

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

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE
***THAPTOMYS* THOMAS, 1916 (RODENTIA: CRICETIDAE)**

Victor Hugo Colombi

Vitória, ES

Janeiro de 2018

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

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE
***THAPTOMYS* THOMAS, 1916 (RODENTIA: CRICETIDAE)**

Victor Hugo Colombi

Orientadora: Dra. Valéria Fagundes

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
Janeiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

1 - Dra. Valéria Fagundes (Universidade Federal do Espírito Santo)

Orientadora e Presidente da Comissão

2 - Dra. Ana Carolina Loss (Universidade Federal do Espírito Santo)

Examinador Titular Interno

3 – Dr. Yuri Luiz Reis Leite (Universidade Federal do Espírito Santo)

Examinador Titular Interno

4 – Dra. Kátia Pellegrino (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Diadema)

Examinador Titular Externo

5 – Dra. Lena Geise (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

Examinador Titular Externo

6 – Dra. Sarah Maria Vargas (Universidade Federal do Espírito Santo)

Examinador Suplente Interno

7 – Dr. Vander Calmon Tosta (Centro Universitário Norte do Espírito Santo, UFES)

Examinador Suplente Externo

À minha mãe, meu grande amor!

AGRADECIMENTOS

Considero essa parte do trabalho a mais difícil de fazer. Isso porque são quase 11 anos no Laboratório de Genética Animal até chegar nesse momento. Foi um período único na minha vida, onde percorri um caminho muito longo, enfrentei várias batalhas e estou conquistando um sonho, não só meu, mas também da minha mãe, que tanto lutou na vida, apesar de tantas adversidades, para que eu chegasse até aqui. Essa experiência me formou para além da minha profissão, me tornou uma pessoa mais grata e me fez enxergar a vida com mais leveza. Conheci pessoas que levarei para sempre comigo e com as quais vivi momentos especiais. Por isso, devo agradecer a cada uma delas.

Duas, em especial, por mais que eu agradeça, nunca será suficiente. Com certeza não seria possível chegar até aqui sem elas. A primeira é a minha mãe, a mulher da minha vida, por quem eu sempre fiz o meu melhor para tentar agradecer e lhe dar um pouco do que ela já fez por mim. Foram tantas dificuldades, preocupações, mas fomos vencendo cada um dos percalços, sempre juntos, independente do sacrifício que cada um teria que fazer. Meu exemplo de vida! Sua determinação e amor me mantiveram forte para que essa conquista se tornasse realidade! Dedico esse trabalho para você! É só um pouco do que você merece e que espero lhe proporcionar daqui pra frente! Te amo demais!

Não menos especial, lembro-me como se fosse hoje, eu batendo em sua porta, ainda no primeiro período, pedindo estágio. De lá pra cá, foram tantos momentos, sentimentos e ensinamentos. Um exemplo de caráter, de profissional e de como é possível conquistar os sonhos pretendidos. Val, além de professora e orientadora, hoje tenho orgulho em dizer que sou seu amigo, que posso contar sempre com você. Obrigado por tantas coisas boas que você me proporcionou. E se tem uma coisa que aprendi com você é que “cada um tem o que merece”, principalmente quando se busca e luta tanto pelos sonhos. Sou e serei eternamente grato a você! Por tudo!

E por esse longo caminho, a vida continuou me presenteando com pessoas maravilhosas. Colegas de turma, professores e alguns deles se tornaram grandes amigos. Tão grandes que, até para terminar a tese, terminamos juntos, né Arturo? Obrigado por ser sempre disponível, atencioso, calmo, positivo e pelos inúmeros momentos que dividimos ao longo desses 11 anos. Um amigo de todas as horas! Que bom que tive o privilégio de lhe conhecer nessa vida!

À minha família, em especial ao meu irmão Eloilson, à minha cunhada Regiane e ao meu sobrinho Enzo, pelo apoio, amor e compreensão nessa jornada. Ao Caio, de forma especial, por entender minha ausência em muitos momentos e abrir mão de várias coisas durante esses três anos juntos para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha formação. Seu apoio e seu carinho foram incondicionais e, com certeza, fundamentais para que eu chegasse até aqui!

À tia Maria, ao tio Zé, minhas primas/irmãs Flávia, Marisa, Otávia, ao Anderson, Pedro e Rodney, e às crianças, Elisa, Gonçalo, Beatriz e Rafaela, por tornarem meu dia a dia mais divertido, leve e pelo amor que sentimos uns pelos outros.

Gostaria de agradecer, também, de uma maneira muito especial, à Marianna Xavier, que se tornou uma irmã ao longo desses anos, e que agora carrega consigo a pequena Eva, que ainda não chegou, mas que o tio já ama! Obrigado por sempre me ouvir, aguentar meus desabafos e pela diversão que é sempre que nos reunimos! À Rosana, que continua me encantando com sua paixão pelos cromossomos e sua simplicidade como pessoa. E à Fernanda Zaidan, pela amizade, companheirismo, risadas e pelo sobrinho emprestado, o Eric, que já já estará entre nós!

Aos demais amigos do LGA: Silvia Caldara, Cristina Massariol, Thais Volpi, Ana Heloísa, Gabriel Bautz, Débora D’Nadai e do Departamento de Ciências Biológicas, meu muito obrigado! Em especial, à Juliana Justino, que sempre me acompanhou nesse desafio dos microssatélites, que me socorreu sempre que solicitei, pelas ideias e bons papos durante os cafés.

À professora Roberta Paresque, por sempre me ajudar tão prontamente.

Ao João Fonseca e ao João Paulo Hoppe, pela ajuda significativa nas análises dos microssatélites e modelagem de nicho, respectivamente.

Agradeço aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pelos seis anos de muitos ensinamentos, os quais levarei por toda a vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo ao longo desses 4 anos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelos financiamentos dos projetos de pesquisa.

Aos membros da banca, por aceitarem prontamente participarem dessa banca de defesa.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
 CAPÍTULO 1. Karyological diversity reveals two evolutionary pathways of the monotypic blackish grass mouse <i>Thaptomys nigrita</i> (Rodentia, Sigmodontinae)	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3. RESULTADOS.....	24
3.1. <i>Karyotype diversity</i>	24
3.2. <i>Chromosome painting</i>	28
3.3. <i>Telomeric probe mapping</i>	28
4. DISCUSSÃO	31
4.1. <i>Two evolutionary pathways for karyotype differentiation</i>	32
4.2. <i>One or more species</i>	34
5. AGRADECIMENTOS.....	37
6. REFERÊNCIAS	38
 CAPÍTULO 2. Diversificação de <i>Thaptomys</i> Thomas, 1916: implicações taxonômicas e evolutivas	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1. <i>Amostra</i>	51
2.2. <i>DNA e sequenciamento</i>	51
2.3. <i>Genotipagem</i>	53
2.4. <i>Rede de haplótipos</i>	54
2.5. <i>Estrutura populacional</i>	54
2.6. <i>Modelagem de nicho</i>	55
3. RESULTADOS.....	59
3.1. <i>Análises Filogenéticas</i>	59
3.2. <i>Rede de haplótipos</i>	60
3.3. <i>Divergência genética</i>	60

3.3.1. Entre cariogrupos.....	60
3.3.2. Entre localidades.....	60
3.4. Análises Populacionais	65
3.4.1. Marcador mitocondrial (CytB).....	65
3.4.2. Microsatélites.....	67
3.5. Modelagem de nicho	74
4. DISCUSSÃO	76
4.1. As dificuldades dos estudos taxonômicos em <i>Thaptomys</i>	77
4.2. Uma interpretação integrativa em <i>Thaptomys</i>	79
4.2.1. $2n=50/FN=48$: uma espécie nova?	79
4.2.2. O curioso caso de $2n=52/FN=52$	83
4.2.3 A surpreendente diversidade cariotípica em Luminárias ($2n=48-51/FN=52$)	84
5. REFERÊNCIAS	89
6. APÊNDICES.....	100

LISTA DE TABELAS

➤ CAPÍTULO 1

Table 1.1. Karyotypes of *Thaptomys* with respective locality, number of individuals (sample) and references 23

Table 1.2. Homologies among *Thaptomys nigrita* (TNI) karyotypes detected by chromosome painting of 23 *Akodon paranaensis* (APA; 2n=44) probes on 2n=52, 2n=50 and 2n=48-49a karyotypes..... 25

➤ CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Histórico taxonômico de *Thaptomys* 50

Tabela 2.2. Amostragem de espécimes de *Thaptomys* do presente trabalho, localidade, número de indivíduos por localidade (n), cariótipo dos espécimes, número de amostras sequenciadas, número de haplótipos (nH) por localidade, haplótipos e referências. 56

Tabela 2.3. Marcadores microssatélites utilizados no presente trabalho, com nome (locus), sequências dos primers, temperatura de anelamento (T °C), tamanho esperado dos fragmentos amplificados, marcadores fluorescentes utilizados em cada caso e referências..... 57

Tabela 2.4. Divergência genética (K2P) entre localidades ao longo da distribuição geográfica de *Thaptomys* utilizando apenas espécimes cariotipados 62

Tabela 2.5. Teste de Variância Molecular Espacial para a obtenção da melhor organização populacional das amostras de *Thaptomys* do presente trabalho a partir do índice de diversidade molecular Φ_{ST} . k representa o número de populações admitidas para o teste (variou de 2 a 10). 64

Tabela 2.6. Marcadores microssatélites utilizados no presente trabalho, com nome (locus), temperatura de anelamento (T °C), tamanho esperado dos fragmentos amplificados, tamanho observado dos fragmentos amplificados, número total de alelos e referência original da descrição dos primers..... 68

Tabela 2.7. Número de alelos privados por localidade, locus, tamanho do alelo e a respectiva frequência observada. 69

Tabela 2.8. Valores de F_{st} , par a par, entre as populações de *Thaptomys* analisadas no presente trabalho, a partir dos dados de microssatélite..... 70

LISTA DE FIGURAS

➤ CAPÍTULO 1

Figure 1.1. Localities of 141 specimens of *Thaptomys* sampled in the present study, representing the greatest sample karyotyped for this genus. Brazil: Bahia: 1 – Una; Espírito Santo: 2 – Santa Teresa; 3 – Domingos Martins; 4 – Ibitirama; Rio de Janeiro: 5 – Itatiaia; Minas Gerais: 6 – Luminárias; São Paulo: 7 – São João da Boa Vista; 8 – Santa Virgínia; 9 – Salesópolis; 10 – Biritiba Mirim; 11 – Ibiuna; 12 – Cotia; 13 – Piedade; 14 – Tapiraí; 15 – Pilar do Sul; 16 – Itapetininga; 17 – Ribeirão Grande; 18 – Capão Bonito; 19 – Sete Barras; 20 – Iguape; Paraná: 21 – Ortigueira; 22 – Piraquara; Santa Catarina: 23 – Blumenal ; Rio Grande do Sul: 24 – Maquiné; Argentina: 25 – Misiones 21

