	45,704	102,450	0,039
	AMO	25	62,01156	11,899209	29,606	87,828	(0,048)
	HIB	14	59,55921	12,515287	43,888	87,971	

Cont. Tabela 5.4

Variáveis	Grupos	N*	Média	Desvio Pad.	Mínimo	Máximo	ANOVA (p-valor) ¹
Rim esq. – comp. long. (RELO)	ACU	31	11,81194	1,072900	10,069	13,767	0,002 (0,029)
	AMO	24	11,21258	0,847915	9,724	12,766	
	HIB	16	10,72175	0,948108	8,862	12,667	
Rim esq. – larg. superior (RELS)	ACU	31	6,87152	0,710935	5,723	9,083	0,008 (0,005)
	AMO	24	6,31308	0,700238	5,150	7,730	
	HIB	16	6,38356	0,636188	5,210	7,362	
Rim esq. – larg. média (RELM)	ACU	31	6,32355	0,699876	4,939	8,144	0,146 (0,296)
	AMO	24	6,12975	0,643488	4,999	7,624	
	HIB	16	5,94831	0,404774	5,000	6,744	
Rim esq. – larg. inferior (RELI)	ACU	31	6,41726	0,773710	5,255	8,591	0,288 (0,289)
	AMO	24	6,20250	0,688079	4,850	7,908	
	HIB	16	6,09613	0,583572	5,161	7,326	
Rim esq. – área total 2D (REA)	ACU	31	71,34129	13,314091	49,663	107,072	0,022 (0,000)
	AMO	24	65,01617	10,529106	52,919	91,604	
	HIB	16	61,57494	10,819981	43,762	78,923	
Coração – área total 2D (CA)	ACU	30	67,01607	15,630328	45,739	105,337	0,003 (0,000)
	AMO	24	52,79875	10,668174	38,632	82,036	
	HIB	16	59,96463	17,426759	36,521	110,404	
Coração – larg. Máxima (CLM)	ACU	30	10,43377	1,244291	8,395	12,930	0,000 (0,000)
	AMO	24	6,95333	,893805	5,819	9,582	
	HIB	16	7,43175	1,172531	5,681	10,568	
Coração – comp. long. máx. (CCM)	ACU	30	7,85993	1,031030	6,146	9,762	0,000 (0,000)
	AMO	24	9,21737	0,985560	7,938	11,379	
	HIB	16	9,73400	1,377311	7,953	13,067	
Nº ramos mesent. (MNR)	ACU	27	16,92593	5,083351	5,000	29,000	0,508 (0,374)
	AMO	22	15,81818	3,064953	8,000	21,000	
	HIB	15	15,60000	3,202677	9,000	22,000	

Tabela 5.5 – Classificação anterior das espécies parentais e híbridos, tamanho amostral e porcentagem de casos agrupados corretamente na análise discriminante.

Classificação	N	Grupo a que pertence o exemplar após análise discriminante		
		ACU	AMO	HIB
ACU	31	88,0%	4,0%	8,0%
AMO	25	-	88,2%	11,8%
HIB	16	-	-	100,0%
90,9% do exemplares classificados corretamente				

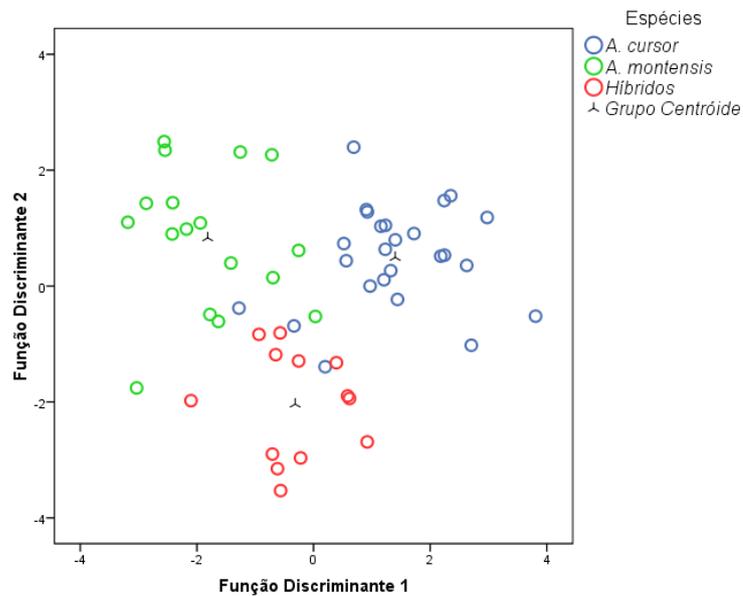


Figura 5.4 – Valores da primeira função discriminante versus escores da segunda função discriminante revelando o padrão de diferenciação anatômica e morfológica entre as espécies parentais *A. cursor* e *A. montensis*.

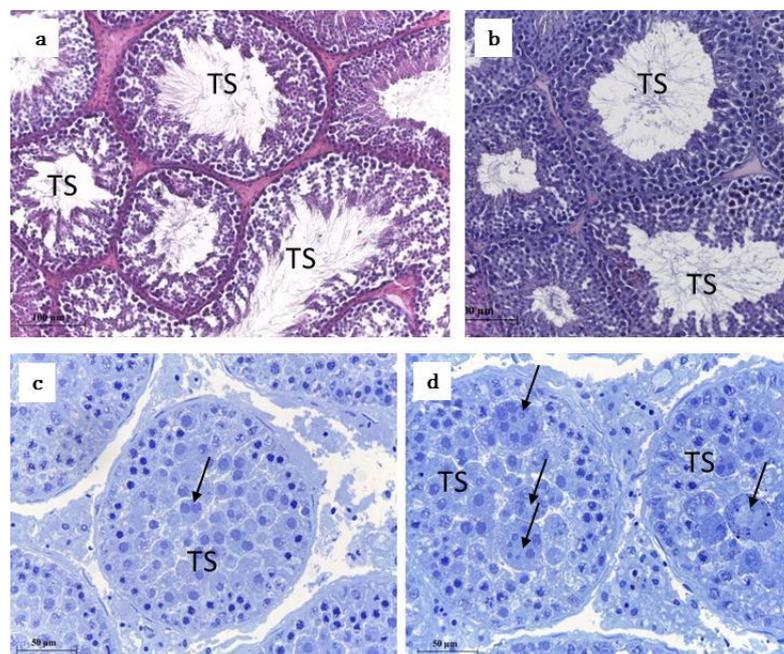


Figura 5.5 – Corte longitudinal de túbulo seminífero (TS). (a) *A. cursor* (b) *A. montensis* (c) e (d) híbridos, com ausência de espermatozoides e presença e células fagocitárias (setas), sem formação de luz do túbulo. Barra = 100µm em (a) e (b), 50 µm em (c) e (d).

DISCUSSÃO

Distinção molecular, morfológica e anatômica entre clados Norte e Sul de *A. cursor*: 2n=16 não está associado a táxon distinto

A distinção morfológica e anatômica entre *A. cursor* dos clados Norte e Sul foi marcante, revelando diferença significativa para sete das 23 medidas analisadas. Para a maioria das medidas, ACU-S apresentou menores valores que ACU-N. O grupo artificial ACU-E, resultado de cruzamentos interclado mostrou padrão variável, com valores intermediários ou superiores aos observados em ACU-N, sendo essa última a condição mais recorrente (61%). Apesar disso, as análises discriminantes permitiram a correta distinção de ACU-N em 100% dos casos. Houve sobreposição na classificação de ACU-S e ACU-E na análise discriminante, revelando maior similaridade dessas formas entre si do que com ACU-N.

Nenhuma alteração estrutural foi observada nos túbulos seminíferos dos exemplares de *A. cursor* analisados, havendo acúmulo de espermatozoides na luz do túbulo de todos eles. Esses dados, aliados ao sucesso reprodutivo apresentado em cruzamentos experimentais realizados com representantes dos clados Norte, Sul e Interclado (Cap. 2) indicam que os representantes de todos os grupos são férteis, chegando os representantes interclado a alcançar 80% de sucesso reprodutivo, o maior valor registrado em toda a amostragem.

Indícios de distinção entre exemplares do clado Norte e Sul de *A. cursor* foram observados utilizando-se dados de anatomia interna e morfologia externa, revelando que exemplares do clado Norte apresentam maiores valores, para as variáveis consideradas, que os do clado Sul. Estudo realizado por Geise *et al.* (2005) envolvendo 20 medidas cranianas e três variáveis corpóreas revelaram que sete medidas cranianas e uma variável corpórea foram significativamente diferentes entre indivíduos das localidades de Lençóis, BA e Turmalina, MG (maiores valores), e os demais exemplares de *A. cursor* coletados em localidade do clado Sul. Os exemplares de Lençóis e Turmalina foram utilizados em análises filogeográficas (Cap. 1) e recuperados como sendo do clado Norte. Sendo assim, nossos resultados são concordantes com aqueles descritos por Geise *et al.* (2005), que sugerem uma distinção entre populações dos clados Norte e Sul de *A. cursor* para variáveis cranianas e de morfologia externa, dando suporte à distinção recuperada nas reconstruções filogenéticas a partir de dados moleculares (Rieger *et al.*, 1995; Geise *et al.*, 2001; Nogueira e Fagundes, 2008) (**Figura 5.6**).

Rieger *et al.*, (1995) e Geise *et al.* (2001) associaram a formação de dois agrupamentos monofiléticos ao cariótipo dos exemplares analisados, sugerindo que indivíduos com $2n=16$ fossem considerados como *Akodon* aff. *cursor* e que indivíduos com $2n=14/15$ seriam integrantes do clado Sul, designados como *A. cursor*. Estudos posteriores já haviam proposto que a distinção entre clados Norte e Sul não estava associada ao cariótipo, uma vez que as três formas cariotípicas ($2n=14$, 15 e 16) estavam presentes nos dois agrupamentos monofiléticos em *A. cursor* (Nogueira e Fagundes, 2008).

Aqui, todos os exemplares utilizados nas análises de anatomia e morfologia dos representantes do clado Norte apresentaram $2n=14$, refutando inequivocamente a proposição de que $2n=16$ está associada exclusivamente ao clado Norte, e que seria um táxon distinto em *A. cursor*, e que os cariótipos $2n=14$ e 15 seriam restritos ao clado Sul.

Assim, nossos dados refutam a proposta de que não haja distinção anatômica e/ou morfológica entre indivíduos dos clados Norte e Sul, e embora os resultados tenham mostrado baixo número de variáveis significativas, eles apontam para uma diferenciação entre essas populações ao longo de um gradiente latitudinal, com maiores valores em populações ao norte. Os indivíduos interclado, caso sejam formados em ambiente natural, tenderiam a ser indistintos dos representantes do clado Sul, sendo necessário o mapeamento genético para identificar as origens dos indivíduos.

Distinção molecular, morfológica e cariotípica entre *A. cursor* e *A. montensis*: isolamento reprodutivo

A análise de variância entre *A. cursor*, *A. montensis* e seus híbridos apresentou resultados conclusivos, com 14 medições (das 23 realizadas) significativamente distintas entre as formas parentais. De modo geral, *A. cursor* apresentou maiores valores para 15 variáveis consideradas. Esses dados corroboram o observado por Geise *et al.* (2005), que utilizando 23 medidas cranianas e corpóreas encontraram diferenças significativas entre *A. cursor* e *A. montensis* em 19 delas, sendo que em todos os casos *A. cursor* apresentou maiores medidas de *A. montensis*. Em 65% dos casos os híbridos apresentaram as menores dimensões em relação aos grupos parentais e em 22% valores intermediários. Em todos os testes realizados, de cruzamentos experimentais e histologia de testículos, os híbridos mostraram-se estéreis.

Nossos resultados apresentam evidências complementares de dados anatômicos, morfológicos e histológicos que confirmam que *A. cursor* e *A. montensis* são distintos entre si. Muito embora a distinção morfológica entre *A. cursor* e *A. montensis* não seja fácil, apenas duas abordagens (anatômica e craniana) tem permitido a identificação 100% eficaz e assertiva dessas espécies sem o auxílio de informações genéticas. Um deles é referente à presença de vesícula biliar em *A. cursor* e à ausência em *A. montensis* (Geise *et al.*, 2004) e outro, recente, registrou para *A. cursor* valores maiores que *A. montensis* dentre as variáveis consideradas nas análises de geometria morfométrica (Ástua *et al.*, 2015). Nos casos em que é possível fazer a distinção parcial (ou total) *A. cursor* apresentou valores maiores para a maioria das variáveis analisadas (Christoff, 1997, presente estudo).

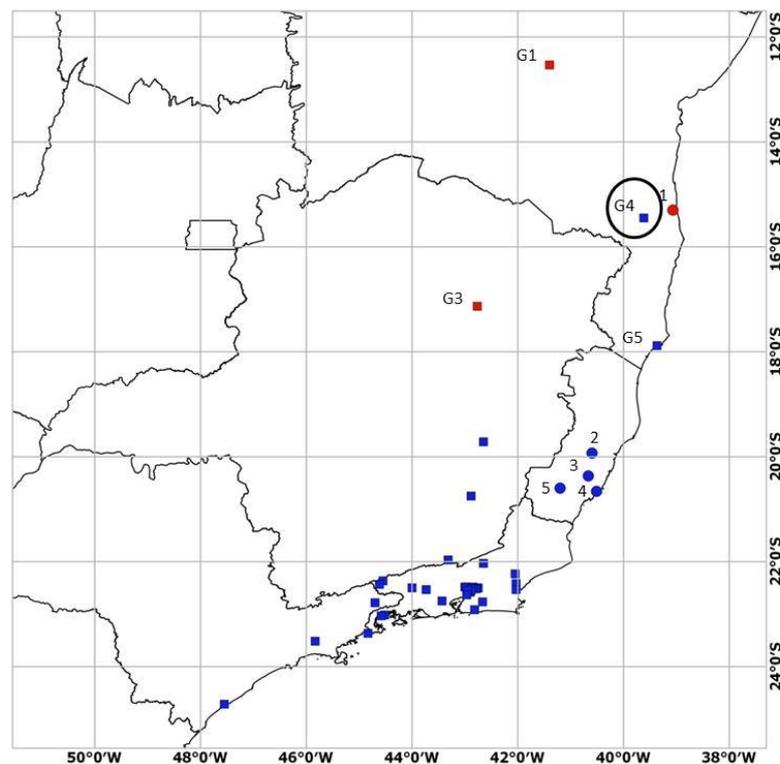


Figura 5.6 – Distribuição geográfica dos exemplares de *A. cursor* utilizados exclusivamente no presente estudo (pontos circulares, descritivo numérico) e no presente estudo e em Geise *et al.*, 2005 (quadrados, sendo G1, G3, G4 e G5 com numeração tal qual artigo – para demais localidades vide o referido trabalho). 1=Una, BA; 2=Santa Teresa, ES; 3=Domingos Martins, ES; 4=Castelo, ES; G1=Lençóis, BA; G3=Turmalina, MG; G4=Pau Brasil, BA; G5=Nova Viçosa, BA. Em azul, localidades do clado Sul e em vermelho, localidades do caldo Norte. Destaque para a localidade G4, cuja classificação foi revista (vide discussão).