Figure 1.2. Karyotypic diversity of *Thaptomys* showing the variation of Robertsonian fusions between the five new karyotypes. **a.** Karyotype of male with $2n=48/FN_A=52$, with larges submetacentric and metacentric pairs, homozygote by centric fusion Rb1+15 and Rb3+4. **b.** $2n=49a/FN_A=52$, with large submetacentric pair Rb1+15, one large metacentric chromosome Rb3+4 and one of each 3 and 4 chromosomes. **c.** $2n=49b/FN_A=52$, with one large submetacentric chromosome Rb1+15, one of each 1 and 15 chromosomes and large metacentric pair Rb3+4. **d.** $2n=50/FN_A=52$, with both Rb1+15 and Rb3+4 rearrangements in heterozygosis. **e.** $2n=51/FN_A=52$, with one large submetacentric chromosome Rb1+15, one of each 1 and 15 chromosomes and 3 and 4 chromosomes pairs. **f-k.** Chromosome painting confirming the Robertsonian fusions that originate the Rb1+15 and and Rb3+4 chromosomes. 26

Figure 1.3. G- and C-banded karyotypes of *Thaptomys* indicating the hybridization signals of APA probes beside the chromosomes. **a.** $2n=52/FN_A=52$ (female). **b.** $2n=50/FN_A=48$ (female). **c.** $2n=49a/FN_A=52$ (female) and $2n=48/FN_A=52$ (inset). **d.** $2n=49b/FN_A=52$ C-banded, with heterochromatic blocks in centromeres regions of all chromosomes, in long arm of Y and heteromorphism detected in 8 pair (inset) 27

Figure 1.4. Ideogram and chromosome painting revealing the complex rearrangements in $2n=50/FN_A=48$ from the $2n=52/FN_A=52$ karyotype. **a.** $2n=52/FN_A=52$ basic karyotype with 2, 23 and 25 individual chromosomal pairs. **b.** The breaking points in centromere regions in the 2 pair, distal in 23 pair and uneven centric fission of each homologous of the small metacentric 25. **c.** Inversion and tandem fusion of each 25-derived arms to the acrocentric pairs 2 and 23, giving rise to 2+25 and 23+25 chromosomes. **d-g.** Chromosome painting using APA probes identifying the complex rearrangement described 29

Figure 1.5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with telomeric probe in *Thaptomys* karyotypes. **a.** $2n=52/FN_A=52$ showed signals in termini regions of all chromosomes. **b.** $2n=49a/FN_A=52$, with interstitial telomeric signals (ITS) in Rb1+15 and Rb3+4 (with the arrow). **c.** $2n=50/FN_A=52$, with ITS in Rb1+15. **d.** $2n=51/FN_A=52$, with ITS in Rb1+15. 30

➤ CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Localidades de coleta de exemplares de *Thaptomys nigrita* com material sequenciado no presente estudo. **Brasil:** 1. Una; 2. Santa Teresa, 3. Domingos Martins, 4. Ibitirama, 5. Fervedouro, 6. Catas Altas, 7. Ouro Preto, 8. Luminárias, 9. Minduri, 10. Itamonte; 11. Bananal; 12. Itatiaia; 13. Passa Quatro, 14. Ibiúna, 15. Cotia, 16. Piedade, 17. Tapiraí, 18. Pilar do Sul, 19. Iguape; 20. Capão Bonito, 21. Ribeirão Grande, 22. Piraquara; 23. Maquiné; **Argentina:** 24. Misiones. **Paraguai:** 25. San Raphael, 26. Limoy. 52

Figura 2.2. Divisão dos marcadores microssatélites para genotipagem multiplex de *Thaptomys nigrita* feita no programa Multiplex Manager. Em azul, marcadores microssatélites marcados com 6-FAM; em verde, com VIC; em amarelo, NED; em vermelho, PET. 58

Figura 2.3. Árvore filogenética obtida através da análise de Inferência Bayesiana com sequências parciais de 801pb do gene mitocondrial citocromo b de 176 espécimes de *Thaptomys*. Os números nos nós representam os suportes nas análises de Máxima Verossimilhança (*bootstrap*) e na Inferência Bayesiana as (probabilidades a posteriore), respectivamente. As cores dos haplótipos nos ramos terminais representam os três cariogrupos observados no gênero, onde vermelho são indivíduos com $2n=50/FN=48$, azul, $2n=48-51/FN=52$ e verde, $2n=52/FN=52$. Em preto, não há informação citogenética 61

Figura 2.4 Rede de haplótipos evidenciando o compartilhamento de haplótipos para o gene mitocondrial CytB (801pb) entre os 176 espécimes de *Thaptomys* ao longo de sua distribuição geográfica. Cada cor representa uma localidade (legenda). O tamanho de cada haplótipo é proporcional ao número de indivíduos. 63

Figura 2.5. Rede de haplótipos evidenciando o compartilhamento de haplótipos entre os espécimes de *Thaptomys*, com base nas informações cariotípicas dos espécimes utilizados. Cada cor representa um cariogruppo, sendo vermelho 2n=50/FN=48; verde, 2n=52/FN=52; e azul, 2n=48-51/FN=52. Em preto, espécimes de Misiones (Argentina), San Raphael e Limoy (Paraguai), que foram utilizados como representativos para abranger a maior distribuição geográfica possível. Em cinza, animais de Minduri (Minas Gerais) que formam o clado irmão dos grupos externos nas análises filogenéticas..... 64

Figura 2.6. Estrutura populacional em *Thaptomys* determinada pela análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) a partir dos 801pb do gene mitocondrial citocromo b. Podem ser observadas 8 populações, que são representadas por cores distintas: **vermelho** (1 - Una-BA), **azul** (2 - Santa Teresa, 3 - Domingos Martins, 4 - Ibitirama – ES; 12 - Itatiaia – RJ; 5 – Fervedouro, 7 - Ouro Preto, 6 - Catas Altas – MG; 11 - Bananal – SP), **laranja** (10 - Itamonte, 8 - Luminárias, 13 - Passa Quatro – MG; 15 - Cotia, 14 - Ibiúna, 16 - Piedade e 17 - Tapiraí – SP), **cinza** (9 – Minduri – MG), **roxo** (18 - Pilar do Sul – SP), **preto** (27 – São João da Boa Vista – SP), **marrom** (23 – Maquiné – RS) e **verde** (19 – Iguape, 20 – Capão Bonito e 21 – Ribeirão Grande – SP; 22 – Piraquara – PR; 24 – Misiones – Argentina; 25 – San Raphael e 26 – Limoy – Paraguai)..... 66

Figura 2.7. Gráficos *boxplots* mostrando o número de homozigotos esperados para cada alelo nos indivíduos do presente estudo para os marcadores Aaz1 e L1. Pontos pretos indicam *outliers*, enquanto os vermelhos indicam o número de homozigotos para cada alelo. Pontos vermelhos acima das linhas verticais nos *boxplots* indicam excesso de homozigotos para cada alelo 67

Figura 2.8. Análise de Componente Principal (PCoA) mostrando a organização das localidades em dois grandes grupos com ampla distribuição geográfica, de acordo com os dados de microssatélites (6 loci). Em destaque, em preto, as amostras de Tapiraí e Cotia (SP),

que estão no “Grupo S”, diferindo dos dados obtidos nas filogenias moleculares com o gene mitocondrial *Cytb* (801pb)..... 71

Figura 2.9. Estruturação geográfica com $k = 5$ populações para *Thaptomys* ao longo da distribuição geográfica para o gênero, a partir da análise realizada no programa Structure com os genótipos de microssatélites (6 *loci*). Cada barra representa um indivíduo e as cores são as probabilidades deles pertencerem a um grupo ou outro. Barras pretas e siglas (abaixo) representam as localidades das amostras, segundo a Tabela 2.2. 72

Figura 2.10. Estruturação geográfica de *Thaptomys* ao longo da sua distribuição geográfica na Mata Atlântica por diferentes metodologias. No mapa estão as populações determinadas pela Análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) a partir de sequências parciais (801pb) do gene mitocondrial *Cytb*, as quais apresentam cores específicas; o ramo representa o grupo norte recuperado nas filogenias moleculares a partir do mesmo conjunto de dados no teste de SAMOVA; e o bar plot, evidencia as cinco populações recuperadas pelos dados dos seis *loci* de microssatélites, em que se observa uma diferenciação norte-sul dos indivíduos analisados 73

Figura 2.11. Modelagem de nicho revelando as áreas de maior adequabilidade para *Thaptomys* ao longo da distribuição geográfica na Mata Atlântica e os cenários testados, considerando (a) todos os cariogrupos, (b) retirando os pontos de registro de espécimes com $2n=50/FN=48$, (c) retirando apenas os registros de animais com $2n=48-51/FN=52$ e (d), considerando apenas as localidades de espécimes com $2n=52/FN=52$ 75

Figura 2.12. Eletroferograma da sequência do gene mitocondrial Citocromo B de um espécime de Minduri (MG), como evidência da amplificação de *Numts*. Em destaque (contorno preto), posições com picos duplos e ambiguidade na composição das bases nitrogenadas. Abaixo, a ferramenta *Blast* utilizada para verificar a similaridade entre as sequências mitocondriais geradas e as presentes no *GenBank* 78

Figura 2.13. Proposta taxonômica para *Thaptomys* do presente estudo, sendo representado por duas espécies: (I) *Thaptomys* sp1, com $2n=50/FN=48$, exclusivo de Una, na Bahia (vermelho); e (II) *Thaptomys nigrita*, apresentando polimorfismo cromossômico, com $2n=48-52/FN=52$ (azul, amarelo e verde), com três subespécies, sendo (III) *Thaptomys nigrita* ssp1, com $2n=48-51/FN=52$, exclusiva de Luminárias, em Minas Gerais (amarelo),

(IV) <i>Thaptomys nigrita nigrita</i> (subespécie nominotípica; em azul), ocorrendo de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP) e (V) <i>Thaptomys nigrita subterraneus</i> (verde), de Pilar do Sul (SP) à San Rapheal (Paraguai).....	88
---	----

RESUMO

Thaptomys Thomas, 1916 é um gênero de roedor monotípico endêmico da Mata Atlântica. Apesar da baixa diferenciação morfológica, dados citogenéticos e moleculares sugerem uma diversidade subestimada para esse táxon. Assim, o presente trabalho testou a hipótese de que *Thaptomys* não seja monotípico, a partir de uma análise integrativa, com dados citogenéticos, morfométricos (dados secundários), moleculares e de modelagem de nicho, realizando uma revisão taxonômica ampla para o gênero. Foram analisados 201 espécimes (141 cariotipados) de 26 localidades, desde Una/BA até San Raphael, no Paraguai. Bandeamento G e C, FISH com sondas teloméricas e pintura cromossômica permitiram a caracterização de cinco cariótipos novos, descritos pela primeira vez: $2n=48/FN_A=52$, $2n=49a/FN_A=52$, $2n=49b/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=52$, $2n=51/FN_A=52$. Nossos dados sugerem que rearranjos do tipo fusões cêntricas de quatro pares acrocêntricos (1+15 e 3+4) geraram um par metacêntrico e outro submetacêntrico grandes, em combinações homozigóticas e heterozigóticas em $2n=48-51/FN_A=52$. Além disso, investigamos mais detalhadamente os mecanismos de diferenciação entre os cariótipos de $2n=50/FN_A=48$ e $2n=52/FN_A=52$ através da pintura cromossômica, e identificamos um rearranjo complexo envolvendo fissão cêntrica desigual de cada homólogo do metacêntrico 25 pequeno, seguido de uma fusão em *tandem* de cada braço derivado do 25 nos pares acrocêntricos 2 e 23. As análises filogenéticas (*Cytb*) recuperaram um “Clado Norte” de abrangência geográfica ampla, desde Una/BA ($2n=50/FN_A=48$), Luminárias/MG ($2n=48-51/FN_A=52$), até Tapiraí/SP ($2n=52/FN_A=52$) e as demais amostras formaram uma politomia (“Sul”), desde Tapiraí/SP ($2n=52/FN_A=52$) a San Raphael e Limoy (Paraguai, sem cariótipo), que divergiram em 2,15%. Espécimes com diferentes cariótipos não foram recuperados como monofiléticos, embora espécimes com $2n=50/FN_A=48$ tenham formado dois clados distintos e exclusivos. As análises populacionais (*CytB* e seis *loci* de microssatélite) indicaram Una/BA ($2n=50/FN_A=48$) como uma população distinta das demais, divergindo em 1,89% de $2n=52/FN_A=52$ e 1,2% de $2n=48-51/FN_A=52$, sem compartilhamento de haplótipos com outro cariótipo ou localidade. Morfologicamente, espécimes com $2n=48-51/FN_A=52$ não apresentaram nenhuma distinção daqueles com $2n=50/FN_A=48$ e $2n=52/FN_A=52$ e estão isolados geograficamente. A distribuição geográfica dos diferentes cariótipos mostra que eles nunca foram detectados em simpatria, que não há evidências de híbridos entre eles e que parecem estar isolados geograficamente, já que Una/BA ($2n=50/FN_A=48$) dista em 938 km de Luminárias/MG ($2n=48-51/FN_A=52$), e 500km de Santa Teresa/ES ($2n=52/FN_A=52$). A fixação de um rearranjo cromossômico com alta frequência em uma população, como as fissões cêntricas e fusões em *tandem*, observados em espécimes com $2n=50/FN_A=48$, acarretaria na separação das populações de *Thaptomys* em subgrupos não intercruzantes (com e sem o rearranjo cromossômico), representando uma barreira ao fluxo gênico, como sugerido no modelo de especiação peripátrico. Assim, populações fundadoras de pequeno tamanho tenderiam a representar espécies distintas, sendo o cromossomo o fator desencadeador desse processo. A falta de resolução filogenética em recuperar espécimes com diferentes cariótipos como monofiléticos, somada à distinção morfológica sutil (não significativa), pode indicar um processo de especiação abrupto, deflagrado pelos rearranjos cromossômicos complexos em que as linhagens não tiveram tempo de acumular diferenças. Diante desses dados, propõem-se uma interpretação taxonômica bem mais complexa, em que *Thaptomys* seria representado por duas espécies, sendo (I) *Thaptomys* sp. n., com $2n=50/FN_A=48$, exclusivo de Una, na Bahia; e (II) *Thaptomys nigrita*, apresentando polimorfismo cromossômico, com $2n=48-52/FN_A=52$, com três subespécies, sendo (III) *Thaptomys nigrita* ssp. n., com $2n=48-51/FN_A=52$, exclusiva de Luminárias, em Minas Gerais, (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (subespécie nominotípica; $2n=52/FN_A=52$), ocorrendo de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP) e (V) *Thaptomys nigrita subterraneus* ($2n=52/FN_A=52$), de Pilar do Sul (SP) à San Raphael (Paraguai).

Palavras-chave: especiação, citotaxonomia, taxonomia integrativa, Mata Atlântica.

ABSTRACT

Thaptomys Thomas, 1916 is a monotypic rodent genus endemic from Atlantic Forest. Despite the low morphological differentiation, cytogenetic and molecular data suggest an underestimated diversity for this taxon. Thus, the present work tested the hypothesis that *Thaptomys* is not monotypic, from an integrative analysis, with cytogenetic, morphometric (secondary data), molecular and niche modeling data, performing a broad taxonomic revision for the genus. We analyzed 201 specimens (141 cytogenetically) of 26 localities, from Una/BA to San Raphael, Paraguay. G and C banding, FISH with telomeric probes and chromosome painting allowed the characterization of five new karyotypes, described for the first time: $2n=48/FN_A=52$, $2n=49a/FN_A=52$, $2n=49b/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=52$, $2n=51/FN_A=52$. Our data suggest that centric fusions of four acrocentric pairs (1+15 and 3+4) generated a large metacentric and other submetacentric pairs, in homozygous and heterozygous conditions, combinations at $2n=48-51/FN_A=52$. In addition, we refined the mechanism of differentiation between karyotypes of $2n=50/FN_A=48$ and $2n=52/FN_A=52$, as a complex rearrangement involving unequal centric fission of each small metacentric 25 homologue, followed by a *tandem* fusion of each arm derived from 25 in the acrocentric pairs 2 and 23. Phylogenetic analyzes (*Cytb*) recovered a "Noth Clade" of wide geographic range, from Una/BA ($2n=50/FN_A=48$), Luminárias/MG ($2n=48-51/FN_A=52$) to Tapiraí/SP ($2n=52/FN_A=52$) and the other samples formed a polytomy ("South"), from Tapiraí/SP ($2n=52/FN_A=52$) to San Rafael and Limoy (Paraguay, without karyotype), which diverged by 2.15%. Specimens with different karyotypes were not recovered as monophyletic, although specimens with $2n=50/FN_A=48$ formed two distinct and exclusive clades. Population analysis (*CytB* and six microsatellite loci) indicated Una/BA ($2n=50/FN_A=48$) as a distinct population from the others, diverging in 1.89% from $2n=52/FN_A=52$ and 1.2% of $2n=48-51/FN_A=52$, without sharing of haplotypes with another karyotype or locality. Morphologically, specimens with $2n=48-51/FN_A=52$ did not present any distinction of those with $2n=50/FN_A=48$ and $2n=52/FN_A=52$ and that are geographically isolated. The geographic distribution of the different karyotypes shows that they were never detected in sympatry, that there is no evidence of hybrids between them and that they seem to be geographically isolated, since Una/BA ($2n=50/FN_A=48$) is distant in 938 km of Luminárias/MG ($2n=48-51/FN_A=52$), and 500km from Santa Teresa/ES ($2n=52/FN_A=52$). The fixation of a chromosomal rearrangement with a high frequency in a population, such as the central fissions and tandem fusions observed in specimens with $2n=50/FN_A=48$, would result in separation of *Thaptomys* populations into non interbreeding subgroups (with and without chromosomal rearrangement), representing a barrier to gene flow, as suggested in the peripatric speciation model. Thus, founding populations of small size would tend to represent distinct species, the chromosome being the triggering factor of this process. The lack of phylogenetic resolution in recovering specimens with different karyotypes as monophyletic, added to the subtle (not significant) morphological distinction, may indicate a process of abrupt speciation, started by complex chromosomal rearrangements in which the lineages did not have time to accumulate differences. In view of the data, a much more complex interpretation is proposed, in which *Thaptomys* would be represented by two species, being (I) *Thaptomys* sp. n., with $2n=50/FN_A=48$, exclusive from Una, Bahia; and (II) *Thaptomys nigrita*, presenting chromosomal polymorphism, with three subspecies, being (III) *Thaptomys nigrita* ssp. n with $2n=48-52/FN_A=52$, exclusive from Luminárias, Minas Gerais, (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (nominotypical subspecies; $2n=52/FN_A=52$), occurring from Santa Teresa (ES) to Tapiraí (SP) and (V) *Thaptomys nigrita subterraneus* ($2n=52/FN_A=52$), from Pilar do Sul (SP) to San Raphael (Paraguay).

Keywords: speciation, cytotaxonomy, integrative taxonomy, Atlantic Forest

CAPÍTULO 1

KARYOLOGICAL DIVERSITY REVEALS TWO EVOLUTIONARY PATHWAYS OF THE MONOTYPIC BLACKISH GRASS MOUSE *THAPTOMYS NIGRITA* (RODENTIA, SIGMODONTINAE)

Submetido à PlosOne (FI: 3,54. Qualis: A1)

Colombi VH¹, Ventura K², Passamani M³, Paresque R⁴, Yonenaga-Yassuda Y² and Fagundes V¹

¹Laboratório de Genética Animal, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Fernando Ferrari, 514, 29.075-910, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

²Laboratório de Citogenética de Vertebrados, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Travessa 14 - 05508-090 - São Paulo, Brazil.

³Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Av. Central, Caixa Postal 3037 – 37.200-000 - Lavras, MG, Brazil

⁴Laboratório de Anatomia, Centro Universitário do Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Rod. BR101-Norte, km 60, Litorâneo, 29.932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.

RESUMO

Thaptomys nigrita Lichtenstein, 1830 é uma espécie de roedor semifossorial com ampla distribuição geográfica em todo o sudeste do Brasil, no norte da Argentina e no leste do Paraguai. Esta espécie possui dois cariótipos: (I) $2n=52/FN_A=52$, que ocorre na maior parte da distribuição geográfica conhecida; e (II) $2n=50/FN_A=48$, observado em Una/Bahia, localidade mais ao norte com ocorrência da espécie. Os dados moleculares sugerem que cada cariótipo pertence a linhagens distintas, mas a morfologia não dá suporte para esta suposição. Aqui, foram analisados 141 espécimes cariotipados, explorou-se novas localidades e novas evidências foram reveladas para entender a evolução cariotípica em *Thaptomys*. Bandeamento G e C, FISH com sondas teloméricas e pintura cromossômica permitiram a caracterização de cinco cariótipos novos, descritos pela primeira vez: $2n=48/FN_A=52$, $2n=49a/FN_A=52$, $2n=49b/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=52$, $2n=51/FN_A=52$. Nossos dados sugerem que rearranjos do tipo fusões cênicas de quatro pares acrocênicos (1+15 e 3+4) geraram um par metacêntrico e outro submetacêntrico grandes, em combinações homozigóticas e heterozigóticas em $2n=48-51/FN_A=52$. Sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram detectadas nos cromossomos rearranjados. Além disso, refinamos o mecanismo de diferenciação entre os cariótipos de $2n=50/FN_A=48$ e $2n=52/FN_A=52$, como um rearranjo complexo envolvendo fissão cêntrica desigual de cada homólogo do metacêntrico 25 pequeno, seguido de uma fusão em *tandem* de cada um braço derivado do 25 nos pares acrocênicos 2 e 23. Os cariogrupos $2n=52/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=48$ e $2n=48-51/FN_A=52$ nunca foram detectados em simpatria e não há evidência de híbridos entre eles. Propomos que duas vias conduzem a diferenciação do cariótipo em *Thaptomys*. Além disso, a complexidade dos rearranjos nos levou a sugerir que não ocorre fluxo gênico entre os diferentes cariogrupos e que os rearranjos cromossômicos representam uma barreira reprodutiva. Nesse cenário, a possibilidade de que a diversidade em *T. nigrita* esteja subestimada, compreendendo duas ou mais espécies, continua uma questão aberta. No entanto, a eficácia dos cariótipos atuando como uma barreira reprodutiva deve ser considerada para investigações futuras por meio de análises morfológicas e filogenéticas.