Mapeamento da quebra filogeográfica entre clados Norte e Sul de *A. cursor*

A quebra filogeográfica entre clados Norte e Sul está compreendida entre as latitudes 16-18°S (Cap. 1), com representantes do clado Norte distribuídos a oeste de 42°0'W e do clado Sul a leste, nesse intervalo latitudinal. Essa localização é coincidente com o Vale do Rio Jequitinhonha e vai ao encontro do proposto por Colombi *et al.* (2010) que sugeriram que a quebra filogeográfica estava localizada na costa leste no Brasil entre as latitudes 15-20°S, entre o norte do Espírito Santo e sul do Bahia. A separação de *A. cursor* em dois agrupamentos também foi observado em dados morfológicos, cranianos e anatômicos.

Geise *et al.* (2005) indicaram equivocadamente exemplares coletados em Pau Brasil, BA como pertencentes ao clado Sul, uma vez que os exemplares possuíam $2n=14$, e na ocasião, os autores consideravam exemplares com $2n=14$ pertencentes ao clado sul. No entanto, esses mesmos exemplares foram utilizados nas reconstruções filogenéticas apresentadas no Cap. 1 do presente trabalho, tendo sido recuperados como clado Norte, esclarecendo a inconsistência encontrada, e corroborando a hipótese de que no intervalo entre 16-18°C o clado Sul ocupa a posição leste da coordenada 42°W (**Figura 5.6**).

As análises filogenéticas em *A. cursor* baseadas em sequências dos genes Citocromo *b* e Citocromo oxidase I e uma maior amostragem de populações localizadas entre as latitudes 15-20°S mostraram uma divergência genética interclado foi de 2,4% e 4,4% para Cit-*b* e COI, respectivamente. Considerando-se que entre as latitudes 16°-18°C, ao sul da Bahia e norte de Minas Gerais, está localizado o Vale do Rio Jequitinhonha, dividido, conforme altitude e vegetação prevalecente em Alto, Médio e Baixo Jequitinhonha.

O tempo estimado para a diferenciação entre *A. cursor* e *A. montensis* é de aproximadamente 1,75Ma (Coyner *et al.*, 2013). Nesse estudo os autores identificaram ambos clados em *A. cursor*, cujo tempo de diferenciação foi estimado em 1Ma. Assim, o Rio Jequitinhonha não pode ser indicado como responsável pela diversificação dentro de *A. cursor* (barreira por rios), mas que no atual cenário esteja contribuindo como barreira secundária ao fluxo gênico entre os clado Norte e Sul.

Expansão populacional ao Sul contribuindo para a distinção dos clados

Em ambos os clados foram recuperados exemplares com $2n=14$, 15 e 16. No entanto, no clado Norte predominam as formas cariotípicas $2n=16$, principalmente no extremo Norte (entre as latitudes 7-10°S e longitudes 35-36°W), enquanto no clado Sul as formas $2n=14$ e $2n=15$ são mais abundantes. A história demográfica das populações (Cap.1) indica que no Norte há equilíbrio populacional, contrastante com a expansão observada no grupo Sul.

Considerando as hipóteses biogeográficas mais amplamente aceitas para explicar a distribuição da diversidade, verifica-se que a distribuição das populações isoladas da Paraíba e Pernambuco é coincidente com o refúgio de Pernambuco proposto por Carnaval e Moritz (2008), enquanto os clados Norte e Sul mantem-se separados atualmente em parte por diferenças atitudinais e pelo Rio Jequitinhonha (teorias da diversificação por gradientes ecológicos, tectonismo e rios como barreira).

Uma possível rota de expansão para as populações Sul seria pela plataforma continental, conforme hipótese da Mata Atlântica de Leite *et al.* (2016).

Logo, acreditamos que mais de um processo esteja envolvido na diversificação e distribuição atual de *A. cursor*. Nesse cenário, surgem alguns questionamentos: haveria isolamento reprodutivo entre exemplares dos clados Norte e Sul de *A. cursor*? O cariótipo estaria exercendo algum papel nessa diversificação, já que formas distintas estão sendo fixadas em cada um desses grupos ($2n=14$ no Sul e $2n=16$ no Norte)? Cruzamentos experimentais envolvendo espécimes de clados e cariótipos distintos lançariam luz a essas questões, especialmente se comparados a híbridos, reconhecidamente, interespecíficos. Tal enfoque foi abordado no presente trabalho (Cap. 2).

Fixação de $2n=16$ ao Norte e $2n=14$ ao Sul

As formas $2n=14$ e $2n=16$ de *A. cursor* inter cruzaram indistintamente, porém, exemplares com a condição heterozigota $2n=15$ apresentam fertilidade reduzida, sendo a frequência de sucesso reprodutivo maior quando um parental $2n=15$ teve como parceiro exemplar com $2n=14$, do que com $2n=16$.

Dados de cruzamento (Cap. 2) sugerem que espécimes $2n=15$ desempenham papel incipiente de híbrido, com redução da fertilidade ou fertilidade associada ao sexo do parental e mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos que favorecem a formação de descendente quando essa forma heterozigota combina-se com $2n=14$ em detrimento de $2n=16$.

Nos cruzamentos envolvendo indivíduos de *A. cursor* de clados distintos, os descendentes (ACU-E) formaram um grupo intermediário em relação aos dois grupos parentais, seja nos dados morfológicos e anatômicos, porém não sinalizam quaisquer indícios de isolamento reprodutivo ou redução da fertilidade entre populações dos clados Norte e Sul.

Em cenário no qual uma população apresentasse maior frequência de indivíduos com $2n=16$ (como ocorre no clado Norte), a forma heterozigota tenderia a não aumentar sua frequência, podendo desaparecer da população. Esse cenário de exclusividade/predominância da forma $2n=16$ já é observado nas populações do extremo norte da distribuição da espécie na Paraíba, no Pernambuco e na Bahia (Lençóis).

Na produção de híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*, algumas formas cariotípicas das espécies parentais não geraram híbridos, como fêmeas $2n=15$ e $2n=23$ e ambos os sexos da forma $2n=25$. Os cariótipos básicos para as duas espécies $2n=24$ e $2n=16$ apresentam o maior sucesso reprodutivo, enquanto o cariótipo derivado de *A. cursor* ($2n=14$) apresentou o menor sucesso. Esses achados indicam que o cariótipo tem desempenhado um papel fundamental na efetividade dos mecanismos de isolamento reprodutivo entre as espécies (Nogueira, presente estudo).

Um comparativo entre os parâmetros morfológicos, moleculares, reprodutivos e cariotípicos analisados em *A. cursor* e em híbridos entre essa espécie e *A. montensis* encontram-se sumarizados para melhor contextualização na **Tabela 5.6**.

Segundo os pressupostos de King (1987) rearranjos cromossômicos complexos como os observados para formar o cariótipo $2n=15$ podem gerar prejuízo meiótico (heterose negativa) devido à formação de gametas desbalanceados e indivíduos menos adaptados. Os dados existentes de análises meióticas e do complexo sinaptonêmico indicam a formação balanceada de gametas $n=7$ e $n=8$ (Yonenaga-Yassuda, 1979) e que esse rearranjo não gera prejuízos para os portadores do mesmo.

Nossos dados mostram que indivíduos $2n=15$ têm o potencial de recuperar os três números diploides. Todavia, os cruzamentos com maior sucesso são aqueles envolvendo parentais $2n=15$ e $2n=14$ em detrimento de outras combinações (15×15 ou 15×16), o que promoveria aumento na frequência da forma $2n=14$ do que $2n=16$ onde ocorrem indivíduos com $2n=15$. Esse cenário é observado em Una (Bahia) e demais populações do clado Sul.

Outro dado importante aqui observado é que com o passar das gerações, nos cruzamentos em cativeiro, o sucesso reprodutivo de indivíduos intraclado e dos indivíduos com

$2n=15$ reduz gradualmente quanto maior o nível da geração F ($F_1 > F_2 > F_3$). Esses achados poderiam ser explicados pela endogamia imposta pelos cruzamentos intraclado em cativeiro. Em alguns casos, a endogamia pode levar a depressão endogâmica, caracterizada pela perda de vigor na descendência ocasionado pelo aparecimento de genes deletérios e letais em condição homozigota nos descendentes. Algumas má-formações ou doenças foram observadas nos exemplares gerados em cativeiro (Cap. 3), podendo ser reflexo de tal processo.

Em contrapartida, cruzamentos interclado mostraram sucesso reprodutivo igual ou maior ao apresentado entre indivíduos que participaram de cruzamentos intraclado, o que poderia ser explicado por uma recuperação da variabilidade genética nesses descendentes, conferindo-lhes maior sucesso reprodutivo.

Muito embora não haja indícios de isolamento reprodutivo completo entre indivíduos do Norte e Sul, observa-se um padrão favorecendo a fixação de $2n=14$ ao Sul, com tendência ao desaparecimento de $2n=16$. Ao mesmo tempo, nas populações do Norte há uma tendência à fixação do cariótipo com $2n=16$, e desaparecimento do $2n=14$. A fertilidade reduzida em exemplares $2n=15$ impõe um padrão de redução gradativa da frequência desses exemplares em condições naturais e consequente predomínio do cariótipo $2n=14$ ao Sul. Deste modo, o cariótipo tem desempenhado um papel fundamental na definição dos clados Norte e Sul.

Esse cenário já é observado quanto à frequência dos cariótipos no norte e sul. Fagundes *et al.* (1998) compilaram os dados da literatura e verificaram que no extremo Nordeste (Paraíba e Pernambuco) apenas a forma $2n=16$ foi registrada (Maia e Langguth, 1981; Rieger *et al.*, 1995; Oliveira e Langguth, 2004; Souza *et al.*, 2004). Para as populações da Bahia distribuídas entre as latitudes 12° - 16° S, houve registros de ocorrência das formas $2n=16$ (44,0%), 15 (50,5%) e 14 (5,5%) em simpatria em Una (Fagundes *et al.*, 1998). Mais de 10 anos depois, a frequência dos exemplares coletados variou, mostrando $2n=16$ (90,1%) e $2n=15$ (8,9%) em simpatria na localidade de Lençóis (Pereira e Geise, 2007), e $2n=14$ o cariótipo predominante (85,0%), seguido por $2n=15$ (10,0%) e $2n=16$ (5,0%) (vide ,Cap 2), similar à frequência dos cariótipos observados nas populações ao sul.

A forma $2n=14$ é exclusiva nas populações do Espírito Santo (ES) e predominante nas populações de Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ), contando com poucos registros de simpatria com $2n=16$ em MG (Manduca, 2008; Colombi, 2010) e com $2n=15$ no RJ (Yonenaga-Yassuda, 1979). Porém, dados atuais não registraram a ocorrência de $2n=15$ no norte e leste da distribuição do clado Sul (ES e RJ), ficando restrita às regiões a oeste e sul da

distribuição. Em São Paulo e Paraná tem-se registro das três formas cariotípicas em simpatria, porém com predominância de $2n=14$ (Fagundes *et al.*, 1998; Sbalqueiro e Nascimento, 1996).

A seleção natural pode agir de três maneiras sobre um caráter: seleção direcional, estabilizadora ou disruptiva (Ridley, 2006). Em um cenário de seleção direcional que favorecesse a forma $2n=14$ ao Sul em detrimento das formas $2n=15$ e $2n=16$, esse cariótipo, mais adaptado seria herdado aumentando sua frequência nas populações por conferir maior fitness aos indivíduos que tivessem $2n=14$. De forma análoga, o mesmo ocorreria com o cariótipo $2n=16$. Em um caso de seleção estabilizadora a forma $2n=15$ seria a mais frequente por ser a intermediária já que a seleção atuaria favorecendo a sua aptidão em detrimento das formas extremas ($2n=14$ e $2n=16$). Como a frequência de $2n=15$ não é a predominante nas populações do clado Norte ou clado Sul, verifica-se que esse não parece ser o tipo de seleção atuante em *A. cursor*. A seleção disruptiva ocorre quando ambos os extremos são favorecidos em relação aos tipos intermediários, e no caso de *A. cursor*, caracterizado pela heterose negativa da forma heterozigota $2n=15$, que é, de certa forma, evidenciada em *A. cursor*, dado a redução da fertilidade dos indivíduos $2n=15$.

Assim, considerando-se *A. cursor* como um todo pode-se verificar a ação da seleção disruptiva, imposta por um valor adaptativo distinto de cada cariótipo em cada região, com a fixação de $2n=16$ ao Norte e $2n=14$ ao Sul, muito embora dentro desses agrupamentos ainda ocorram, em baixa frequência, outras formas cariotípicas.

Tabela 5.6 – Parâmetros comparativos entre indivíduos com $2n=15$ e interclados de *A. cursor* e híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis*, e avaliação do *status* atual de cada uma dessas variantes.