Palavras-chave: citotaxonomia, Mata Atlântica, Akodontini, pintura cromossômica.

ABSTRACT

Thaptomys nigrita Lichtenstein, 1830 is a semifossorial rodent species with wide-ranging distribution throughout southeastern Brazil, northern Argentina and eastern Paraguay. This species has two karyotypes: (I) $2n=52/FN_A=52$, which occurs in almost all known distribution areas; (II) $2n=50/FN_A=48$, observed in Una/Bahia, the northernmost locality of the species. Molecular data suggests that each karyotype belongs to distinct lineages, but morphology does not support this assumption. Here, we analyzed 141 karyotyped specimens, explored new localities and brought some new evidences to understand the karyotype evolution in *Thaptomys*. G- and C-banding, FISH with telomeric probes and chromosome painting allowed the characterization of five new karyotypes, described for the first time: $2n=48/FN_A=52$, $2n=49a/FN_A=52$, $2n=49b/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=52$, $2n=51/FN_A=52$. Our data suggest that in tandem rearrangements of four acrocentric pairs (1+15 and 3+4) generated two large metacentric and submetacentric pairs in homozygous and heterozygous combinations in $2n=48-51/FN_A=52$ karyotypes. Interstitial telomeric sequences (ITS) were detected. Also, we refined the mechanism of karyotype differentiation of $2n=50/FN_A=48$ from $2n=52/FN_A=52$, as a complex rearrangement involving uneven Robertsonian rearrangements of each homologous of the small metacentric 25, followed by an inverted tandem fusion of each 25-derived arm to the acrocentric pairs 2 and 23. The karyogroups $2n=52/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=48$ and $2n=48-51/FN_A=52$ have never been detected in sympatric, and there is no evidence of hybrids between them. We propose that two pathways drove karyotype differentiation in *Thaptomys*. Moreover, the complexity of the rearrangements led us to assert that no gene flow occurs among karyopopulations and the karyotype represents a reproductive barrier. In this scenario, the possibility that *T. nigrita* might be composite, embracing two or more species, remains an open question. However, the effectiveness of the reproductive barrier shaped by karyotype divergence should be considered in the future, and this would be evidenced by morphological and phylogenetics traits.

Keywords: cytotaxonomy; Atlantic Forest; Akodontini; chromosome painting.

1. INTRODUÇÃO

The majority of studies in *Thaptomys nigrita* Lichtenstein, 1830 have focused on phylogenetic hierarchy, morphological variation and karyotype description. Much less is known about the chromosomal change mechanisms that engender new karyotypes. *T. nigrita* has been to date associated with an invariable diploid number ($2n$) and fundamental number (FN_A) $2n=52/FN_A=52$ karyotype, composed of 24 acrocentric and one small metacentric autosomic pairs, X acrocentric and Y submetacentric, occurring in all known distribution areas of the species (Yonenaga 1975; Souza 1981; Fagundes 1993; 1997; Paresque et al. 2004).

However, in 2004, a distinct karyotype with $2n=50$ and $FN_A=48$ was described for the northernmost record of distribution for the species, at the municipality of Una (Bahia, Brazil), located at sea level, near the seashore. The sample from Una differed from others by having 24 acrocentric autosomic pairs and no small metacentric pair (Ventura et al. 2004). Preliminary phylogenetic studies found two clades, each one associated to a karyotype, and the disruptive distribution of the karyotypes invoked the existence of a new species for the genus distinguished by the karyotype (Ventura et al. 2010).

T. nigrita is a 50-g semifossorial sigmodontine rodent with wide-ranging distribution in southeastern Brazil, Argentina and eastern Paraguay (de la Sancha et al. 2017; Teta, Pardiñas and D'Élia 2015). It has low vagility, the home range of the species is assumed as less than 100 meters (Hershkovitz 1998), and it has been found in mountain fields, mountain scrub, primary and secondary forest (Bonvicino *et al.* 2002). Morphological analyses revealed slight variations in qualitative and quantitative features of external and cranial morphology of representatives of the whole geographic distribution from Brazil, including Una (Moreira and Oliveira 2011). However, morphology did not support the split of the species into two (Moreira and Oliveira 2011), each one associated with a different karyotype, as proposed by Ventura et al. (2010).

Considering that differences in karyotypes may act as a genetic barrier to avoid the crossbreeding of $2n=52$ and $2n=50$ individuals, the chromosomal rearrangements that cause the diversification of karyotypes can be associated with the process of speciation, as evoked by King (1993).

In fact, once the chromosome rearrangement processes are acknowledged and are reasonably considered, the postzygotic reproductive barrier model can be inputted as key in *Thaptomys* species evolution. Thus, in the present study, we mapped the chromosomal rearrangements using chromosome painting and telomeric probes and discussed the trends of karyotypic evolution in the genus.

2. MATERAIS E MÉTODOS

Karyotyping was applied to 141 specimens from 25 localities in eight Brazilian states and one province of Argentina (Figure 1.1; Table 1.1). Metaphases were obtained from *in vivo* bone marrow or *in vitro* fibroblast culture cells, and analyses were performed using a Nikon Eclipse 50i microscope equipped with a Spectral Imaging monochromatic digital camera and the software Case Data Manager 6.0 – Bandview. Comparative analysis of the karyotypes was based on differential chromosomal staining (G- and C-banding), Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) with telomeric probes ("All Telomere Probes", Oncor or "Telomere PNA FISH Kit/Cy3 - K 5326", Dako) and chromosome painting with cross-species probing. The probe generation of chromosome painting from species-specific *Akodon paranaensis* (APA; $2n=44$) was performed by flow-sorted chromosomes at the Molecular Cytogenetics Laboratory at University of Cambridge, UK, following Telenius et al. (1992), Yang et al. (1995) and Ventura et al. (2009). *In situ* hybridization of the APA probes was performed as previously described (Yang et al. 1995). Briefly, 1 μ L of labeled PCR product were denatured at 37 °C for 30 min, and dropped onto slides that were denatured in 70% formamide/2 $\times$ saline sodium citrate (SSC) at 65 °C for 2 min. The cross-species hybridization was performed for 48–72 h at 37 °C. Post hybridization washes included 2 $\times$ 5-min incubations in 50% formamide/2 $\times$ SSC at 42 °C followed by 2 $\times$ 5-min incubations in 2 $\times$ SSC and submerged for 4 min in 4 $\times$ T (100 mL 20 $\times$ SSC+400 mL H₂O+250 μ L Triton X-100 Sigma-Aldrich). The biotinylated probes were detected with avidin-Cy3 for single-color or avidin-Cy5 for multicolor FISH whereas FITC-labeled probes were visualized with rabbit anti-FITC, followed by goat anti-rabbit antibody on both procedures. All slides were counterstained with DAPI diluted with Vectashield and analyzed under a Zeiss Axiophot fluorescence microscope equipped with software for image capture system (Isis karyotyping system, MetaSystems).

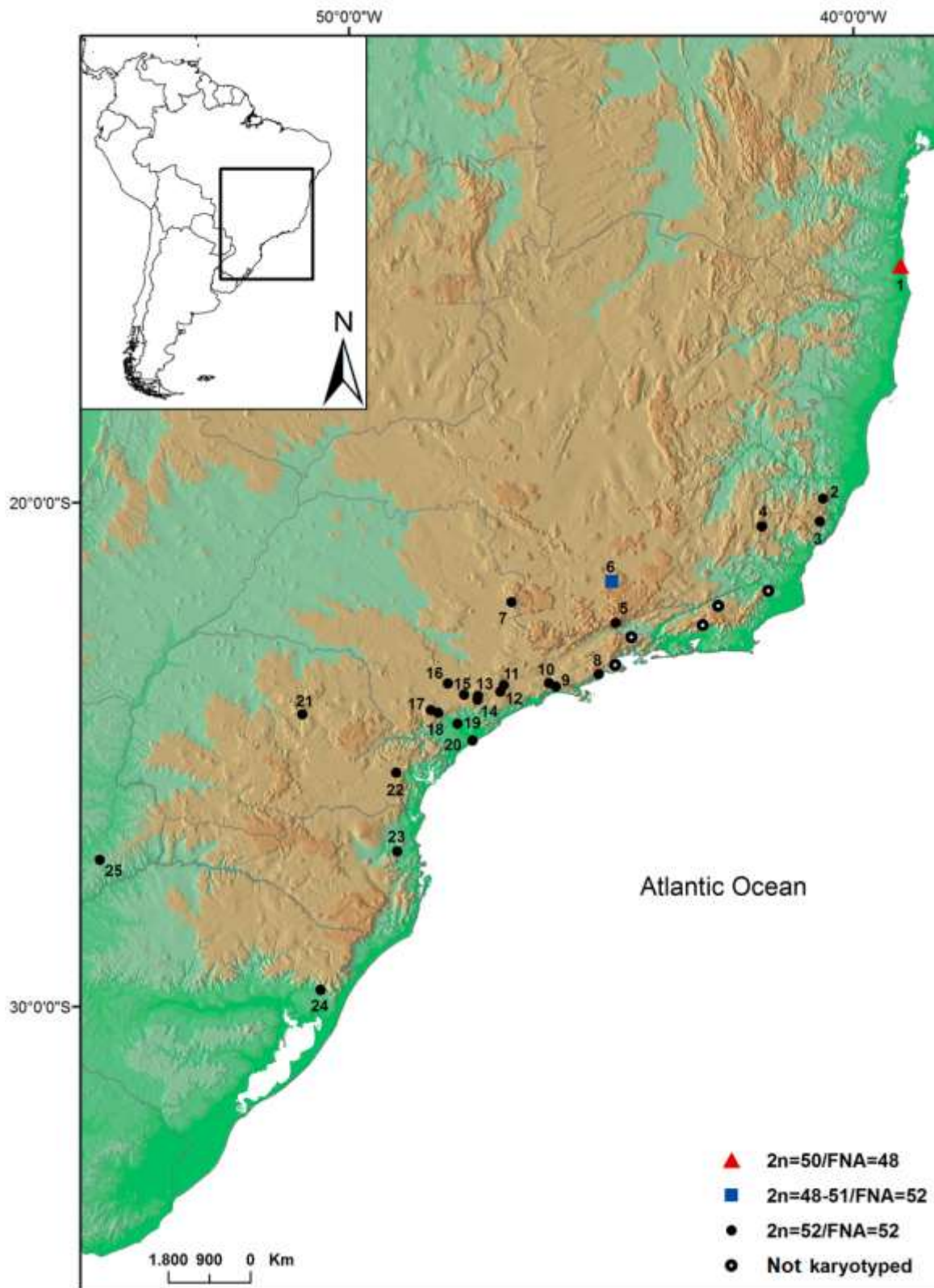


Figure 1.1. Localities of 141 specimens of *Thaptomys* sampled in the present study, representing the greatest sample karyotyped for this genus. **Brazil:** **Bahia:** 1 – Una; **Espírito Santo:** 2 – Santa Teresa; 3 – Domingos Martins; 4 – Ibitirama; **Rio de Janeiro:** 5 – Itatiaia; **Minas Gerais:** 6 – Luminárias; **São Paulo:** 7 – São João da Boa Vista; 8 – Santa Virgínia; 9 – Salesópolis; 10 – Biritiba Mirim; 11 – Ibiuna; 12 – Cotia; 13 – Piedade; 14 – Tapiraí; 15 – Pilar do Sul; 16 – Itapetininga; 17 – Ribeirão Grande; 18 – Capão Bonito; 19 – Sete Barras; 20 – Iguape; **Paraná:** 21 – Ortigueira; 22 – Piraquara; **Santa Catarina:** 23 – Blumenal ; **Rio Grande do Sul:** 24 – Maquiné; **Argentina:** 25 – Misiones.

Table 1.1. Karyotypes of *Thaptomys* with respective locality, number of individuals (sample) and references.

Country	State/Province	Locality	Karyotype ¹			References	
			Sample	2n*	FN _A		Autosomes
BRAZIL	Bahia	Una	7	50a	48	48A	Ventura et al. 2004; Present study
	Espírito Santo	Santa Teresa	17	52	52	48A+2m	Present study; Paresque et al. 2004
		Domingos Martins	4	52	52	48A+2m	Present study; Paresque et al. 2004
		Dores do Rio Preto	5	52	52	48A+2m	Present study
		Rio de Janeiro	Itatiaia	2	52	52	48A+2m
	Minas Gerais	Luminárias	3	48	52	2SM+2M+40A+2m	Present study
			2	49a	52	2SM+1M+42A+2m	Present study
			1	49b	52	1SM+2M+42A+2m	Present study
			1	50b	52	1SM+1M+44A+2m	Present study
			2	51	52	1SM+46A+2m	Present study
	São Paulo	Salesópolis	25	52	52	48A+2m	Yonenaga, 1972; Souza, 1981
		Tapiraí	3	52	52	48A+2m	Renata Pardini (personal communication)
		Biritiba Mirim	2	52	52	48A+2m	Ventura et al. 2010
		Pilar do Sul	2	52	52	48A+2m	Ventura et al. 2010
		Piedade	1	52	52	48A+2m	Renata Pardini (personal communication)
		São João da Boa Vista	1	52	52	48A+2m	Present study
		Ibiúna	3	52	52	48A+2m	Present study
		Cotia	4	52	52	48A+2m	Present study
		Iguape	24	52	52	48A+2m	Souza, 1981; Present study
		Itapetininga	1	52	52	48A+2m	Souza, 1981
	Paraná	Capão Bonito	1	52	52	48A+2m	Present study
		Ribeirão Grande	3	52	52	48A+2m	Present study
		Santa Virgínia	2	52	52	48A+2m	Di-Nizo et al. 2014
		Sete Barras	3	52	52	48A+2m	Fagundes, 1993
		Piraquara	7	52	52	48A+2m	Present study; Hass et al. 2011
		Ortigueira	3	52	52	48A+2m	Ventura et al. 2010
		Santa Catarina	Blumenau	2	52	52	48A+2m
	Rio Grande do Sul	Maquiné	9	52	52	48A+2m	Present study
ARGENTINA	Misiones	-	1	52	52	48A+2m	Suárez et al. 2015
TOTAL			141				

¹A=acrocentrics, SM=large submetacentrics, M=large metacentrics, m=small metacentrics.

* Sex chromosomes in all karyotypes are X=medium acrocentric and Y=small submetacentric.

3. RESULTADOS

Karyotype diversity

Our analyses showed seven karyotypes with five diploid numbers varying from $2n=48$ to 52 and two fundamental numbers, $FN_A=48$ and 52 (Table 1.1). The $2n=52/FN_A=52$ and $2n=50/FN_A=48$ karyotypes are identical to those already described, while five are described for the first time: $2n=48/FN_A=52$, $2n=49a/FN_A=52$, $2n=49b/FN_A=52$, $2n=50b/FN_A=52$ and $2n=51/FN_A=52$ (Figure 1.1a–e).

Twenty-seven chromosome pairs are acrocentric and invariable in all karyotypes (pairs 5 to 14 and 16 to 22 and 24 from $2n=52$, see Table 1.2), with decreasing variation in size. The sex chromosomes were also conserved in the karyotypes, as a medium acrocentric X and a small submetacentric Y, both easily distinct from the autosomes.

Variations are observed on seven pairs (1 to 4 and 15, 23 and 25 from $2n=52$ karyotype) that are involved in rearrangements, spawning distinct chromosomes constitutions in each karyotype, as follows. The $2n=52/FN_A=52$ karyotype (Figure 1.3a) has large acrocentric pairs 1–4, medium acrocentric pair 15, small acrocentric pair 23 and the small metacentric pair 25. The karyotype $2n=50/FN_A=48$ (Figure 3b) has large acrocentric pairs 1–4, small acrocentric pair 15, but does not have the small metacentric pair 25.

The karyotype $2n=48/FN_A=52$ (Figure 1.2a) has one large submetacentric pair, the result of a Robertsonian rearrangement (Rb) of chromosomes 1 and 15 (1+15) and one large metacentric pair, also a result of a Rb of chromosomes 3 and 4 (3+4). The Robertsonian rearrangements were confirmed after banding pattern analysis (Figure 3c). Also, it has the acrocentric pair 2 and the small metacentric pair 25.

The $2n=49a/FN_A=52$ (Figure 1.2b) has one submetacentric pair Rb1+15, one metacentric chromosome Rb3+4, one of each medium acrocentric pairs 3 and 4, the large acrocentric pair 2 and the small metacentric pair 25. The $2n=49b/FN_A=52$ (Figure 1.2c) has one metacentric pair Rb3+4, one submetacentric chromosome Rb1+15, one of each medium acrocentric pairs 1 and 15, the large acrocentric pair 2 and the small metacentric pair 25. The $2n=50/FN_A=52$ (Figure 1.2d) consists of one Rb1+15, one Rb3+4, one of each acrocentric pairs 1, 3, 4 and 15, the acrocentric pair 2 and the small metacentric pair 25. The $2n=51/FN_A=52$ (Figure 1.2e) showed one large submetacentric Rb1+15, one of each acrocentric pairs 1 and 15, acrocentric pairs 2, 3 and 4, and the small metacentric pair 25.

The C-banding pattern revealed heterochromatic pericentromeric regions in all autosomes, in the X chromosome and in the long arm of the Y. The heteromorphism in the size of the heterochromatic block of pair 8 (Figure 1.3d) was found in about 20% of the 59 analyzed specimens, including specimens with $2n=52$, $2n=51$ and $2n=49a/FN_A=52$.

Table 1.2. Homologies among *Thaptomys nigrita* (TNI) karyotypes detected by chromosome painting of 23 *Akodon paranaensis* (APA; 2n=44) probes on 2n=52, 2n=50a and 2n=48-49a karyotypes.

Karyogroups			APA probes
2n=52/FN _A =52	2n=50/FN _A =48	2n=48-51/FN _A =52	
1 ^d	1 ^d	Long arm 1+15 ^d	APA 2
1 ^p	1 ^p	Long arm 1+15 ^p	APA 9
2	2 ^d	2	APA 4
3 ^p	3 ^p	Long arm 3+4 ^p	APA 15
3 ^d	3 ^d	Long arm 3+4 ^d	APA 18
4	4	Short arm 3+4	APA 5
5	5	5	APA 6
6	6	6	APA 1
7	7	7	APA 7
8	8	8	APA 8
9	9	9	APA 1
10	10	10	APA 3
11	11	11	APA 9
12	12	12	APA 3
13	13	13	APA 11
14	14	14	APA 12
15	15	Short arm 1+15	APA 13
16	16	16	APA 1
17	17	17	APA 14
18	18	18	APA 16
19	19	19	APA 17
20	20	20	APA 19
21	21	21	APA 10
22	22	22	APA 10
23	23 ^p	23	APA 20
24	24	24	APA 7
Short arm 25	2 ^p	Short arm 25	APA 21
Long arm 25	23 ^d	Long arm 25	
X	X	X	APA X
Y ^p	Y ^p	**	APA Y*

* Ventura et al. (2012). **Not analyzed. ^p proximal. ^d distal.