Abordagem	HÍBRIDO (<i>A. cursor</i> x <i>A. montensis</i>)	<i>A. cursor</i>	
		$2n=15$ ($2n=14$ x $2n=16$)	INTERCLADO (clado Norte x clado Sul)
Cariotípica	1. $2n=19$ ou $2n=20$ – lotes haploides de ACU + ACU (Yonenaga <i>et al.</i> , 1975)	1. $2n=15$ – lotes haploides de $2n=14$ e $2n=16$ (Fagundes <i>et al.</i> , 1997a)	1. Sem distinção cariotípica (Nogueira e Fagundes, 2008; presente estudo – Cap. 1)
Molecular	1. Agrupados com os demais ACU ou AMO em análise de <i>Cit-b</i> , conforme genoma materno (Yonenaga <i>et al.</i> , em preparação)	1. Sem distinção em relação às formas homomórficas; presente nos clados Norte e Sul (Nogueira e Fagundes, 2008; presente estudo – Cap. 1)	1. Distinção baseada na distribuição geográfica das populações; divergência genética intraespecífica de 2,4 e 4,0% (Nogueira e Fagundes, 2008; presente estudo – Cap. 1)
Morfológica (considerando os parentais)	1. Distinção total – geometria morfométrica de crânio e mandíbula (Ástua <i>et al.</i> , 2015); 2. Distinção pouco expressiva: 1 de 5 caracteres externos analisados (presente estudo – Cap. 5) 3. Presença (ACU)/ausência (AMO) de vesícula biliar (Geise <i>et al.</i> , 2004); 4. Distinção parcial em análise de anatomia interna: 13 de 18 medidas (presente estudo – Cap. 5)	1. Sem registros; 2. Estudo em andamento 3. Presença de vesícula biliar (Geise <i>et al.</i> , 2004); 4. Estudo em andamento	1. Distinção parcial – morfometria craniana e variações corporais (Geise <i>et al.</i> , 2005) 2. Distinção pouco expressiva: 1 de 5 caracteres externos analisados (presente estudo – Cap. 5) 3. Presença de vesícula biliar (Geise <i>et al.</i> , 2004); 4. Distinção pouco expressiva em análise de anatomia interna: 3 de 18 medidas (presente estudo – Cap. 5)
Reprodutiva	1. Estéril (Yonenaga <i>et al.</i> , 1975; presente estudo – Cap.4) 2. Comportamento receptivo a outro híbrido e às espécies parentais (presente estudo – Cap.3) 3. Maior frequência de sucesso reprodutivo com a combinação ♀ $2n=24$ x ♂ $2n=16$ (presente estudo – Cap 4) 4. Ausência de espermatozoides no túbulo seminífero, que apresenta desorganização estrutural (Yonenaga <i>et al.</i> , 1975; presente estudo – Cap. 4 e 5)	1. Fertilidade reduzida (presente estudo – Cap. 2) 2. Comportamento agressivo fatal da mãe com os filhotes, filhotes entre si e dos filhotes para com a mãe (presente estudo – Cap.3) 3. Maior frequência de sucesso reprodutivo quando combinado a parental $2n=14$ (presente estudo – Cap. 2) 4. Sem registros (projeto em andamento)	1. Fértil (presente estudo – Cap. 2) 2. Comportamento receptivo aos exemplares dos clados Norte e Sul (comportamento agressivo em exemplares do clado Sul) 3. Maior frequência de sucesso reprodutivo quando descendentes inter cruzavam (presente estudo – Cap. 2) 4. Presença de espermatozoides no túbulo seminífero (presente estudo – Cap. 5)
CONCLUSÃO	HÍBRIDO	HÍBRIDO POTENCIAL especiação incipiente	NÃO É HÍBRIDO reflexo da variação cariotípica

Akodon cursor: diversificação e especiação

Akodon cursor tem sido um excelente modelo para estudos que requerem uma ampla discussão sobre a aplicação dos Conceitos de Espécie, dada suas particularidades geográficas, morfológicas, citogenéticas, filogenéticas e comportamentais.

Conceitos envolvendo isolamento reprodutivo se baseiam no fato de que espécies são delimitadas pelo comportamento reprodutivo dos organismos e não pela decisão de quem as classifica. Aqui estão incluídos os Conceitos Biológico (Dobzhansky, 1935) e Genotípico (Mallet, 1995). Segundo Mayr espécies biológicas “são grupos de populações naturais, efetiva ou potencialmente intercruzantes, que são isolados reprodutivamente de outros grupos com as mesmas características” e para Mallet espécies “são agrupamentos de entidades biológicas, monotípicas ou politípicas, identificáveis pela morfologia e/ou genética, formando grupo de indivíduos que tem pouco ou nenhum intermediário quando em contato”.

Dentre os pontos positivos do conceito Biológico de Espécies, a espécie é tratada como uma unidade real e sua existência pode ser testada através de observação/experimentação. Assim, a realização de cruzamentos experimentais em *A. cursor* entre indivíduos real e/ou potencialmente intercruzantes permite considerar que: 1) a obtenção de exemplares interclado com capacidade reprodutiva normal é indicativo de que representantes dos clados Norte e Sul pertencem a uma única espécie; 2) exemplares $2n=14$ e $2n=16$ são intercruzantes, mas descendentes deles gerados ($2n=15$) apresentam capacidade reprodutiva reduzida, principalmente quando intercruzam entre si ou com exemplares com $2n=16$.

Assim, a fixação preferencial da forma $2n=16$ ao norte e da $2n=14$ ao sul sugere um mecanismo incipiente de isolamento reprodutivo entre elas, resultando em processo especiativo. No entanto, no presente momento exemplares com $2n=14$, 15 e 16 ainda podem ser considerados como variantes da mesma espécie, à luz do conceito Biológico de Espécie.

Considerando o conceito Genotípico, verifica-se que embora as formas extremas (Norte e Sul, $2n=14$ e $2n=16$) possam ser identificáveis pela genética, eles ainda são capazes de gerar intermediários, mas com níveis altos de hibridização, o que vai de encontro à premissa do Conceito e sustenta a aceitação de *A. cursor* como uma única espécie.

Definições de filoespécies perpassam por conceitos diferentes desenvolvidos a partir do advento das análises filogenéticas. Dentre os conceitos propostos destacam-se Hennigiano (Hennig, 1966, 1950), Autapomórfico (Nelson e Platnick, 1981; Wheeler e Platnick, 2000),

Diagnóstico (Eldredge and Cracraft 1980; Cracraft, 1983) e Monofilético (Mishler and Brandon 1987; Mishler e Theriot, 2000).

Segundo o conceito Hennigiano espécie é uma “comunidade toco genética que surge quando uma espécie é dissolvida em duas novas espécies-filhas, na qual a espécie ancestral (comum às espécies-filhas) se extingue”. Trata-se de aplicar ao Conceito Biológico uma perspectiva temporal já que assume que espécies só podem ser interpretadas genealogicamente e que uma descontinuidade reprodutiva entre linhagens corresponde a uma descontinuidade entre espécies distintas. No presente estudo, nenhum dos casos observados em *A. cursor* se aplica, muito embora o cariótipo intermediário possa vir a assumir uma condição de esterilidade capaz de levar ao isolamento as formas homomórficas $2n=14$ e $2n=16$.

Para o conceito Autapomórfico espécie é “a menor agregação de populações (sexuais) ou linhagens (assexuais) diagnosticadas por uma combinação única de estados de caráter”. Por considerar caracteres apomórficos e plesiomórficos não se adequa ao monofiletismo, levando em conta a teoria cladística mas não o seu método. Por reconhecer as espécies *a priori* a partir de uma lista de caracteres, tende a ser considerado falho na identificação de espécies ainda em suas premissas e, portanto, pouco contribui na discussão do que seria uma espécie válida em *A. cursor*.

Espécie no conceito Diagnóstico é “o menor agrupamento diagnosticável de organismos individuais nos quais existe um padrão de ancestralidade e descendência, que em conjunto passam a constituir unidades diagnósticas basais”. Esse conceito apresenta como ponto negativo a dificuldade de se estabelecer limites mínimo e máximo de diagnose entre os indivíduos podendo levar a uma arbitrariedade da escolha. Por exemplo, poderia aqui considerar que, dentro do clado Norte, populações da Paraíba/Pernambuco que apresentam $2n=16$ como cariótipo exclusivo fossem diagnosticadas como uma espécie, ou ainda, sob uma segunda ótica que todo o clado Norte fosse uma espécie já que foi recuperado como monofilético (Cap. 1).

O conceito Monofilético preconiza que espécie é “o táxon menos inclusivo reconhecido em uma classificação filogenética formal”. Ora, para aceitação dessa definição seria necessário um critério adicional de classificação já que a monofilia se aplica para qualquer categoria taxonômica. Logo, como identificar qual agrupamento monofilético seria o correspondente à uma espécie seria uma questão a investigar. No caso de *A. cursor*, por exemplo, poderia se

assumir como espécie os agrupamentos Norte e Sul como espécies distintas, ou ainda todos os exemplares analisados em conjunto como uma só espécie (Cap. 2). Assim, usando-se esse conceito como base, a interpretação pode ser diferente conforme quem a analisa.

Conceitos evolutivos reconhecem que um táxon corresponde a um segmento indivisível de uma árvore evolutiva, sendo as linhagens o alvo da abordagem desenvolvida por Simpson (1961), Wiley (1978) e De Queiroz (1998), dentre outros, em seus respectivos conceitos.

Para Simpson espécie é “uma linhagem que se desenvolve com destino evolutivo unificado e tendências próprias”, enquanto para Wiley é “uma linhagem de populações ancestral-descendente que mantém a sua identidade de outras linhagens e que tem independência evolutiva e tendências históricas”. No primeiro caso o conceito não trás consigo um critério para aplicabilidade, dificultando a classificação das espécies, enquanto o segundo conceito também não apresenta método próprio, dependendo de outras ciências para reconhecer o evento especiativo capaz de distinguir as espécies. Assim, dependendo do método, pode-se chegar a resultados distintos do que seria uma espécie válida. Por exemplo, se fossem utilizados apenas dados cariotípicos desvinculados da variável geográfica, poder-se-ia assumir que *A. cursor* é uma espécie com amplo polimorfismo cariotípico e de ampla distribuição geográfica. No entanto, aliando o componente geográfico e os resultados de cruzamentos experimentais entre essas formas verifica-se que a seleção natural age de forma distinta em relação aos cariótipos, o que pode vir a ser fonte de isolamento reprodutivo entre as populações Norte e Sul.

No conceito de Linhagem Geral proposto por De Queiroz ele considera espécies “uma linhagem de metapopulações evoluindo separadamente”, sendo linhagem uma série de ancestrais-descendentes e metapopulação equivalente a população inclusiva composta de subpopulações conectadas. O autor se destaca nesse cenário pois diferencia Conceito de Espécie (linhagens de metapopulações evoluindo separadamente) dos critérios operacionais (linhas de evidência) que são utilizados para sua aplicação empírica (De Queiroz, 2007).

Assim, por exemplo, se o conceito a se testar é o morfológico, diferenças estabelecidas a partir de morfometria geométrica (Ástua *et al.*, 2015) poderiam se alinhar em SC7 (**Figura 5.7a**), por exemplo, ponto em que a distinção de duas espécies como *A. cursor* e *A. montensis*, que se divergiram a cerca de 1,75 Ma (Coyner *et al.*, 2013), seria possível. No entanto, esse mesmo caráter se analisado dentro de *A. cursor* poderia não ser tão eficaz, estando

compreendido entre os pontos SC2 e SC3, por exemplo, já que o tempo de divergência entre os clados Norte e Sul é estimado em aproximadamente 1Ma (Smith e Patton, 2007). Porém, se em um intervalo de diversificação semelhante ao recuperado entre *A. cursor* e *A. montensis* fosse possível notar para *A. cursor* com a completa distinção dos clados Norte e Sul, esses dois clados poderiam ser reconhecidos como espécies distintas.

Considerando todo o histórico entre essas espécies-irmãs de diferenciação cariotípica e molecular, mas de diferenciação sutil do ponto de vista morfológico e reprodutivo (formação de híbridos, embora estéreis) não é improvável um cenário em que *A. cursor* esteja passando por um processo especiativo, ainda insipiente, carecendo de pelo menos mais 1 Ma para se consolidar. Essa premissa ainda é reforçada pelo fato de que, em um intervalo de tempo extremamente reduzido, considerando a escala geológica, já se pode observar a alteração das frequências cariotípicas em populações de Una, BA. Considerando que o cariótipo pode estar atuando como deflagrador e mantenedor da diferenciação em *A. cursor* (**Figura 5.7b** – ponto E) pode-se, de fato, vir a haver um acúmulo de diferenças capazes de se considerar o surgimento de duas novas espécies a partir dos agrupamentos Norte e Sul.

Em outra interpretação, poder-se-ia imaginar que dentro de *A. cursor*, análises moleculares consistem em critérios alinhados com SC4, onde já é possível identificar a distinção entre os clados Norte e Sul, mas a divergência genética encontrada, apesar de ser alta, ainda não pode ser interpretada como interespecífica (**Figura 5.7a**).

No processo de especiação alopátrica o deflagrador da diversificação é o surgimento de uma barreira geográfica (soerguimento de montanhas, fragmentação do hábitat, mudança de curso de um rio, etc.) causando o isolamento das populações, que passam a sofrer pressões seletivas distintas (seleção estabilizadora) vindo a desenvolver características novas (molecular, morfológica, anatômica, cariotípica) que atuaria como barreira intrínseca de isolamento reprodutivo (Mayr, 1942, 1963). Esse tipo de especiação estaria atuando sobre as populações isoladas da Paraíba e Pernambuco, que embora ainda consideradas do clado Norte, não apresentam contato com as demais populações, sendo separadas por extensas áreas abertas. Ali atuariam pressões seletivas supostamente distintas das demais que ainda mantem contato entre si.