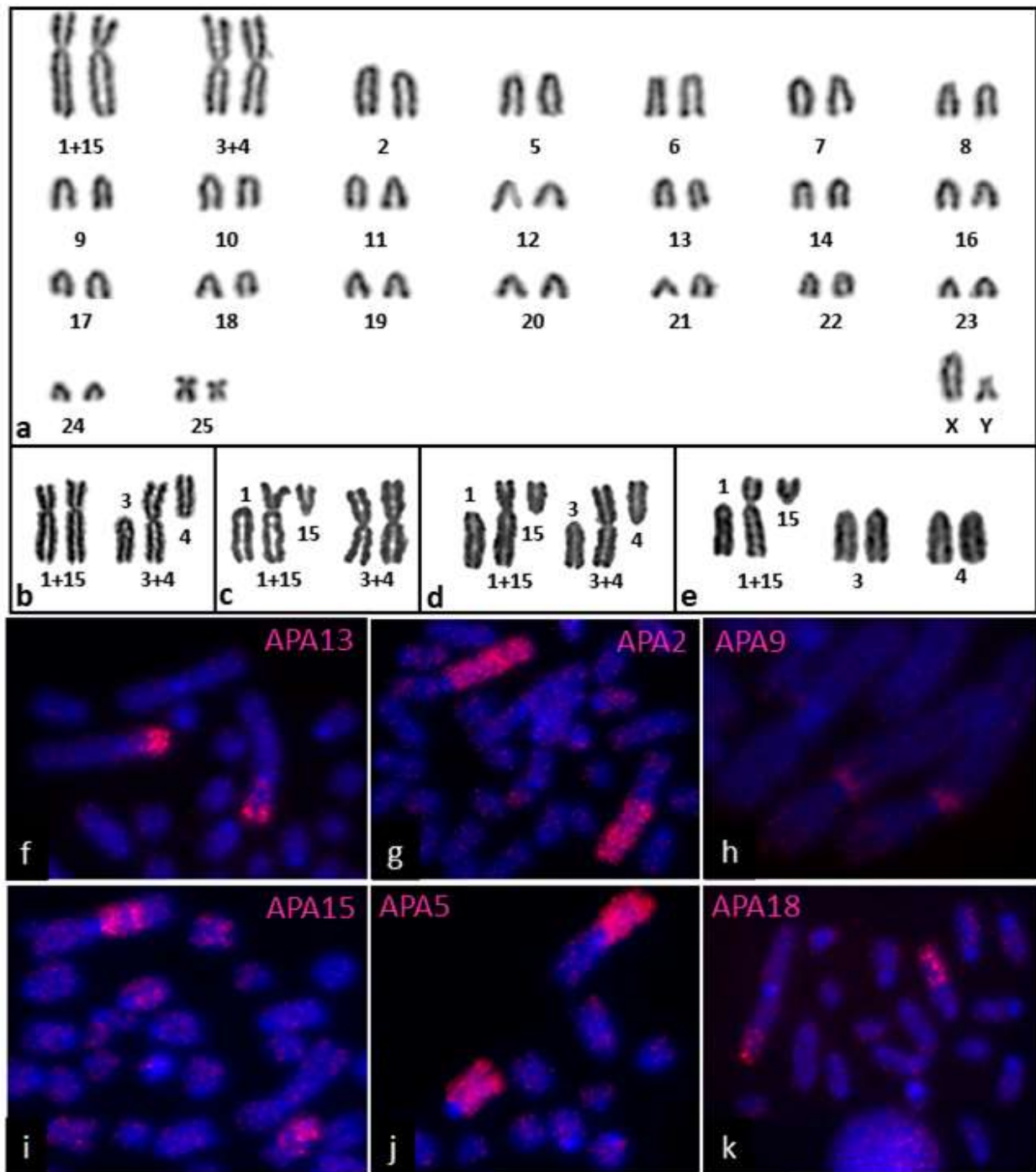


Figure 1.2. Karyotypic diversity of *Thaptomys* showing the variation of Robertsonian fusions between the five new karyotypes. **a.** Karyotype of male with $2n=48/FN_A=52$, with larges submetacentric and metacentric pairs, homozygote by centric fusion Rb1+15 and Rb3+4. **b.** $2n=49a/FN_A=52$, with large submetacentric pair Rb1+15, one large metacentric chromosome Rb3+4 and one of each 3 and 4 chromosomes. **c.** $2n=49b/FN_A=52$, with one large submetacentric chromosome Rb1+15, one of each 1 and 15 chromosomes and large metacentric pair Rb3+4. **d.** $2n=50/FN_A=52$, with both Rb1+15 and Rb3+4 rearrangements in heterozygosis. **e.** $2n=51/FN_A=52$, with one large submetacentric chromosome Rb1+15, one of each 1 and 15 chromosomes and 3 and 4 chromosomes pairs. **f-k.** Chromosome painting confirming the Robertsonian fusions that originate the Rb1+15 and and Rb3+4 chromosomes.

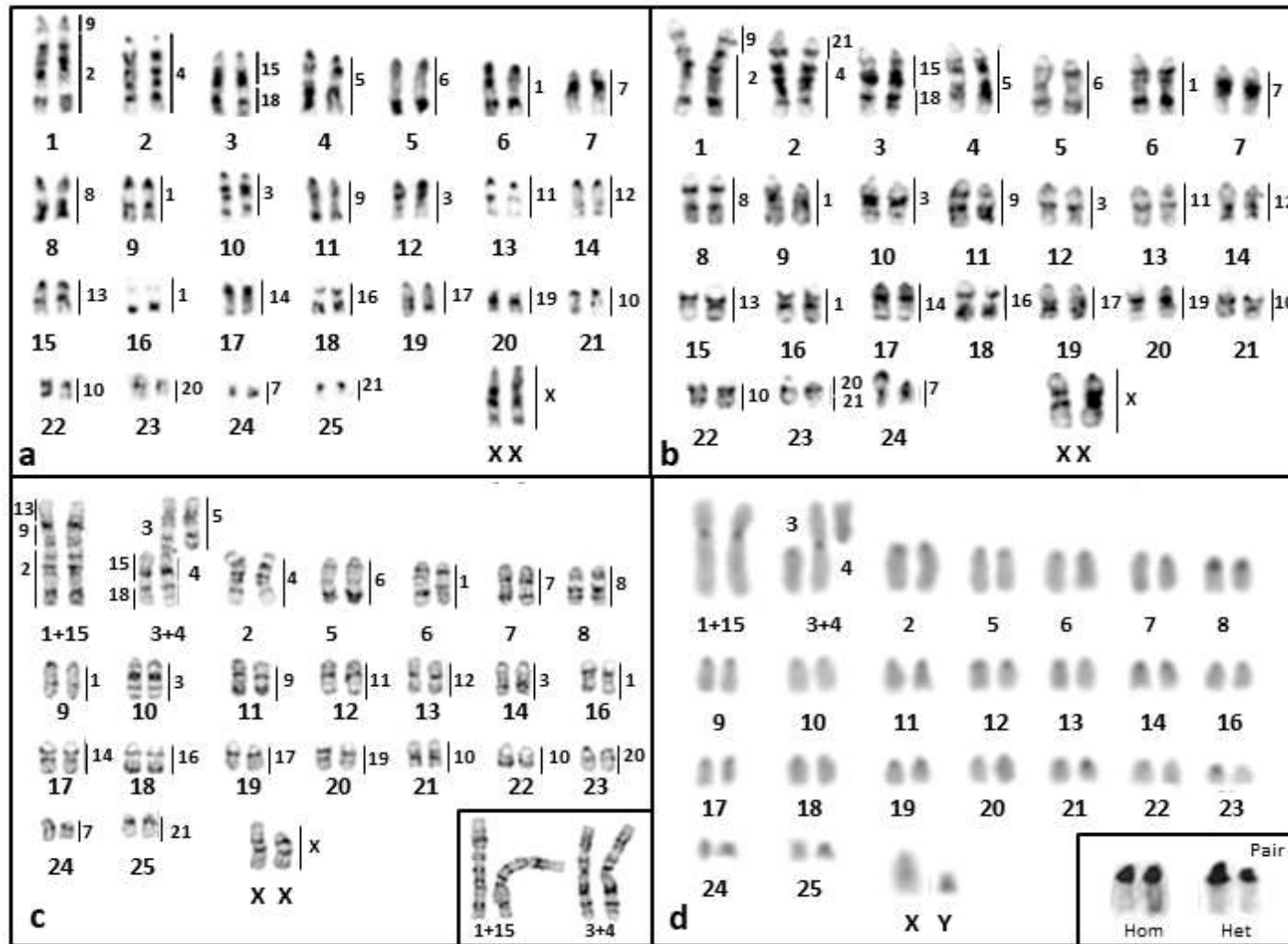


Figure 1.3. G- and C-banded karyotypes of *Thaptomys* indicating the hybridization signals of APA probes beside the chromosomes. **a.** $2n=52/FN_A=52$ (female). **b.** $2n=50/FN_A=48$ (female). **c.** $2n=49a/FN_A=52$ (female) and $2n=48/FN_A=52$ (inset). **d.** $2n=49b/FN_A=52$ C-banded, with heterochromatic blocks in centromeres regions of all chromosomes, in long arm of Y and heteromorphism detected in 8 pair (inset).

Chromosome painting

The chromosome painting analyses confirmed the Robertsonian rearrangements involving chromosomes 1 and 15, and 3 and 4 on $2n=48$ and 49 karyotypes (Figure 1.2f–k).

The painting of the 23 APA probes onto *Thaptomys nigrita* (TNI) chromosomes detected homologies (Table 1.2; Figure 1.3a–c) that confirmed the conserved chromosome segments in TNI karyotypes $2n=52/FN_A=52$ (TNI52), $2n=50/FN_A=48$ (TNI50), $2n=49a/FN_A=52$ (TNI49) and $2n=48/FN_A=52$ (TNI48).

The APA probe of chromosome 2 (APA2) hybridized distally onto the acrocentric autosome 1 of the TNI52 and TNI50 karyotypes. This segment is also homologous to the long arm of metacentric Rb1+15 of the TNI49 and TNI48 karyotypes. The APA9 probe painted the proximal regions of the acrocentric autosome 1 of the TNI52 and TNI50 karyotypes. The APA13 probe hybridized to the completely acrocentric autosome 15 on TNI52, TNI50 and to the short arm of Rb1+15 on the TNI49 and TNI48 karyotypes.

Similarly, the APA5 probe painted to the whole of autosome 4 on TNI52, TNI50 and the long arm of Rb3+4 on the TNI49 and TNI48 karyotypes (Figure 1.2j). APA15 hybridized proximally at autosome 3 on the TNI52 and TNI50 karyotypes and at the long arm of Rb3+4 on the TNI49 and TNI48 karyotypes (Figure 1.2i). The APA18 probe was painted on the distal regions of the same autosome (Figure 1.2k). Thus, painting probes confirmed the brachial homology suggested by GTG-banding on the new karyotypes.

APA4 mapped onto acrocentric pair 2 of the TNI52, TNI49 and TNI48 karyotypes and distally to acrocentric pair 2 of TNI50 (Figure 1.4d and 1.4f).

The APA21 probe painted onto the whole small metacentric 25 of the TNI52, TNI49 and TNI48 karyotypes (Figure 1.4d). Also, this probe painted the proximal portion of acrocentric pair 2 and the whole small acrocentric pair 23 of the TNI50 karyotype (Figure 1.4f–g). Thus, our data indicated that the small metacentric pair 25, which is rearranged in the $2n=50$ karyotype, split unevenly (Figure 1.4b), and the short arm was inverted and translocated proximal to centromere of acrocentric pair 2 (preserving the telomeres interstitially, as described by Ventura et al. 2004), and the long arm was tandemly fused to the long arm of pair 23 (Figure 1.4c).

Telomeric probe mapping

FISH with telomeric probes onto the karyotypes showed positive signals at the termini of all chromosomes (Figure 1.5) and at the pericentromeric region of the chromosomes Rb(1+15) and Rb(3+4) in the $2n=51$, $2n=50$ and $2n=48$ karyotypes.

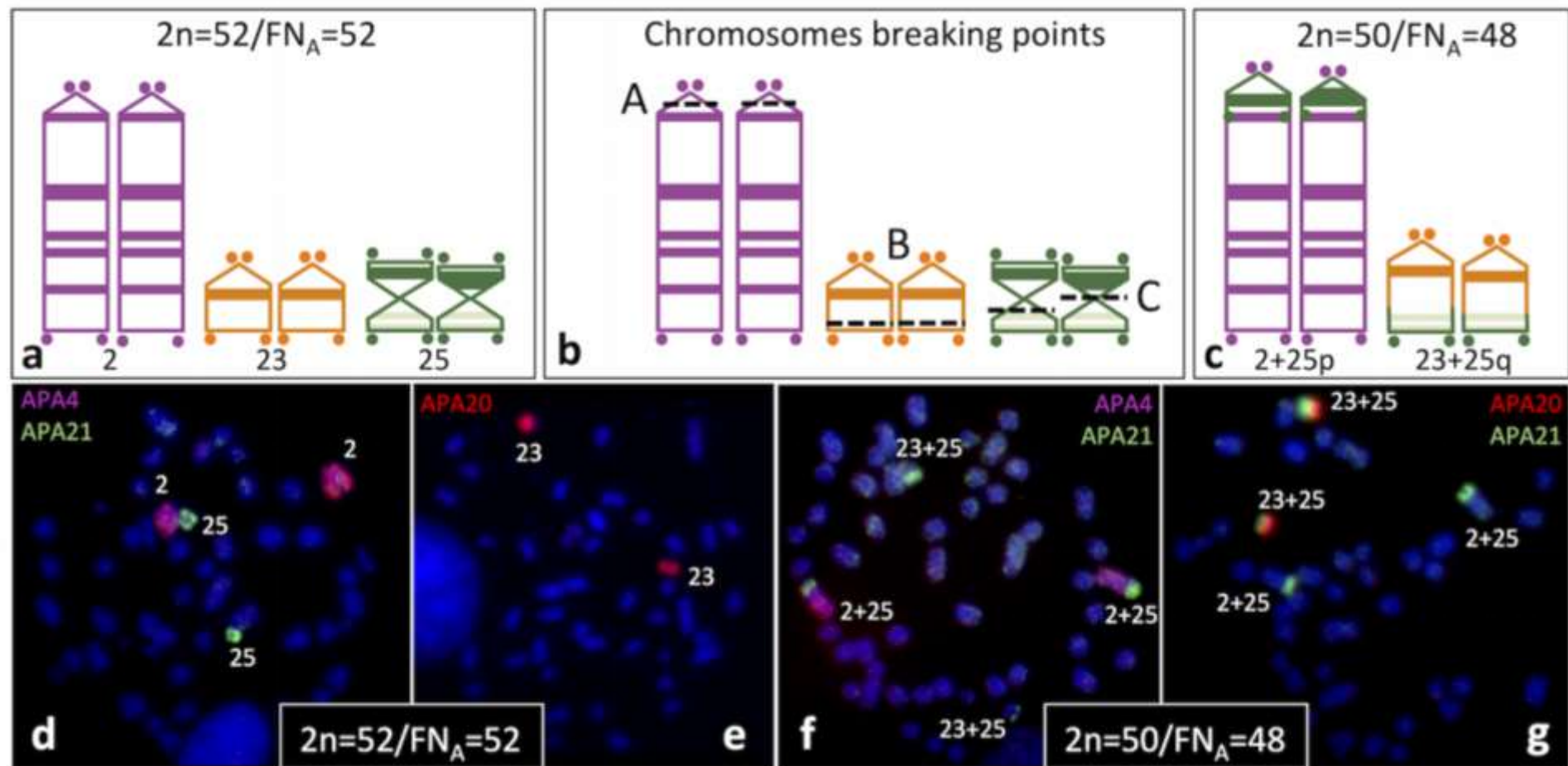


Figure 1.4. Ideogram and chromosome painting revealing the complex rearrangements in $2n=50/FN_A=48$ from the $2n=52/FN_A=52$ karyotype. **a.** $2n=52/FN_A=52$ basic karyotype with 2, 23 and 25 individual chromosomal pairs. **b.** The breaking points in centromere regions in the 2 pair, distal in 23 pair and uneven centric fission of each homologous of the small metacentric 25. **c.** Inversion and tandem fusion of each 25-derived arms to the acrocentric pairs 2 and 23, giving rise to $2+25$ and $23+25$ chromosomes. **d-g.** Chromosome painting using APA probes identifying the complex rearrangement described.

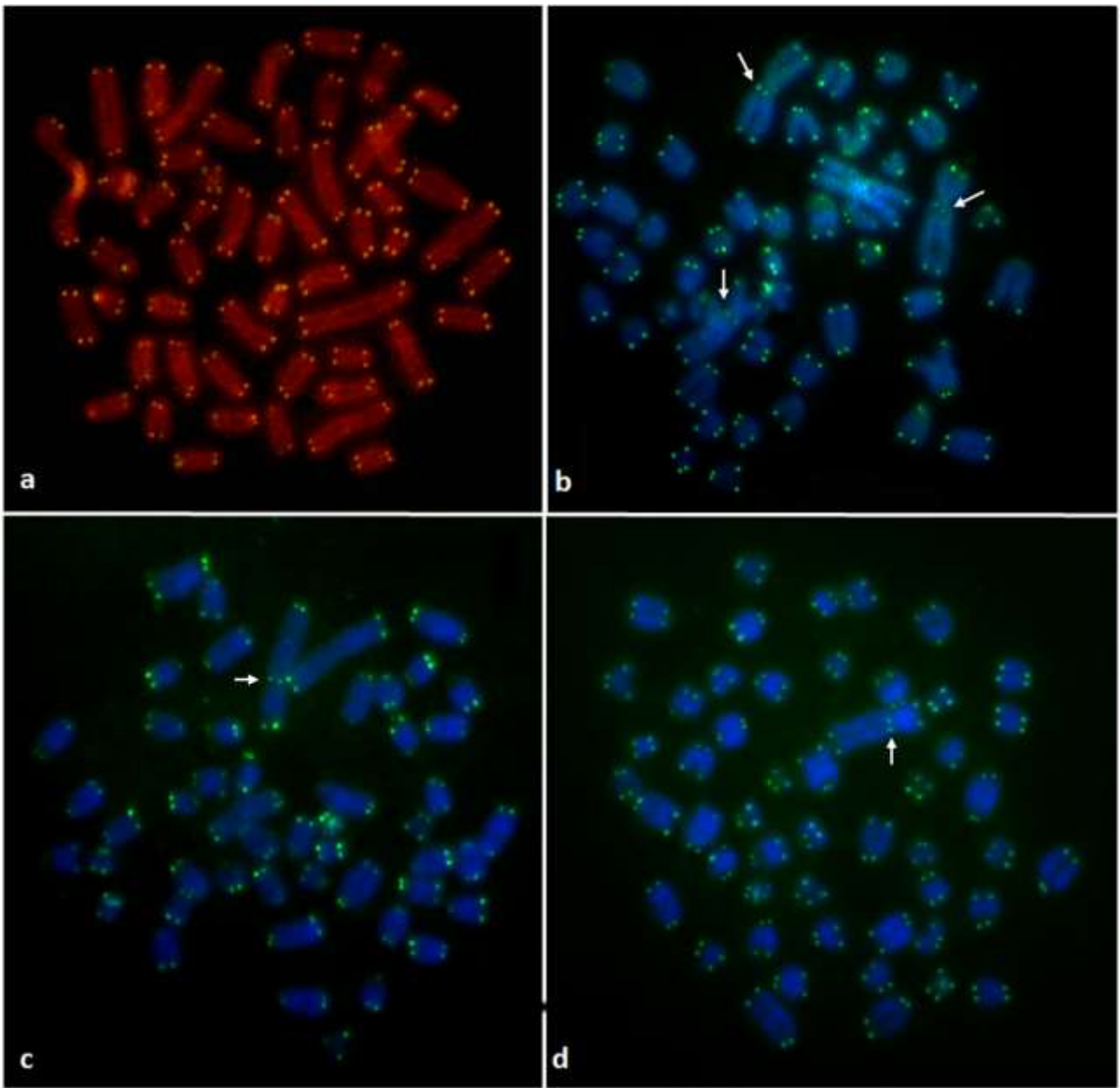


Figure 1.5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with telomeric probe in *Thaptomys* karyotypes. **a.** $2n=52/FN_A=52$ showed signals in termini regions of all chromosomes. **b.** $2n=49a/FN_A=52$, with interstitial telomeric signals (ITS) in Rb1+15 and Rb3+4 (with the arrow). **c.** $2n=50/FN_A=52$, with ITS in Rb1+15. **d.** $2n=51/FN_A=52$, with ITS in Rb1+15.

4. DISCUSSÃO

The first karyological analyses of *Thaptomys nigrita* focused on diploid number and chromosome morphology descriptions (Fagundes 1993). With the advent of chromosome banding and telomeric segment mapping by *in situ* hybridization, a new karyotype was described, and rearrangement interpretations led to the proposal of a putative new cryptic species driven by the karyotype (Ventura et al. 2004).

Here, we improved the description of more complex rearrangements, successfully using the ZOO-FISH technique with flow-sorted chromosome probes, described five new karyotypes and identified the rearrangements that shaped the new karyoforms. The five new karyotypes found in a new locality of Minas Gerais were unexpected, considering that *Thaptomys* has one karyotype widely distributed throughout its area of occurrence ($2n=52/FN_A=52$) and another exclusive from Una/Bahia ($2n=50, FN_A=48$). Our comprehensive revision of karyotyped specimens resumed 141 individuals from eight Brazilian states. The seven karyotypes were unevenly distributed: 89% were $2n=52/FN_A=52$; 5% were $2n=50/FN_A=48$ and 6% were $2n=48-51/FN_A=52$.

The Sigmodontinae subfamily (Rodentia, Cricetidae), where *Thaptomys* is included, features high karyological variability among species (Nagamachi et al. 2013; Ventura et al. 2012b; Silva et al. 1998), in accordance with the high diversity of species. Data from new localities has shown an increase in rodent species diversity, recorded as over 40% of almost 6399 species of mammals in the world (Musser and Carleton 2005; D'Elia et al. 2007; Salazar-Bravo et al. 2013; Patton et al. 2015; Burgin et al. 2018).

The $2n=52/FN_A=52$ karyotype is the most frequent and widely distributed and exclusive in most locality records for the species, except for two (localities 1 and 6 in Figure 1.1).

The $2n=50/FN_A=48$ karyotype has been exclusive to Una, in Bahia state (locality 1), the northernmost locality for the genus. A 540 km extension sampling gap is observed between the northern limit of the $2n=52/FN_A=52$ karyotype (Santa Teresa in Espírito Santo, locality 2) and Una, mostly due to unsuccessful collection rather than to the lack of fieldwork efforts, as also stated by Moreira and Oliveira (2011). Rodents of this genus have a semifossorial habit, reduced home range and are characteristic of environments with high altitude (Teta et al. 2015). In fact, beyond the northern region of Espírito Santo state, Santa Teresa and the Doce River, besides not having elevated regions, it is composed of lowlands and secondary vegetation, highly impacted by monocultures and livestock (IBGE 2004), with almost no remaining forest remnants, except in Reserva Biológica de Sooretama and Reserva Biológica Córrego do Veado, where *Thaptomys* has never been recorded. The samples collected in Una, a sea level location, are an exception to this pattern. Therefore, environmental and intrinsic aspects of the biology of these rodents can influence the occurrence and geographical distribution of the genus.