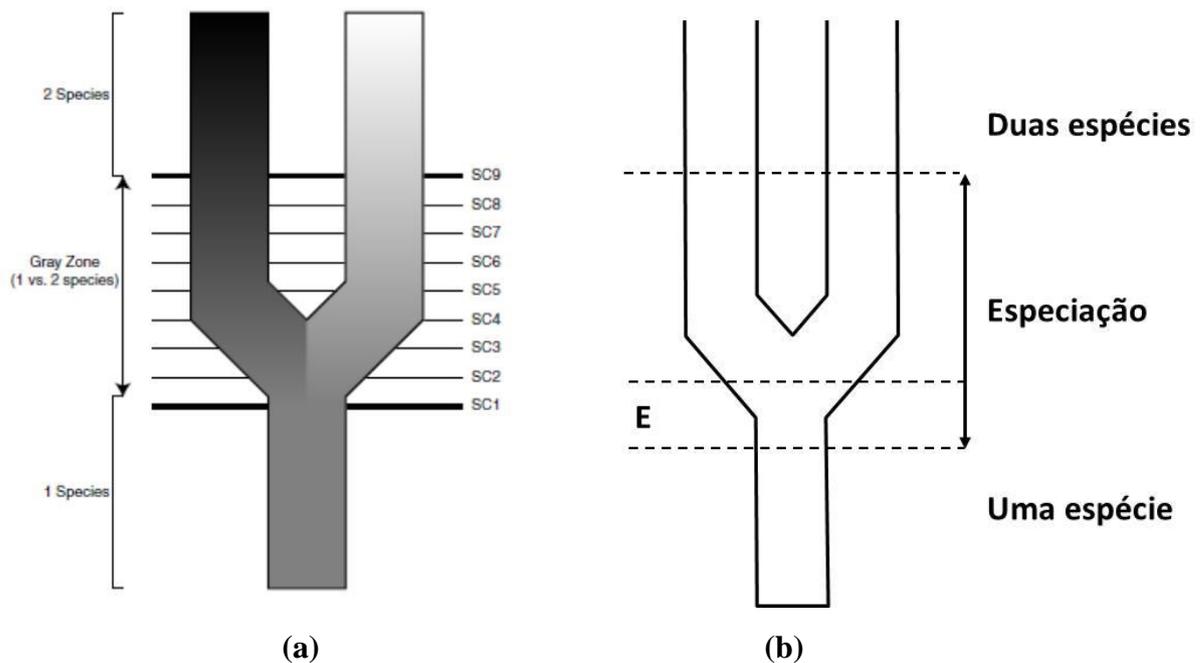


Figura 5.7 – Diagramas representativos de linhagens evolutivas **(a)** adaptação de De Queiroz, 2007. Gradação em escalas de cinza representam as linhagens filhas divergindo ao longo do tempo e as linhas horizontais SC (critérios de espécie) 1 a 9 representam o tempo em que cada forma adquirem propriedades diferentes (ou seja, quando se tornam feneticamente distinguíveis, diagnosticáveis, reciprocamente monofiléticas, reprodutivamente incompatíveis, ecologicamente distintas, etc... conforme conceito adotado). **(b)** eventos deflagradores (E) do processo de especiação (alopátrica, simpátrica e parapátrica).

A especiação simpátrica é o processo de surgimento de novas espécies que acontece dentro de populações espacialmente contíguas (Smith, 1962, 1978). Para que a especiação seja considerada simpátrica quatro critérios precisam ser atendidos para que ela de fato ocorra: 1) as novas espécies devem se distribuir por áreas sobrepostas; 2) a especiação deve ser completa (conceito biológico e evolutivo de espécie); 3) devem ser, necessariamente, espécies-irmãs ou monofiléticas; 4) a história evolutiva, biogeográfica, deve evidenciar que a especiação alopátrica é improvável (Bolnick and Fitzpatrick, 2007). Dois tipos de especiação simpátrica que atendem a esses critérios tem sido observados na natureza, seleção disruptiva e alterações

cromossômicas. O primeiro caso ocorre quando fortes pressões seletivas fazem com que uma determinada população se adapte a dois ou mais regimes ambientais diferentes (ou nichos), gerando isolamento progressivo das subpopulações e, por fim, resultando em especiação (Ruefler *et al.*, 2006), como por exemplos, radiação adaptativa em ilhas oceânicas e lagos isolados.

A maioria dos modelos de especiação simpátrica supõe que a seleção natural primeiro estabelece um polimorfismo, para depois favorecer o isolamento pré-zigótico entre as formas polimórficas (Ridley, 2006). Poderia ser esse o caso do polimorfismo cariotípico em *A. cursor*. Estudos apontaram que a forma $2n=16$ com pares 2 e 4 submetacentrôicos e metacêntricos é a condição ancestral da espécie (Fagundes *et al.*, 2007a), que teria, em um processo de radiação adaptativa, se espalhado por toda a costa leste brasileira. A partir desse ponto, rearranjos cromossômicos responsáveis pelo surgimento da forma $2n=15$ e das condições heteromórficas dos pares 2 e 4 poderiam ter surgido em populações distintas ao longo da área de distribuição. Essas formas heterozigotas, cruzando entre si, recuperariam a forma $2n=14$, com pares 2, 4 e 6 acrocêntricos, dando origem ao polimorfismo hoje encontrado em *A. cursor*. O menor sucesso reprodutivo das formas $2n=15 \times 2n=16$ beneficia a formação e fixação do $2n=14$ ao sul. Por outro lado, nossos estudos mostraram que a variação cariotípica que antes parecia ser parte de um todo já tende a sofrer pressões seletivas levando a fixação de formas cariotípicas diferentes nos clados Norte e Sul.

De uma particularidade da especiação simpátrica, surge a definição de especiação estasipátrica, na qual os rearranjos cromossômicos seriam os responsáveis por desempenhar um papel fundamental no processo de isolamento reprodutivo entre as populações (White, 1978). Nesse sentido, rearranjos cromossômicos podem agir como mecanismo de isolamento pós-cópula, prevenindo a formação de híbridos ou comprometendo a fertilidade ou viabilidade dos mesmos. Nossos dados revelam a redução de fertilidade em exemplares $2n=15$ e um certo grau de isolamento reprodutivo pré-zigótico entre as formas $2n=15$ e $2n=16$.

Havendo rearranjos cromossômicos, grande bloco de genes parece protegido de recombinação, caracterizando “ilhas genômicas de diferenciação” (Nosil *et al.*, 2009), que tendem a diminuir a ocorrência de fluxo entre esses genes, consistindo em importante barreira (Kawakami *et al.*, 2011).

Os dados de anatomia e morfologia também apontam para essa distinção geográfica (presente estudo, Geise *et al.* 2005), muito embora não se possa afirmar que haja distinção morfológica ou anatômica relacionada ao cariótipo. O mesmo não ocorre nas análises de histologia de testículo, que revelaram padrão reprodutivo normalizado em descendentes interclado, mas comprometimento e esterilidade em exemplares $2n=15$ (Yonenaga *et al.*, 1975). Essa esterilidade também é verificada em fêmeas, que apenas em combinações intraclado com machos $2n=14$ foram capazes de gerar descendentes, revelando um padrão de isolamento reprodutivo associado à condição heterozigota ainda mais eficiente que o que ocorre nos machos, que ainda mantém um padrão de sucesso reprodutivo mais elevado e que permitiu a formação descendentes com fêmeas $2n=14$ de clado distinto.

Segundo White (1978), a estasipatria por si somente é suficiente para favorecer a diferenciação de espécies a partir dos rearranjos observados. No entanto, estudos posteriores revelaram a dificuldade de rearranjos distintos serem fixados e virem a ser agentes de especiação em simpatria, sendo necessário o surgimento de barreiras geográficas no processo de diversificação.

Em *A. cursor* observou-se um sinal genético de expansão populacional coincidente com as áreas limites das quebra geográfica (sul Bahia em direção ao sul), reveladas pelas análises populacionais de DNA mitocondrial (Cap 1). Os testes de Neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu) e os testes de distribuição *mismatch* detectaram sinais de crescimento populacional nas populações do clado Sul. Considerando o tempo de divergência entre os dois clados de *A. cursor*, estimado em 1.0 Ma (Smith e Patton, 2007), essas mudanças demográficas podem coincidir com os ciclos glacial-interglacial do Pleistoceno.

Nesse período, segundo a proposta de Leite *et al.* (2016) teria havido uma expansão de ambientes favoráveis ao desenvolvimento de florestas coincidente com a distribuição da plataforma continental, sendo acompanhado por expansão populacional de espécies de marsupiais e roedores. Como a plataforma continental é mais extensa (a partir da costa) entre as latitudes 18-26°S (coincidente com a área ocupada por populações do clado Sul), pode-se considerar que as populações do clado Sul tiveram condições ambientais para a expansão. Nesse processo poderia ter havido o surgimento de $2n=15$ (ou $2n=14$) e o favorecimento da fixação do cariótipo $2n=14$, atualmente o único encontrado em populações do norte do clado sul, a leste (Rio de Janeiro e Espírito Santo).

Com o final da glaciação e imersão da plataforma continental indivíduos com o rearranjo em homozigose ($2n=14$) estariam em contato mais recorrente com sua espécie-irmã *A. montensis*, da qual apresentaria, nesse cenário, maior divergência, comprovada em nossos estudos pela maior dificuldade de se gerar híbridos na combinação $2n=24 \times 2n=14$ quando comparado a $2n=24 \times 2n=16$, muito embora haja predominância da forma $2n=14$ ao sul, em área de ocupação de *A. montensis*.

Como a expansão populacional ocorre ao sul, se nessas populações tiverem ocorrido os rearranjos que deram origem às formas $2n=15$ e $2n=14$, pode-se imaginar o porquê dessas formas cariotípicas serem menos frequentes ao Norte, com exceção de Una, localizada no sul da Bahia, que possivelmente esteve em contato secundário com essas populações quando da expansão pela plataforma continental e interligação do leste pelas terras baixas entre Espírito Santo e Bahia. No sul, a condição $2n=15$ ainda apresenta frequência mais elevada pois tem frequência de sucesso reprodutivo elevada quando em contato com $2n=14$ (Cap. 2).

Por fim, *A. cursor* é uma espécie modelo com características complexas e intrigantes para estudos evolutivos, trazendo uma ampla discussão sobre os processos determinantes dos padrões de diversificação na Mata Atlântica e sobre as discussões intermináveis sobre a aplicabilidade dos conceitos de espécie. O uso de critérios morfológicos e de monofilia recíproca apontam distinção Norte e Sul, no entanto, sem sinais de isolamento reprodutivo entre os intermediários (interclado). Entre $2n=14$ e $2n=16$ verifica-se comprometimento reprodutivo do intermediário ($2n=15$), indicando um processo incipiente de especiação estasipátrica, com o favorecimento de fixação da forma $2n=16$ ao Norte e de $2n=14$ ao Sul da distribuição atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo NP (2013) Genômica comparativa de roedores Akodontinos *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Necromys lasiurus* (Cricetidae: Rodentia). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

- Ástua D, Bandeira I and Geise L (2015) Cranial morphometric analyses of the cryptic rodent species *Akodon cursor* and *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae). *Oecologia Australis* 19(1):143-157.
- Balarine MK (2013) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Bolnick D and Fitzpatrick BM (2007) Sympatric speciation? Models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 1(38):459-487.
- Carnaval AC and Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35(7):1187-1201.
- Castro EC (1989) Ocorrência e caracterização cromossômica de roedores Akodontinos do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Christoff AU (1997) Contribuição à sistemática das espécies do gênero *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Colombi VH (2010) Diversidade cariotípica em *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae). Monografia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):785-789.
- Cordeiro-Júnior DA (2009) Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das Famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça – MG. Tese de Doutorado; Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

- Coyner BS, Braum JK, Mares MA and Van Den Bussche RA (2013) Taxonomic validity of species groups in the genus *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). *Zoologica Scripta* 42(4):335-350.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. In: *Current Ornithology*. Ed. By Johnston RF. New York: Plenum Press.
- De Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In: *Endless forms: species and speciation*. Ed by Howards DJ and Berlocher SH. New York: Oxford University Press.
- De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species delimitation. *Systematic Biology* 56(6):879-886.
- Dobzhansky T (1935) A critique of the species concept in biology. *Philosophy of Science* 2:344-355.
- Elderedge N and Cracraft J (1980) *Phylogenetic patterns and the evolutionary process: method and theory in comparative biology*. New York: Columbia University Press.
- Fagundes V (1993) Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Fagundes V (1997) Contribuição da Citogenética Molecular no entendimento da Evolução Cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AM and Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). *Chromosome Research* 5:228-232.
- Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J and Yonenaga-Yassuda Y (1997b) ZOO-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 78:224-228.

- Fagundes V and 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 and Nogueira CDA (2007) The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents of the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini). *Genetics and Molecular Biology* 30(3): 698-701.
- Finotti R, Santos MM and Cerqueira R (2012) Diet, digestive tract gross anatomy and morphometry of *Akodon cursor* Winge (Sigmodontinae): relations between nutritional content, diet composition and digestive organs. *Mammalia* 76: 81-89.
- Geise L, Canavez FC and Seuánez HN (1998) Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from southeastern Brazil. *Journal of Heredity* 89(2):158-163.
- Geise L, Smith MF and Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82(1):92-101.
- Geise L, Weksler M and Bonvicino CR (2004) Presence or absence of gall bladder in some Akodontini rodents (Muridae, Sigmodontinae). *Mammalian Biology* 69(3):210-214.
- Geise L, Moraes DA and Silva HS (2005) Morphometric differentiation and distributional notes of three species of *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae, Akodontini) in the Atlantic coastal area of Brazil. *Arquivos do Museu Nacional* 63(1):63-74.
- Gonçalves PR, Myers P, Vilela JF and Oliveira JA (2007) Systematics of species of the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern Brazil and implications for the biogeography of the *Campos de Altitude*. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 197:1-24.
- Hennig W (1950) *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*. Berlin: Aufbau.
- Hennig W (1966) *Phylogenetic Systematics*. Urbana: University of Illinois Press.
- Kasahara S and Yonenaga-Yassuda Y (1983) Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 48:569-576.

- Kawakami T Butlin RK and Cooper SJB (2011) Chromosomal Speciation Revisited: Modes of Diversification in Australian Morabine Grasshoppers (*Vandiemenella, viatica* Species Group) *Insects* 2(1): 49–61.
- King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* 59:1-6.
- Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M and Pardini R (2016) Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(4):1008-1013.
- Maia V and Langguth A (1981) New karyotypes of Brazilian akodont rodents with notes on taxonomy. *Sonderdruck-Zeitschrift fur Saugetierkunde* 46: 241-289.
- Mallet J. (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, v.10: 294–99.
- Manduca EG (2008) Estudo das variações morfológica, craniana e citogenética em *Akodon cursor* (Rodentia: Sigmodontinae) no Estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Mayr E. (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. New York: Columbia University Press.
- Mayr R (1963) *Animal species and evolution*. Cambridge MA: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Mishler BD and Brandon RN (1987) Individuality, pluralismo, and the Phylogenetic Species Concept. *Biology and Philosophy* 2:397-414.
- Mishler BD and Theriot RC (2000) The phylogenetic species concept (*sensu* Mishler and Theriot): Monophyly, apomorphy, and phylogenetic concepts; In *Species concepts and phylogenetic theory: A debate*. Ed by Wheeler QD and Meier R. New York: Columbia University Press.

- Nelson GJ and Platnick NI (1981) Systematics and biogeography: cladistics and vicariance. New York: Columbia University Press.
- Nosil P, Funk DJ and Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* 18:375–402.
- Nogueira CDA (2005) Uma análise filogeográfico das espécies do ‘complexo *Akodon cursor*’ (Rodentia, Sigmodontinae) utilizando dados moleculares e cariotípicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- Nogueira CDA and Fagundes V (2008) *Akodon cursor* Winge, 1887 (Rodentia: Sigmodontinae): one or two species? New evidences based on molecular data. *Zootaxa* 1768:41-51.
- Oliveira FF and Langguth A (2004) Pequenos mamíferos (Didelphimorphia e Rodentia) de Paraíba e Pernambuco, Brasil. *Revista Nordestina de Biologia* 18(2):19-86.
- Pereira LG and Geise L (2007) Karyotype composition of some rodents and marsupials from Chapada Diamantina (Bahia, Brasil). *Brazilian Journal of Biology* 67(3):509-518.
- Ridley M (2006) *Evolução*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- Rieger TT, Langguth A and Weimer TA (1995) Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* Species Group (Rodentia-Cricetidae). *Biochemical Genetics* 33:283-295.
- Rissino JD (2012) Análise de células-tronco adultas (CTA) em cultura de células de tecido epithelial de pequenos roedores (Rodentia-Stricognathi-Sciurognathi). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Ruefler C, Van Dooren TJM, Leimar O and Abrams PA (2006) Disruptive selection and then what? *Trends in Ecology and Evolution* 21(5):238-245.
- Simpson GG (1961) Principles of animal taxonomy. New York: Columbia University Press.
- Sbalqueiro IJ and Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 19(4):565-569.

- Smith JM (1962) Disruptive selection, polymorphism and sympatric speciation. *Nature* 7(4836):60-62.
- Smith JM (1978) Optimization theory in evolution. *Annual Review of Ecological System* 9:31-56.
- Smith MF and Patton JL (2007) Molecular Phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. In: Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J and Patton JL (eds) *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Publications in Zoology, pp. 827-858.
- Souza MAN, Langguth A and Gimenez EA (2004) Mamíferos dos Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba pp 229-254 in *Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação* (Porto KC, Cabral JJP and Tabarelli M eds). Série Biodiversidade 9. Ed Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Talamoni AS, Couto D, Cordeiro-Junior DA and Diniz FM (2008) Diet of some species of Neotropical small mammals. *Mammalian Biology* 73(5):337-341.
- Valdez L and D'Elia G (2013) Differentiation in the Atlantic Forest: phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval-Moritz modelo of Pleistocene refugia. *Journal of Mammalogy* 94(4):911-922.
- Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y and Ferguson-Smith MA (2009) Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosomes painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17:1063-1078.
- Wheeler QD and Platnick NI (2000) The Phylogenetic Species Concept (sensu Wheeler and Platnick) In: *Species concepts and phylogenetic theory: A debate*. New York: Columbia University Press.
- White MJD (1978) *Modes of Speciation*. W. H. Freeman and Company, São Francisco.
- Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27:17-26.

- Winge H (1987) Jordfundne og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien: med udsigt over gnavernes indbyrdes slægtskab. *E Museo Lundii* 1(3):1-200.
- Yazbeck GM, Brandão RL, Cunha HM and Paglia AP (2011) Detection of two morphologically cryptic species from the *cursor* complex (*Akodon* spp; Rodentia, Cricetidae) through the use of RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 10(4):2881-2892.
- Yonenaga Y, Kasahara S, Almeida EJC and Peracchi AL (1975) Chromosome banding patterns in *Akodon arviculoides* (2n=14), *Akodon* sp. (2n=24 and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 15:388-399.
- Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 23:241-249.
- Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S, L'Abbate M and Souza MJ (1992) Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females. *Cytogenetics and Cell Genetics* 35:143-147.

CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados alcançados, a variação e diversificação em *A. cursor* pode ser assim compreendida:

- 1) Dados moleculares e de morfologia/antatomia permitem identificar a estruturação das populações em clados Norte e Sul, com querbra filogeográfica entre as latitudes 16-18°S (norte do Espírito Santo e sul da Bahia), coincidente com o Vale do Jequitinhonha e sofrendo influencia da altitude, do rio e da vegetação predominante.
- 2) A diversificação encontrada não está relacionada a cariótipos exclusivos, muito embora haja predominância da forma $2n=16$ ao Norte e $2n=14$ ao Sul.
- 3) Não há isolamento reprodutivo entre representantes dos clados Norte e Sul, unidos em cativeiro, e os descendentes gerados (interclado) apresentam sucesso reprodutivo alto.
- 4) Indivíduos com $2n=15$ apresentam redução de fertilidade, principalmente quando a fêmea é portadora do rearranjo e quando combinado com parental $2n=16$ e $2n=15$. Combinações $2n=14 \times 2n=15$ são que apresentaram maior sucesso reprodutivo. Assim, indivíduos heterozigotos embora sejam férteis, desempenham papel incipiente de híbrido entre as formas homomórficas, $2n=14$ e $2n=16$.
- 5) Híbridos entre *A. cursor* e *A. montensis* são estéreis e mais facilmente gerados a partir da combinação fêmea $2n=24$ e macho $2n=16$, muito embora a introgressão seja bidirecional. Logo, esses híbridos diferem, quanto a fertilidade, dos supostos híbridos de *A. cursor* caracterizados pela condição geográfica (interclado) e cariotípica ($2n=15$) intermediária.

Assim, o uso de critérios morfológicos e de monofilia recíproca apontam distinção Norte e Sul, no entanto, sem sinais de isolamento reprodutivo. Entre $2n=14$ e $2n=16$ verifica-se comprometimento reprodutivo do intermediário ($2n=15$), indicando um processo incipiente de especiação estasipátrica, com o favorecimento de fixação da forma $2n=16$ ao Norte e de $2n=14$ ao Sul da distribuição atual.

ANEXOS

ANEXO 1

Espécimes de *A. cursor* utilizados nos estudos moleculares a partir sequências do gene Citocromo *b* e Citocromo oxidase I. Em ordem: Estado brasileiro (maiúsculo, em negrito), número total de espécimes amostrados para aquele Estado (entre parênteses, em negrito), município (em negrito, número corresponde às localidades amostradas na Figura 1), localidade (em itálico), coordenadas geográficas (entre parênteses), número de identificação dos espécimes.

PARAIBA (n=8) - 1. Cruz do Espírito Santo (-35.07, -7.12): PHA554, 555, 556, 557, 560, 563, 571, 572.

PERNAMBUCO (n=19) - 2. Camaragibe (-34.98, -7.97): PHA257, 266, 270, 272, 277, 278, 292, 294, 295, 296, 307, 402, 403, 405, 406, 642, 643. **3. Jaqueira, RPPN Frei Caneca** (-35.83, -8.72): PHA 396, 414.

BAHIA (n=71) - 4. Andaraí, Fazenda Santa Rita (-41,26, -12,80): CTA1156, 1157. **5. Cairu, Fazenda Subauna** (-39.04, -13.49): RM168, 173. **6. Ilhéus, Fazenda Santa Maria** (-39.17, -14.70): LG173. **7. Lençóis, Chapada Diamantina, Remanso** (-41.35, -12.60): CD 01, 05, 25, 27, 30, 62, 66, 94, 102, 103, 110, 124, *Chapada Diamantina, Morro da Torre da Telebahia* (-41.40, -12.55): 137, 141, 157, 164, 167, 178, 219, 242. **8. Pau Brasil, Fazenda Água Santa** (-39,37, -15,45): LG190, 191, 192, 196, 200. **9. Porto Seguro, PARNA do Paul Brasil** (-45.26, -16.51): RM220. **10. Teixeira de Freitas, Fazenda Alcoprado** (-39.74, -17.54): RM205, 208. **11. Una** (-39.07, -15.30): CIT818, 858, 870, 878, 879, 880, 881, 883, 884, 887, 921, 926, 927, 929, 930, 931, 933, 934, 1020, 1021, 1022, 1023, LGA3991, 4022, 4029, 4031; *Fazenda Jueirana*: CC13, RM50, 54, 56, 61, 70, 74, 81, 87, 95, 98; *Estação Experimental Lemos Maia* (-39,00, -15,35): CTA958.

MINAS GERAIS (n=63) - 12. Araponga, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (-42.45, -20.72): GL123. **13. Caeté** (-43.67, -19.90): BM145. **14. Capitão Andrade** (-41.86, -19.07): LBCE5552. **15. Conceição do Mato Dentro** (-43,43, -19,03): BG17, DG155. **16. Diamantina, Campo Triste, PARNA Sempre Vivas** (-43.75, -18.09): DG125, MCN-M2797. **17. Fervedouro** (-42.28, -20.73): BRG12, 13, 17, 111, 123, 124, 128, 134, CTA897, 1068, 1071. **18. Grão Mogol** (-42.81, -16.62): MCN-M2601. **19. Itabira, Ipoema** (-43.27, -19.61): AK1413, DG188, 199, EC23, 31, KRTP38. **20. Joáima, Fazenda AngaPehy** (-41.25, -16.72): LG474, 477, 485, 497, 500, 501, 503, 506, 521, 524, 526, 527. **21. José Gonçalves de Minas, entorno UHE Irapé** (-42,81, -16,62) : DG161. **22. Leme do Prado** (-42.69, -

17.08): MCN-M1969. **23. Marliéria**, *Parque Estadual do Rio Doce* (-42.65, -19.72): CTA950, 956, 1120, 1124, 1126, 1134. **24. Simão Pereira**, *Sítio Maglândia* (-43.32, -21.97): BPR07, LG20, 29, 55, 56, 63. **25. Simonésia**, *Estação Biológica Mata do Sossego* (-42.00, -20.13): CTA977. **26. Turmalina**, *Estação Ecológica Acauã* (-42.77, -17.13): CTA937, 944, 1110, 1114. **27. Viçosa**, *Mata do Paraíso, Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental da Universidade Federal de Viçosa* (-42.88, -20.75): VII2, 13, 19, 21; GL155, 160, 161. **28. Virginópolis** (-42.70, -18.82): AK1440.

ESPÍRITO SANTO (n=101) - **29. Águia Branca**, *Fazenda Zequinha Manduca* (-40.82, -18.87): LGA1517, 1527, 1546, 1550, 1553, 1554. **30. Cariacica**, *Reserva Biológica de Duas Bocas* (-40.42, -20.27): LGA325, 327, 328, 2198. **31. Castelo**, *Parque Estadual Forno Grande* (-41.18, -20.60): LGA934, 935, 936, 993, 995, 996. **32. Domingos Martins**, *Parque Estadual de Pedra Azul* (-40.67, -20.37): LGA956, 957, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 976, 983, 1759. **33. Governador Lindenberg** (-40.47, -19.27): LGA1121, 1123, 1125. **34. Ibitirama**, *Parque Nacional do Caparaó, Posto Santa Marta* (-41.72, -20.48): LGA1187, 1193, 1203, 1206, 1207, 1211, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1231, 1234. **35. Irupí**, *Parque Nacional do Caparaó, Posto Pedra Roxa* (-42.75, -20.37): LGA1556, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1579, 1580, 1583, 1584, 1586. **36. Santa Teresa**, *Estação Biológica Santa Lúcia* (-40.60, -19.92): LGA37, 38, 42, 50, 159, 2339. **37. Sooretama**, *Reserva Biológica de Sooretama* (-40.00, -18.78): LGA 3915. **38. Viana** (-40.45, -20.38): LGA1509, 1510, 1764, 1765, 1767, 1827, 1829, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1986, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1994, 1997, 1999, 2000, 2001, 2004, 2005, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2143, 2144.

RIO DE JANEIRO (n=108) - **39. Angra dos Reis**, *Aldeia Sapucaí, Bracuí* (-44.38, -22.88): AAC6, 19, LBCE1315, 1316, 1318; *Mambucada* (-44.51, -23.02): MAM7. **40. Cachoeiras de Macacu**, *Reserva de Guapiaçu* (-42.73, -22.42): HGB-REGUA1, 2, 17; *Propriedade Sr. Edimar* (-42.83, -22.53): FI39; *Fragmento 8* (-42.80, -22.52): FS6-9, 6-13, 6-37; *Sítio Rosimery* (-42.87, -22.48): FS11-12, 11-30, 11-40, 11-47, FS14-5, 14-39, 14-41, 14-43; *Fragmento 9* (-42.78, -22.52): FS12-2, 12-14, 12-32, FS16-7, 16-25, 16-40; *Fazenda Pica Pau Amarelo* (-42.75, -22.52): FS13-15, FS17-17, 17-20, 17-44, 17-47; *Sítio Quatro Irmãos, Bairro Quizamba* (-42.85, -22.60): FS16-37. **41. Cambuci**, *Fazenda Samburá* (-41.87, -21.48): RB-M-3-08, 3-19, 3-35, 3-54, 3-55, 3-67, 3-68. **42. Guapimirim**, *Fazenda Chorona* (-42.95, -22.55): FS4-3, 4-4, 4-6, 4-8, 4-20, 4-25, 4-31, 4-33, 4-41, 4-43, 4-45, 4-61, 4-81; *Fazendas Consorciadas* (-42.90, -22.55): FS5-22, 5-36, 5-58, 5-69, 8-79, 17-1, 17-08, 17-13, 17-14; *Fazenda Iguaçú* (-42.88, -22.52): FS5-57, 5-59; *Centro de Primatologia da FEEMA* (-42.97, -22.63): HGB405. **43. Itatiaia**, *Parque Nacional de Itatiaia* (-44.60, -22.45): HGB-CFVC1, 2, 3, 6; *Piscina Maromba* (-44.62, -22.43): HGBDB21, 22, 23. **44. Macaé**, *Glicério* (-42.05, -22.23): GL3, 4, 5, 36. **45. Mangaratiba**, *Fazenda Bom Jardim* (-44.10, -22.92): RB-M-88. **46. Mendes**, *Fazenda São José das Paineiras* (-43.73, -22.53): LG8. **47. Nova Friburgo**, (-42.53, -22.28): LBCE1365, 1367, 1368. **48. Paracambi** (-43.71,

-22.61): LBCE734, 735, 736. **49. Paraty**, *Tarituba* (-44.58, -23.03): LGP69, 75. **50. Pinheiral** (-44.02, -22.52): CEG70, 75, 77, 78. **51. Resende**, *Serrinha* (-44.53, -22.32): HGB59, 60, 61, 67, 68. **52. Rio Bonito**, *Catimbau Grande* (-42.67, -22.77): LG10, 12. **53. Rio de Janeiro**, *Parque Estadual da Pedra Branca* (-43.22, -22.85): LBCE4132, 4133, 4139. **54. Silva Jardim** (-42.39, -22.65): LBCE2358. **55. Sumidouro**, *Vale do Pamparrão* (-42.65, -22.03): SU9, LBCE212, 214, 217. **56. Teresópolis** (-42.97, -22.41): LBCE491, 492, 544.

SÃO PAULO (n=32) – **57. Bananal**, *Estação Ecológica do Bananal* (-44.37, -22.80): EEB665. **58. Boracéia** (-48.75, -22.17): CIT309. **59. Cananéia**, *Ariri* (-48.03, -25.20): CIT306, 310, 311, 314; *Ilha do Cardoso* (-47.93, -25.17): HB01, CIT785, 786. **60. Iguape** (-47.55, -24.72): CIT172, 173, 176, 219, 222, 223, 224, 248, 264, 267, 268, 285, 287, 288. **61. Juquitiba** (-47.05, -23.97): CIT256, 257, 259. **62. Sete Barras**, *Fazenda Intervalles* (-47.85, -24.38): CIT10, 19, 20. **63. Ubatuba**, *Parque Estadual da Serra do Mar, Picinguaba* (-44.83, -23.37): CIT134, 135, 146, LG64.

ANEXO 2

Relação de exemplares de *A. cursor* utilizados para os estudos moleculares a partir dos genes mitocondriais Citocromo *b* (Cit-*b*) e Citocromo Oxidase I (COI). As localidades correspondem às detalhadas no Anexo 1. 2n=número diploide. ND=2n não determinado, “H” e “h” referem-se ao código do haplótipo de COI e Cit-*b*, respectivamente.

Estado	Local.	Espécime	2n	Haplótipos			
				COI	Cit <i>b</i>		
PB	1	PHA 554, 556, 560 / PHA 752	16 / ND	H70	h112		
		PHA 555, 557, 563	16	H71	h113		
		PHA 571	16	H71	h114		
Subtotal PB	01	08	16				
PE	2	PHA 257	16	H72	h115		
		PHA 266, 270, 277, 278, 292, 295, 296 / PHA 294, 402, 405, 642, 643	16 / ND	H72	h116		
		PHA 272	16	H72	h117		
		PHA 307	ND	H71	h118		
		PHA 403	ND	H72	h119		
	3	PHA 406	16	H72	h120		
		PHA 396	ND	H71	h118		
		PHA 414	16	H74	h116		
		Subtotal PE	02	19	16		
		BA	4	CTA 1156	ND	H2	h2
4	CTA 1157		ND	H2	h9		
5	RM 168, 173		ND	H1	h1		
6	LG 173		16	H5	h10		
7	CD 01, 05, 25, 62, 103, 110, 137, 141, 157, 164, 167, 178, 219, 242 / CD102		16 / 15	H2	h2		
	CD 27		16	H2	h3		
	CD 30		16	H2	h4		
	CD 66, 94		16	H3	h4		
	CD 124		16	H2	h5		
8	LG 190, 192, 200		14	H1	h1		
	LG 191, 196		14	H6	h10		
9	RM 220		ND	H8	h12		
10	RM 205		ND	H9	h13		
	RM 208		ND	H10	h14		
11	CIT 818, 878, 879, 883, 921, 927, 1021, 1022, 1023 / CIT870, 880, 884, 929, 931, 934 / CIT881, 933, LGA3991, 4029, 4031 / CC13, RM54, 56, 61, 70, 74, 81, 98		16 / 15 / 14 / ND	H1	h1		
	CIT 858		ND	--	h1		
	CIT 887		16	H1	h6		
	CIT 930	16	H1	h8			
	CIT 1020 / CIT926 / LGA4022 / CTA958	16 / 15 / 14 / ND	H4	h7			
	RM 50	ND	H7	--			
	RM 87	ND	H1	h11			
RM 95	ND	H8	h12				
Subtotal BA	08	71	14, 15, 16				
MG	12	GL 123	ND	H61	h98		
	13	BM 145	ND	H10	h73		
	14	LBCE 5552	ND	H64	h32		
	15	BG 17	ND	H10	h72		
		DG 155	ND	H58	h93		
	16	DG 125	ND	H43	h92		
	17	BRG 12, 17, 124	ND	H51	h75		

Cont. Anexo 2

Estado	Local.	Especíme	2n	Haplótipos		
				COI	Citb	
MG	17	BRG 13	ND	H21	h76	
		BRG 111	ND	H52	h77	
		BRG 123	ND	H21	h78	
		BRG 128	ND	H30	h79	
		BRG 134	ND	H12	h80	
		CTA 897	ND	H24	h81	
		CTA 1068	ND	H55	h86	
		CTA 1071	ND	H56	h87	
		18	MCN-M 2601	ND	H53	h82
		19	Ak 1413	ND	H9	h13
			DG 188	ND	H14	h94
			DG 199	ND	H59	h95
			EC 23	ND	H14	h96
			EC 31	ND	H60	h97
			KRTP 38	ND	H63	h28
		20	LG 474, 503	14	H9	h103
			LG 477, 501, 526	14	H9	h13
	LG 485		14	H66	h104	
	LG 497, 521		14	H9	h105	
	LG 500, 524		14	H8	h106	
	LG 506		14	H9	h107	
	LG 527		14	H67	h108	
	21	DG 161	ND	H53	h82	
	22	MCN_M 1969	ND	H25	--	
	23	CTA 950	ND	--	h84	
		CTA 956, 1124	14	H21	h28	
		CTA 1120	14	H57	h89	
		CTA 1126	ND	H24	h90	
	24	CTA 1134	16	H13	h91	
		BPR 07, LG 63	14	H50	h74	
		LG 20, 55	14	H42	h85	
		LG 29	14	H21	h102	
		LG 56	14	H65	h25	
	25	CTA 977	ND	H54	h85	
	26	CTA 937 / CTA1110	14 / ND	H53	h82	
		CTA 944	16	H7	h83	
		CTA 1114	ND	H53	h88	
	27	GL 155	ND	H18	h99	
		GL 160	ND	H13	h100	
		GL 161	ND	H62	h101	
		Vi 12	14	H68	h109	
		Vi 13	14	H62	h110	
		Vi 19	14	H69	h111	
	28	Vi 21	14	H30	h37	
		Ak 1440	ND	H8	h43	
		SubtotalMG	17	63	14, 16	
	ES	29	LGA 1517	14	H8	h43
			LGA 1527	14	H33	h44
			LGA 1546, 1550	14	H34	h45
			LGA 1553	14	H35	h45
			LGA 1554	14	H36	h46
		30	LGA 325	14	H14	h18
			LGA 327	14	H15	h19
			LGA 328	14	H16	h20
			LGA 2198	14	H49	h36
		31	LGA 934	14	H13	h21
			LGA 935	14	H13	h22
			LGA 936	14	H17	h23
			LGA 993	14	H26	h32
			LGA 995, 996	14	H27	h33

Cont. Anexo 2

Estado	Local.	Especíme	2n	Haplotipos		
				COI	Citb	
ES	32	LGA 956	14	H16	h24	
		LGA 957	14	H18	h25	
		LGA 960	14	H19	h26	
		LGA 961	14	H20	h27	
		LGA 962	14	H21	h28	
		LGA 963	14	H22	h29	
		LGA 964	14	H23	h30	
		LGA 965	ND	H24	h31	
		LGA 976	14	H16	h20	
		LGA 983	14	H25	--	
		LGA 1759	14	H42	h57	
		33	LGA 1121	14	H28	h34
			LGA 1123	14	H10	h35
			LGA 1125	14	H8	--
	34	LGA 1187	14	H29	h36	
		LGA 1193	14	H13	h22	
		LGA 1203, 1207, 1217, 1218, 1220 / LGA 1222	14 / ND	H18	h25	
	34	LGA 1206, 1231	14	H30	h37	
		LGA 1211	14	H18	h21	
		LGA 1219	14	H18	h38	
		LGA 1221	ND	H18	h39	
		LGA 1223	ND	H18	h40	
		LGA 1234	14	H31	h41	
		35	LGA 1556	14	H37	h47
			LGA 1558	14	H27	h48
			LGA 1559	14	H38	h49
			LGA 1560	14	H30	h37
	LGA 1561, 1584		14	H39	h50	
	LGA 1562		14	H31	h41	
	LGA 1563		14	H40	h51	
	LGA 1564		14	H38	h52	
	LGA 1579		14	H14	h53	
	LGA 1580		14	H21	h54	
	LGA 1583		14	H41	h55	
	LGA 1586		14	H16	h56	
	36		LGA 37, 38, 42	14	H11	h15
			LGA 50	14	H12	h16
		LGA 159	14	H13	h17	
		LGA 2339	14	H13	h70	
	37	LGA 3915	14	H9	h71	
	38	LGA 1509, 1510	14	H32	h42	
		LGA 1764	14	H43	h58	
		LGA 1765, 1767	14	H23	h59	
		LGA 1827, 1999, 2000, 2001, 2008	14	H44	h60	
		LGA 1829	14	H45	h33	
		LGA 1980, 1989, 2014	14	H18	h61	
		LGA 1981, 1992, 2005, 2010, 2011, 2143, 2144 / LGA 2007	14 / ND	H46	h62	
		LGA 1982	14	H47	h63	
		LGA 1983, 1990, 1991, 2004	14	H47	h25	
		LGA 1984, 1988, 1994, 2013	14	H21	h64	
		LGA 1986	14	H44	h65	
		LGA 1993	14	H21	h66	
		LGA 1997	14	H13	h67	
		LGA 2009	14	H48	h68	
	LGA 2012	14	H46	h69		
	Subtotal ES	10	101	14		

Cont. Anexo 2

Estado	Local.	Espécime	2n	Haplótipos		
				COI	Citb	
RJ	39	AAC 06	14	H75	h121	
		AAC 19	14	H76	h122	
		LBCE 1315	ND	H94	h158	
		LBCE 1316	ND	H102	h159	
		LBCE 1318	ND	H79	h122	
	40	MAM 07	14	H18	h162	
		FI 39	14	H79	h126	
		FS 06-09, 17-20, 17-47	14	H84	h135	
		FS 06-13	14	H79	h136	
		FS 06-37	14	H85	h137	
		FS 11-12	14	H86	h139	
		FS 11-30	14	H73	h25	
		FS 11-40	14	H13	h140	
		FS 11-47, 14-39, 14-41	14	H87	h141	
		FS 14-05	14	H87	--	
		FS 12-02, 16-07, 16-25, 16-40	14	H88	h142	
		FS 12-14, 13-15	14	H13	h133	
		FS 12-32	14	H13	h143	
		FS 14-43	14	--	h32	
		FS 16-37	14	H89	h25	
		FS 17-17	14	H91	h145	
		FS 17-44	14	H84	h23	
		HGB REGUA 01, 17	14	H90	h154	
		HGB REGUA 02	14	H18	h145	
		41	RBM 3-08	ND	H104	h164
			RBM 3-19, 3-55	14	H13	h165
			RBM 3-35	14	H11	h166
			RBM 3-54, 3-68	14	H43	h167
		42	RBM 3-67	14	H11	h168
			FS 04-03, 04-04	14	H50	h127
			FS 04-06	14	H80	h128
		42	FS 04-08, 04-81	14	H50	h32
	FS 04-20		14	H81	h129	
	42	FS 04-25	14	H50	h130	
		FS 04-31	14	H18	h131	
		FS 04-33	14	H73	h25	
		FS 04-41	14	H82	h132	
		FS 04-43	14	H50	--	
		FS 04-45, 05-22, 05-36, 05-58, 05-59, 17-01, 17-14	14	H13	h133	
	74	FS 04-61	14	H82	h132	
		FS 05-57	14	H83	h28	
		FS 05-69	14	H13	h134	
		FS 08-79	14	H13	h138	
		FS 17-08	14	H79	h25	
		FS 17-13	14	H90	h144	
		HGB 405	14	H18	h146	
	43	HGB CFVC 01	14	H95	--	
		HGB CFVC 02	14	H13	h150	
		HGB CFVC 03	14	H98	h151	
		HGB CFVC 06	14	H97	h149	
HGB DB 21		14	H21	h152		
HGB DB 22		14	H21	h153		
44	HGB DB 23	14	H18	h21		
	GL 03	14	H77	h32		
	GL 04	14	H92	h25		
	GL 05	14	H93	--		
45	GL 36	14	H13	h32		
	RB-M 088	14	H84	h163		
46	LG 08	14	H21	--		
47	LBCE 1365, 1367, 1368	ND	H73	h25		

Cont. Anexo 2

Estado	Local.	Espécime	2n	Haplótipos		
				COI	Citb	
RJ	48	LBCE 734	ND	H100	h156	
		LBCE735	ND	H21	h152	
		LBCE 736	ND	H101	h157	
	49	LGP 69	14	H94	h148	
		LGP 75	14	H97	h32	
	50	CEG 70, 75	14	H77	h123	
		CEG 77	14	H78	h124	
		CEG 78	14	H18	h125	
	51	HGB 59	14	H94	h147	
		HGB 60	14	H21	h148	
		HGB 61	14	H95	h32	
		HGB 67	14	H96	h32	
	52	HGB 68	14	H97	h149	
		LG 10	14	H13	--	
		LG 12	14	H73	h25	
	53	LBCE 4132, 4133, 4139	ND	H103	h161	
	54	LBCE 2358	ND	H13	h160	
	55	LBCE 212, 217	ND	H79	h25	
		LBCE 214	ND	H77	h32	
		SU 09	14	--	h32	
	56	LBCE 491, 492	ND	H73	h25	
		LBCE 544	ND	H99	h155	
	Subtotal RJ	18	108	14		
	SP	57	EEB 665	14	H50	h180
		58	CIT 309	14	H113	h21
			CIT 306	15	H82	h176
		59	CIT 310	16	H109	h177
CIT 311			15	H77	--	
CIT 314			15	H114	h178	
CIT 785, 786 / HB 01			14 / 15	H115	h179	
CIT 172			14	H107	h170	
60		CIT 173	15	H108	h171	
		CIT 176, 219	14	H109	h172	
		CIT 222 / CIT 268	15 / 14	H110	h173	
		CIT 267 / CIT 223, 264, 285 / CIT 248, 288	16 / 15 / 14	H111	h173	
61		CIT 287	14	H112	h173	
		CIT 256, 259	14	H18	h174	
		CIT 257	14	H18	h175	
62		CIT 10, 20	14	H105	h169	
		CIT 19	14	H76	h32	
63		CIT 134, 135, 146	14	H106	h21	
		LG 064	14	H50	h182	
Subtotal SP		07	32	14, 15, 16		
Total	63	403	14, 15, 16	115	182	

ANEXO 3

Matrizes de *A. cursor* e *A. montensis* utilizadas nos cruzamentos experimentais. Em ordem: Estado brasileiro (maiúsculo, em negrito), número total de espécimes amostrados para aquele Estado (entre parênteses, em negrito), município (em negrito), localidade (em itálico), coordenadas geográficas (entre parênteses), número diploide (em negrito), número de identificação dos espécimes.

Akodon cursor

BAHIA (n=20) – 1. Una (-39.07, -15.25) : **2n=14** – LGA 4021, 4022, 4023, 4024, 4025, 4026, 4027, 4028, 4029, 4030, 4031, 4033, 4034, 4337, 4339, 4351, 4352; **2n=15** – LGA 4338, 4358; **2n=16** – LGA 4032.

ESPÍRITO SANTO (n=13) – 2. Castelo, *Parque Estadual da Fonte Grande* (-41.08, -20.52): **2n=14** – LGA 4245, 4260, 4261, 4262 **3. Domingos Martins**, *Panelas* (-40.66, -20.36): **2n=14** – LGA 4401; *Rio Ponte* (-40.83, -20.18) : **2n=14** – 4451, 4452, 4453, 4471, 4472 **4. Guarapari**, *Rio da Prata* (-40.51, -20.66) : **2n=14** – LGA 4509; **5. Santa Teresa**, *Estação Biológica Santa Lúcia* (-40.60, -19.92): **2n=14** – LGA 4480, 4481.

Akodon montensis

MINAS GERAIS (n=6) – 6. Luminárias *Fazenda Pedra do Navio* (-44.79, -21.57): **2n=24** LGA 4538, 4539 4547, 4561, 4552, 4567.

SÃO PAULO (n=24) – 7. Iguape (-47.55, -24.72): **2n=24** LGA 4150, 4190; **8. Ilha Comprida**, (-47.90, -25.02): **2n=25** LGA 4395; **2n=24** – LGA 4197, 4201, 4203, 4207, 4360, 4362, 4366, 4369, 4370, 4371, 4386, 4387, 4396, 4398, 4399, 4410, 4411, 4412; **2n=25** LGA 4364, 4365, 4397.

ANEXO 4

Exemplares de *Akodon cursor* utilizados como matriz nos cruzamentos em cativeiro. Em ordem: número de tombo, localidade de coleta, sexo, número diploide (2n), *status*, tempo de permanência dos indivíduos em cativeiro (em dezembro/15), número de cruzamentos dos quais participou (até agosto/15) e tempo de cativeiro ao ter a última ninhada.

Espécie (LGA)	Origem	Sexo	2n	Status	Permanência em cativeiro	Nº de cruzamentos que participou	Tempo de cativeiro no último cruzamento com ninhada ^b
4021	RPPN Nova	♂	14	morte natural	19 meses	4	18 meses
4022	Angélica, Una	♀	14	morte para procedimento	2 meses	1	2 meses
4023	(Bahia)	♀	14	vivo	31 meses	2	2 meses
4024		♀	14	viva	31 meses	10	18 meses^b
4025		♀	14	morte por debilidade	19 meses	4	17 meses
4026		♀	14	vivo	31 meses	2	9 meses
4027		♀	14	morte natural	5 meses	0	--
4028		♀	14	vivo	31 meses	4	12 meses^b
4029		♀	14	morte para procedimento	3 meses	1	2 meses
4030		♀	14	morte por debilidade	18 meses	6	12 meses^b
4031		♀	14	morte para procedimento	3 meses	1	--
4032		♀	16	morte natural	25 meses	16	24 meses
4033		♀	14	Vivo	31 meses	3	17 meses
4034		♀	14	Vivo	31 meses	2	16 meses
4337		♀	14	morte para procedimento	19 meses	7	13 meses
4338		♀	15	Vivo	20 meses	13	13 meses
4339		♀	14	morte para procedimento	19 meses	6	13 meses
4351		♀	14	morte para procedimento	19 meses	5	5 meses^b
4352		♀	14	morte para procedimento	19 meses	7	4 meses^b
4358		♀	15	Vivo	20 meses	5	7 meses
4245	PE Fonte Grande,	♀	14	Viva	21 meses	9	17 meses
4260	Castelo (ES)	♀	14	morte natural	2 meses	1	--
4261		♀	14	Vivo	16 meses	10	11 meses
4262		♀	14	morte natural	16 meses	6	5 meses^b
4401	Panelas, Dom. Martins (ES)	♂	14	Vivo	18 meses	13	16 meses^b
4451	Rio Ponte,	♀	14	Vivo	15 meses	8	10 meses
4452	Domingos Martins	♀	14	Vivo	15 meses	6	9 meses
4453	(ES)	♀	14	morte natural	3 meses	3	3 meses
4471 ^a		♀	14	Vivo	14 meses	6	6 meses
4472 ^a		♀	14	morte em cruzamento	6 meses	5	6 meses
4480	EB Santa Lúcia,	♀	14	morte natural	5 meses	2	--
4481	Santa Teresa (ES)	♀	14	morte natural	5 meses	3	4 meses
4509	Rio da Prata, Guarapari (ES)	♂	14	morte em cruzamento	8 meses	5	10 meses
33 exemplares		21♂; 12♀		14 vivos; 19 mortos	2-31 meses	0-16	2-18 meses

a = descendente de LGA 4453, capturada prenhe.

b = houveram cruzamentos posteriores, mas sem descendentes.

ANEXO 5

Cruzamentos intra e interespecíficos realizados em cativeiro entre indivíduos de *Akodon cursor*, *A. montensis* e seus híbridos. Em *A. cursor* foram considerados exemplares dos clados Norte (N) e Sul (S) e seus descendentes interclado (E). Na ordem: número do cruzamento, parentais com número diploide (2n), tempo gestacional (em dias), quantidade de indivíduos que nasceram e sobreviveram ao período de lactação, sexo e 2n dos descendentes. Somente para *A. cursor*: LGA^N=matriz clado Norte, LGA^S=matriz clado Sul; LGA^{NxN/SxS/SxN/NxS}=descendente F₁(cinza claro), F₂(preto) ou F₃(cinza escuro) atuando como parental.

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n
ACU-N x ACU-N (matriz x matriz)	N1	4030	14	4022	14	22	3	3	♀	14
									♂	14
									♀	14
	N2	4029	14	4023	14	22	2	0		
	N3	4031	14	4026	14	--	0			
	N4	4024	14	4021	14	21	5	3	♀	14
									♂	14
									♀	14
	N5	4030	14	4032	16	26	3	3	♀	15
									♂	15
									♀	15
	N6	4024	14	4032	16	25	3	3	♀	15
									♂	15
									♀	15
	N7	4030	14	4034	14	24	4	4	♀	14
									♂	14
									♀	14
									♂	14
	N8	4024	14	4025	14	--	0			
N9	4030	14	4028	14	24	4	4	♀	14	
								♂	14	
								♀	14	
								♂	14	
N10	4024	14	4033	14	23	5	5	♀	14	
								♂	14	
								♀	14	
								♂	14	
								♀	14	
								♂	14	
N11	4030	14	4033	14	27	2	2	♀	14	
								♂	14	
N12	4351	14	4032	16	--	0				
N13	4352	14	4034	14	26	2	0			
N14	4024	14	4032	16	--	0				
N15	4351	14	4339	14	25	2	2	♀	n/d	
								♂	13	
N16	4352	14	4337	14	--	0				
N17	4351	14	4338	15	--	0				
N18	4024	14	4339	14	--	0				
N19	4352	14	4032	16	--	0				

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀ 2n	♂ 2n	Nasc.	Sobrev.		Sexo	2n		
ACU-N x ACU-N (Com F ₁)	N20	4074 ^{NxN}	14	4032	16	25	2	2	♂ ₃ +♀ ₁	15 15
	N21	4079 ^{NxN}	14	4032	16	25	1	0		
	N22	4074 ^{NxN}	14	4025	14	--	0			
	N23	4219 ^{NxN}	14	4026	14	25	4	3	♂ ₃ +♀ ₁	14 14 14
	N24	4220 ^{NxN}	14	4025	14	25	5	4	♂ ₃ +♀ ₁ +♂ ₁ +♀ ₁	14 14 14 14
	N25	4221 ^{NxN}	14	4021	14	24	4	4	♂ ₃ +♀ ₁ +♂ ₁ +♀ ₁	14 14 14 14
	N26	4084 ^{NxN}	15	4028	14	23	4	4	♂ ₃ +♀ ₁ +♂ ₁ +♀ ₁	14 15 14 14
	N27	4074 ^{NxN}	14	4023	14	--	0			
	N28	4221 ^{NxN}	14	4028	14	26	2	2	♂ ₃ +♀ ₁	14 14
	N29	4220 ^{NxN}	14	4032	16	23	6	1	♂ ₃ +♀ ₁	15
	N30	4084 ^{NxN}	15	4032	16	--	0			
	N31	4217 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N32	4084 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N33	4221 ^{NxN}	14	4032	16	24	3	3	♂ ₃ +♀ ₁	15 15 15
	N34	4217 ^{NxN}	15	4032	16	--	0			
	N35	4084 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N36	4084 ^{NxN}	15	4358	15	--	0			
	N37	4084 ^{NxN}	15	4032	16	--	0			
	N38	4084 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N39	4420 ^{NxN}	14	4338	15	--	0			
	N40	4352	14	4083 ^{NxN}	15	--	0			
	N41	4351	14	4083 ^{NxN}	15	--	0			
	N42	4084 ^{NxN}	15	4078 ^{NxN}	14	23	4	4	♂ ₃ +♀ ₁ +♂ ₁ +♀ ₁	14 14 n/d 15
	N43	4079 ^{NxN}	14	4075 ^{NxN}	14	--	0			
	N44	4217 ^{NxN}	15	4218 ^{NxN}	14	--	0			
	N45	4217 ^{NxN}	15	4075 ^{NxN}	14	--	0			
	N46	4217 ^{NxN}	15	4083 ^{NxN}	15	--	0			
	N47	4084 ^{NxN}	15	4216 ^{NxN}	15	--	0			
	N48	4217 ^{NxN}	15	4083 ^{NxN}	15	--	0			
	N49	4220 ^{NxN}	14	4215 ^{NxN}	15	24	5	5	♂ ₃ +♀ ₁ +♂ ₁ +♀ ₁	15 n/d n/d 14 15

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀ 2n	♂ 2n	2n	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n
ACU-N x ACU-N (Com F ₂ e F ₃)	N50	4276 ^{NxN}	14	4337	14	--	0			
	N51	4279 ^{NxN}	14	4338	15	25	2	2	♀+♂	14 15
	N52	4284 ^{NxN}	14	4358	15	25	1	1	♀	n/d
	N53	4408 ^{NxN}	14	4025	14	26	2	2	♀+♂	14 14
	N54	4269 ^{NxN}	14	4358	15	24	4	4	♀+♂	14 n/d n/d 14
	N55	4276 ^{NxN}	14	4033	14	28	5	5	♀	14 14 14 14 14
	N56	4279 ^{NxN}	14	4028	14	--	0	0	♀	14
	N57	4269 ^{NxN}	14	4339	14	26	4	4	♀+♂	14 14 14
	N58	4268 ^{NxN}	14	4337	14	--	0			
	N59	4222 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N60	4595 ^{NxN}	15	4338	15	24	2	2	♀	16 15
	N61	4473 ^{NxN}	14	4032	16	23	6	0		
	N62	4268 ^{NxN}	14	4338	15	24	3	3	♀	14 n/d n/d
	N63	4222 ^{NxN}	15	4338	15	--	0			
	N64	4473 ^{NxN}	14	4032	16	23	6	3	♀+♂	15 15 15
	N65	4405 ^{NxN}	14	4337	14	--	0			
	N66	4408 ^{NxN}	14	4339	14	--	0			
	N67	4279 ^{NxN}	14	4358	15	--	0			
	N68	4352	14	4277 ^{NxN}	14	--	0			
	N69	4222 ^{NxN}	15	4078 ^{NxN}	14	--	0			
	N70	4222 ^{NxN}	15	4215 ^{NxN}	15	--	0			
	N71	4222 ^{NxN}	15	4216 ^{NxN}	15	--	0			
	N72	4084 ^{NxN}	15	4223 ^{NxN}	15	--	0			
	N73	4238 ^{NxN}	14	4277 ^{NxN}	14	27	1	1	♂	14
	N74	4265 ^{NxN}	14	4281 ^{NxN}	14	--	0			
	N75	4079 ^{NxN}	14	4223 ^{NxN}	15	--	0			
	N76	4268 ^{NxN}	14	4223 ^{NxN}	15	--	0			
	N77	4406 ^{NxN}	14	4270 ^{NxN}	n/d	25	2	2	♀+♂	14 14
	N78	4407 ^{NxN}	15	4271 ^{NxN}	15	--	0			
	N79	4595 ^{NxN}	15	4649 ^{NxN}	15	--	0			
	N80	4473 ^{NxN}	14	4650 ^{NxN}	15	--	0			
	N81	4222 ^{NxN}	15	4648 ^{NxN}	15	--	0			
	N82	4512 ^{NxN}	14	4511 ^{NxN}	14	25	4	4	♀	14 14 14 14
matriz x matriz	19						35	29	17♂ / 12♀	
Com F₁	30						40	32	20♂ / 12♀	
Com F₂ e F₃	33						42	33	18♂ / 15♀	
TOTAL NORTE	82					21-28	117	94	55♂ / 39♀	

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n
INTERCLADO Com F ₁ Interclado – Cont.	E48	4623 ^{SxN}	14	4616 ^{SxN}	n/d	24	3	3	♂	n/d
									♀	n/d
INTERCLADO Com F ₂ / F ₃ Interclado	E49	4517 ^{NSxSN}	14	4338 ^N	15	24	5	5	♂	n/d
									♀	n/d
	E50	4521 ^{NxNS}	14	4339 ^N	14	23	5	5	♂	n/d
									♀	n/d
	E51	4618 ^{NSxN}	14	4401 ^S	14	26	5	5	♂	14
									♀	14
	E52	4245 ^S	14	4747 ^{NSxNS}	14	--	0		♂	14
	E53	4452 ^S	14	4743 ^{NSxNS}	14	23	7	7	♀	14
									♂	14
	E54	4405 ^{NxN}	14	4430 ^{NxS}	14	25	4	4	♂	14
									♀	14
	E55	4606 ^{NxS}	14	4619 ^{NSxN}	14	24	5	5	♂	14
									♀	14
	E56	4607 ^{NxS}	14	4620 ^{NSxN}	14	24	4	4	♂	14
									♀	14
	E57	4629 ^{NxS}	14	4619 ^{NSxN}	14	--	0		♂	14
	E58	4630 ^{NxS}	14	4620 ^{NSxN}	14	--	0		♀	14
	E59	4433 ^{NxS}	14	4522 ^{NxNS}	14	--	0		♂	14
	E60	4526 ^{NxS}	14	4523 ^{NxNS}	14	25	3	3	♀	14
	E61	4528 ^{NxS}	14	4524 ^{NxNS}	14	25	5	5	♂	14
									♀	14
	E62	4432 ^{NxS}	14	4519 ^{NSxSN}	14	24	4	3	♂	14
									♀	14
	E63	4527 ^{NxS}	14	4520 ^{NSxSN}	14	25	3	3	♂	14
									♀	14
	E64	4633 ^{SxN}	15	4621 ^{NSxN}	14	--	0		♂	14
	E65	4518 ^{NSxSN}	14	4430 ^{NxS}	14	26	3	2	♀	14
	E66	4517 ^{NSxSN}	14	4522 ^{NxNS}	14	26	1	1	♂	14

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes				
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n	
<i>A. montensis</i> (matriz x matriz) - Cont.	AMO22	4360	24	4386	24	25	4	4	♀	24	
									♂	24	
									♀	24	
	AMO23	4197	24	4362	24	26	1	1	♀	24	
	AMO24	4207	24	4365	25	--	0				
	AMO25	4360	24	4369	24	--	0				
	AMO26	4364	25	4370	24	25	3	2	♀	n/d	
									♂	24	
	AMO27	4412	24	4567	24	26	3	3	♀	24	
									♂	24	
									♀	24	
	AMO28	4411	24	4538	24	--	0				
	AMO29	4395	23	4538	24	--	0				
	AMO30	4396	24	4561	24	--	0				
	AMO31	4397	25	4567	24	--	0				
	AMO32	4552	24	4399	24	26	3	2	♀	24	
									♂	24	
	AMO33	4539	24	4371	24	23	4	4	♀	24	
									♂	24	
									♀	24	
									♂	24	
	AMO34	4547	24	4399	24	23	4	4	♀	24	
									♂	24	
									♀	24	
									♂	24	
	AMO35	4552	24	4387	24	--	0				
	TOTAL AMO-M	35					22-27	64	61	30♂ / 31♀	
	<i>A. montensis</i> (Com F ₁)	AMO36	4242	24	4201	24	--	0			
		AMO37	4242	24	4370	24	--	0			
		AMO38	4272	24	4371	24	--	0			
		AMO39	4272	24	4399	24	--	0			
		AMO40	4272	24	4201	24	26	1	1	♀	24
		AMO41	4449	25	4362	24	--	0			
		AMO42	4478	24	4369	24	23	3	2	♂	24
										♀	24
AMO43		4585	24	4371	24	--	0				
AMO44		4439	24	4399	24	--	0				
AMO45		4197	24	4274	24	--	0				
AMO46		4207	24	4460	24	--	0				
AMO47		4360	24	4593	24	23	3	3	♀	24	
									♂	24	
									♀	24	
AMO48		4364	25	4463	25	--	0				
AMO49		4395	23	4476	24	25	5	5	♀	23	
									♂	n/d	
									♀	n/d	
									♂	23	
									♀	24	
AMO50		4397	25	4590	24	--	0				
AMO51		4410	24	4461	25	--	0				
AMO52	4411	24	4592	24	25	1	0				
AMO53	4243	24	4273	24	--	0					
AMO54	4449	25	4274	24	--	0					
AMO55	4464	25	4592	24	23	5	4	♀	n/d		
								♂	n/d		
								♀	n/d		
								♂	n/d		
AMO56	4415	24	4590	24	--	0					
AMO57	4440	23	4476	24	--	0					
AMO58	4439	24	4463	25	--	0					

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n
<i>A. montensis</i> (Com F ₁) – Cont.	AMO59	4435	24	4461	25	--	0			
	AMO60	4243	24	4463	25	--	0			
	AMO61	4435	24	4561	24	--	0			
	AMO62	4539	24	4637	24	--	0			
	AMO63	4547	24	4642	24	--	0			
	AMO64	4412	24	4641	24	--	0			
	AMO65	4585	24	4637	24	--	0			
	AMO66	4638	24	4593	24	23	5	4	♂ ♂ ♂ ♀	24 24 24 24
TOTAL AMO-F₁	31					23-26	23	19	10♂ / 9♀	
TOTAL AMO	66					22-27	87	80	40♂ / 40♀	
ACU-N x AMO	HIB1	4030	14	4150	24	23	1	1	♂	19
	HIB2	4024	14	4150	24	--	0			
	HIB3	4351	14	4150	24	--	0			
	HIB4	4352	14	4201	24	27	2	1	♀	19
	HIB5	4030	14	4201	24	--	0			
	HIB6	4024	14	4387	24	--	0			
	HIB7	4351	14	4274	24	--	0			
	HIB8	4352	14	4463	25	--	0			
	HIB9	4074	14	4150	24	--	0			
	HIB10	4074	14	4203	24	--	0			
	HIB11	4079	14	4201	24	--	0			
	HIB12	4220	14	4201	24	27	1	0		
	HIB13	4221	14	4369	24	--	0			
	HIB14	4238	14	4399	24	--	0			
	HIB15	4220	14	4362	24	26	2	2	♂ ♂	19 19
	HIB16	4221	14	4365	25	--	0			
	HIB17	4238	14	4369	24	--	0			
	HIB18	4265	14	4370	24	--	0			
	HIB19	4268	14	4371	24	--	0			
	HIB20	4269	14	4386	24	26	1	1	♂	19
	HIB21	4405	14	4538	24	--	0			
	HIB22	4268	14	4476	24	--	0			
	HIB23	4269	14	4590	24	--	0			
	HIB24	4406	14	4592	24	--	0			
	HIB25	4408	14	4593	24	--	0			
	HIB26	4406	14	4592	24	--	0			
	HIB27	4269	14	4274	24	--	0			
	HIB28	4473	14	4399	24	24	3	3	♂ ♀ ♂	19 19 n/d
	HIB29	4084	15	4201	24	--	0			
	HIB30	4217	15	4203	24	--	0			
	HIB31	4084	15	4460	24	--	0			
	HIB32	4407	15	4567	24	--	0			
AMO x ACU-N	HIB33	4207	24	4023	14	26	1	1	♀	19
	HIB34	4360	24	4337	14	--	0			
	HIB35	4197	24	4023	14	--	0			
	HIB36	4207	24	4025	14	--	0			
	HIB37	4197	24	4032	16	28	2	2	♂ ♂	20 20
	HIB38	4207	24	4032	16	--	0			
	HIB39	4207	24	4083	15	26	2	2	♂ ♀	n/d 20
	HIB40	4360	24	4215	15	--	0			
	HIB41	4395	23	4216	15	--	0			
	HIB42	4395	23	4215	15	--	0			

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes				
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n	
AMO x ACU-N - Cont.	HIB43	4397	25	4216	15	--	0				
	HIB44	4360	24	4215	15	28	2	2	♂+♀	20 n/d	
	HIB45	4396	24	4083	15	--	0				
	HIB46	4364	25	4223	15	--	0				
	HIB47	4395	23	4216	15	--	0				
	HIB49	4242	24	4026	14	28	3	3	♂+♀+♂	19 19 19	
	HIB50	4243	24	4023	14	--	0				
	HIB51	4243	24	4026	14	--	0				
	HIB55	4585	24	4339	14	--	0				
	HIB57	4754	24	4337	14	--	0				
	HIB53	4585	24	4338	15	--	0				
	HIB54	4638	24	4338	15	--	0				
	HIB56	4439	24	4358	15	25	1	0			
	HIB48	4243	24	4032	16	26	3	3	♂+♀+♂	20 20 20	
	HIB52	4478	24	4032	16	26	4	4	♂+♀+♂+♂	20 20 20 20	
	HIB58	4809	24	4215	15	--	0				
	HIB59	4478	24	4270	ND	--	0				
	AMO x ACU-S	HIB60	4398	24	4261	14	--	0			
		HIB61	4197	24	4401	14	27	3	2	♂+♀	19 19
		HIB62	4398	24	4261	14	--	0			
		HIB63	4397	25	4509	14	--	0			
		HIB64	4197	24	4262	14	24	3	3	♂+♀+♂	19 19 19
		HIB65	4397	25	4506	14	--	0			
		HIB66	4364	25	4610	14	--	0			
		HIB67	4410	24	4506	14	26	1	0		
		HIB68	4411	24	4610	14	21	4	4	♂+♀+♂+♂	19 19 19 19
		HIB69	4412	24	4611	14	--	0			
		HIB70	4243	24	4261	14	--	0			
		HIB71	4242	24	4471	14	--	0			
		HIB72	4272	24	4472	14	--	0			
		HIB73	4435	24	4401	14	--	0			
		HIB74	4808	24	4261	14	--	0			
		HIB75	4802	n/d	4471	14	--	0			
HIB76		4801	24	4509	14	--	0				
HIB77		4439	24	4609	14	--	0				
HIB78		4440	23	4506	14	--	0				
HIB79		4449	25	4610	14	--	0				
HIB80	4464	25	4611	14	--	0					
TOTAL HIB	80					21-28	39	34	17♂ / 17♀		
Intercruzameno (híbrido x híbrido)	INT1	4287	19	4275	19	--	0				
	INT2	4287	19	4402	20	--	0				
	INT3	4425	20	4275	19	--	0				
	INT4	4443	19	4403	20	--	0				
	INT5	4459	19	4424	20	--	0				
	INT6	4467	n/d	4468	19	--	0				
	INT7	4287	19	4424	20	--	0				
	INT8	4443	19	4275	19	--	0				

Cont. Anexo 5

Grupo	Cruz	Parentais				Gest. (dias)	Descendentes			
		♀	2n	♂	2n		Nasc.	Sobrev.	Sexo	2n
Intercruzameno (híbrido x híbrido)	INT9	4514	19	4402	20	--	0			
	INT10	4736	19	4468	19	--	0			
- Cont.	INT11	4459	19	4275	19	--	0			
	INT12	4742	n/d	4823	20	--	0			
	INT13	4738	n/d	4824	20	--	0			
	INT14	4287	19	4402	20	--	0			
	INT15	4443	19	4424	20	--	0			
	INT16	4514	19	4468	19	--	0			
	INT17	4736	19	4403	20	--	0			
	TOTAL INT	17					--	0		
Retrocruzamento (híbrido x espécie parental)	RET1	4030	14	4275	19	--	0			
	RET2									
		4420	14	4424	20	--	0			
	RET3	4433	14	4423	20	--	0			
	RET4	4197	24	4402	20	--	0			
	RET5	4197	24	4403	20	--	0			
	RET6	4287	19	4023	14	--	0			
	RET7	4738	n/d	4215	15	--	0			
	RET8	4467	n/d	4401	14	--	0			
	RET9	4459	19	4401	14	--	0			
	RET10	4425	20	4429	14	--	0			
	RET11	4443	n/d	4201	24	--	0			
RET12	4742	n/d	4399	n/d	--	0				
TOTAL RET	12					--	0			
TOTAL	367					21-28	441	395	209 ♂ / 186 ♀	