On the other hand, the karyotypes $2n=48-51/FN_A=52$ were sampled exclusively at Luminárias in Minas Gerais (locality 6), a locality at the distribution of *Thaptomys* with 800-m altitude, a transitional area between Semi-deciduous forest and Cerrado and, apart from Itatiaia in Rio de Janeiro (locality 5), for 190 km by the mountain ranges of Serra da Mantiqueira and Serra do Papagaio.

Each of the karyogroups $2n=52/FN_A=52$, $2n=50/FN_A=48$ and $2n=48-51/FN_A=52$ are exclusive their localities and were never recorded in sympatry. A critical appraisal of karyological evidence is crucial to test whether karyological discontinuity represents different species. The putative geographic isolation of karyotypes may reflect an incomplete sampling, however no evidence of hybridization between $2n=50/FN_A=48$, $2n=48-51/FN_A=52$ or $2n=52/FN_A=52$ was detected.

Previously, the $2n=50/FN_A=48$ was proposed by Ventura et al. (2004) as a pericentric inversion of the small metacentric pair 25 followed by a tandem fusion of the small acrocentric pair 24 with the large acrocentric pair 2. Their analysis was based on the G-banding homologies and the presence of ITS on the proximal region of acrocentric pair 2 in $2n=50/FN_A=48$ individuals from Una, Bahia. However, the use of additional techniques allowed us to better understand the mechanisms of karyotype differentiation.

In the present study, we used FISH with telomeric probes and chromosome painting to show that the rearrangement is more complex than that previously described. The sensitivity of the method reveals novelties that changed previous conclusions drawn from conventional comparative banding data (Di-Nizo et al. 2015; Ventura et al. 2009; Nie et al. 2012; Pokorná et al. 2015; de Oliveira et al. 2010, 2012; Kretschmer et al. 2014; Pieczarka et al. 2013; Sotero-Caio et al. 2013). Recently, publications have demonstrated that significant advances have been made in identifying large-scale patterns and processes of chromosomal evolution in mammals, principally through molecular cytogenetic and phylogenomic approaches (Wienberg 2004; Murphy et al. 2005; Ferguson-Smith and Trifonov 2007; Ruiz-Herrera, Farre and Robinson 2012).

4.1. Two evolutionary pathways for karyotype differentiation

Integrative cytogenetic analysis using banding, *in situ* with whole chromosomes and repetitive sequences (telomeres) probes allowed the detection of two karyological differentiation patterns in *Thaptomys*, in which the $2n=52/FN_A=52$ karyotype diverged into two lineages by distinct chromosome rearrangement pathways: (I) Robertsonian fission of the small metacentric pair (pair 25), followed by tandem fusion of each arm of two acrocentric pairs (2 and 23); and (II) Robertsonian fusion involving four acrocentric pairs generating two large biarmed chromosomes (Rb1+15 and Rb3+4), in hetero- and homozygous conditions.

These models invoke takeovers and replacements of chromosome arms, required for transition from one basic configuration to two other distinct and complexes. In our point of view, those three

karyoforms are incompatible and unable to breed in nature. In fact, once the chromosome rearrangement processes are acknowledged and are reasonably considered, the post-zygotic reproductive barrier model seems to be extremely powerful. Otherwise, the genome would require strong plasticity in the biological processes.

The unprecedented variation of *Thaptomys nigrita* karyotypes, exclusive to Minas Gerais, was detected in nine specimens with five forms: $2n=48$ ($n=3$), $2n=49a$ ($n=2$), $2n=49b$ ($n=1$), $2n=50$ ($n=1$) and $2n=51$ ($n=2$). The G-banding and chromosome painting analyses supported the hypothesis that the different combinations of centric fusions originated from acrocentric chromosomes, as previously observed for the basic karyotype $2n=52/FN_A=52$. Indeed, the combination of Rb1+15 and Rb3+4 in individuals also supports the idea that the rearrangements occurred independently in two autosome pairs (pair 1 plus 15, and 3 plus 4). The ITS at the pericentromeric portions on both derived banded Rb1+15 and Rb3+4 reinforces the hypothesis of differentiation by Robertsonian fusion rather than centric fission. In these circumstances, we also predict that the probability of occurrence of centric fission is very low, since (I) the frequency of the karyotype $2n=52$ is very high in all localities from Espírito Santo to Misiones; (II) the variant $2n=48-51/FN_A=52$ karyotypes are exclusive to peripheral localities to the whole distribution of the species (transition region between Atlantic Forest and Cerrado); (III) the event of fission requires that the basic karyotype of *Thaptomys nigrita* should be $2n=48$ and only by chance did the derived $2n=52/FN_A=52$ successfully spread throughout Brazil and Argentina, which seems unlikely since $2n=48$ was restricted to only a few specimens in one locality; and finally, (IV) there would need to be a coordinated amplification of new telomeres and centromeres for the birth of derivative chromosomes, which are very specific segments of DNA on each chromosome.

In literature, Robertsonian fusion (Rb) is commonly reported, but not among a single species (Dobigny et al. 2015). In the house mouse (*Mus musculus domesticus*), for example, the diploid numbers range from $2n=27$ to $2n=40$, due to the presence of up to seven different Rb metacentric chromosomes (Rb3.8, 4.14, 5.15, 6.10, 7.17, 9.11, 12.13) (Medarde et al. 2012).

Our analyses confirmed the maintenance of ITS due to the centric ($2n=52$ to $2n=48-51$ from Minas Gerais) and *in tandem* fusion rearrangements ($2n=52$ to $2n=50$ from Bahia). According to our hypothesis, the evolutionary events that differentiate karyotypes are recent enough to maintain the preserved telomeric sequences, so that the telomere probes are capable of detecting them as ITS. The proposal that the ITS regions are remnants of recent events has also been proposed for other taxa, such as *Necomys lasiurus* and *Akodon montensis* (Fagundes and Yonenaga-Yassuda 1998).

On the other hand, functionless segments in the chromosomes, such as ITS, may be subject to random changes and be modified over time, so that the FISH technique would not be able to detect them. Our chromosome painting data showed that two chromosomes of *Akodon paranaensis*, homeologous to *Thaptomys* (APA 2 and APA 9; Table 3), merged and resulted in chromosome 1 of

TNI52 or TNI50. In this case, no ITS was observed, despite the evidence of a fusion event. In this case, two proposals could be accepted: either the telomeres were lost in the fusion event or the telomeres were preserved and over time their sequences changed enough so that they could not be detected, as predicted by King (1993).

4.2. One or more species?

Currently, applying integrative approaches is the key to understand relationships and cross-links between recently separated species (Leaché et al. 2016; Potter et al. 2017). The combination of karyological, molecular and morphometric data suggest greater taxonomic diversity in the currently recognized single species *T. nigrita*.

Silva Gomes (2008) performed cytochrome b phylogenetic analysis with an 801-bp partial sequence and a broad geographic sampling that included Argentinian and Brazilian populations, and proposed that the Bahia ($2n=50$) and São Paulo ($2n=52$) populations correspond to distinctive species, with samples from Rio de Janeiro, Espírito Santo and Minas Gerais ($2n=52$) corresponding to *T. nigrita* and those from Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Misiones ($2n=52$) to *T. subterraneus*. Similarly, Ventura et al. (2010) suggested that the $2n=50/FN_A=48$ karyomorph was an undescribed species and $2n=52/FN_A=52$ was assumed as *T. nigrita*. This is because the mtDNA cytochrome-b sequences (1044 bp) recovered two main clades, each one associated to a karyomorph, while the southern clades ($2n=52$) were split into three subclades.

Moreira and Oliveira (2011) predicted that if reproductive isolation caused by the chromosomal differences between the $2n=50$ and $2n=52$ karyomorphs was coupled with phenotypic differentiation in the genus, they would expect to find similarities in the patterns of morphometric and karyological variation among samples. However, morphological data were contradictory to molecular data. The analyses of patterns of morphological variation in qualitative and morphometric data in *Thaptomys* were compared with karyological and molecular diversity data; two subtle morphometric groups of populations were revealed, at first glance, which were coincident to Bahia populations (with few individuals karyotyped with $2n=50/FN_A=48$) and to southern populations (with some individuals with $2n=52/FN_A=52$), but no qualitative aspect of craniodental morphology unambiguously distinguished them. A positive and significant association between geographical and both morphological and genetic distances suggested that the distinction between the two groups of the population followed an isolation by distance model. Following their findings, the authors were unable to reject the hypothesis that the differences found between northern and southern populations of *Thaptomys* simply constituted polymorphic populations of a widely distributed species.

Thus, morphology was shown to be a weak tool for *Thaptomys* differentiation. Moreira and Oliveira (2011) highlighted that both morphometric clusters suggested low levels of regionalization and a lack of clear geographical structuring of morphological diversity within *Thaptomys*.

The third karyotype constitution ($2n=48-51/FN_A=52$) added new evidence of karyotype diversity in the genus, but did not help to determine whether *T. nigrita* might be a composite comprising two or more species, because it was not included in either morphological or phylogenetic analysis. On the other hand, there is no doubt about the distinctiveness of the origin of each of the $2n=50$ and $2n=48-51$ karyotypes from the $2n=52$ basic constitution.

The effectiveness of a reproductive barrier can be tested using experimental crossbreeding; however, this approach is frequently dismissed, since the time and required infrastructure is complex to achieve. For predicting the pachytene figures in a hypothetical heterozygous breeding of $2n=50$ from Bahia and any $2n=52$ specimen, at least five chromosomes should be involved in a ring configuration, which is quite complex. A $2n=48$ and $2n=52$ breeding, on the other hand, would involve two trivalents in the pachytene figures. Both situations, even though one seems more complex than the other, require that processes like crossing-over suppression in rearranged segments and heterosynapsis, for instance, suppress meiotic segregation problems (Hale 1986; Hale and Greenbaum 1988; Sudman et al. 1989).

If chromosomal speciation via suppressed recombination occurs in nature, at least three main conditions must be met. First, chromosomal rearrangements must suppress recombination. Second, the suppression of gene flow within chromosomal rearrangements must have played a pivotal role in reproductive isolation. Finally, there must be chromosomal rearrangement differences between sister taxa (Faria and Navarro 2010).

Disregarding the chromosomal speciation process, the chromosomal rearrangements can be considered polymorphisms in cases of structural alterations when the normal and rearranged forms are likely to occur simultaneously in the same region (Sumner 1990). In these circumstances, the karyotypic differences would be considered geographical chromosomal intraspecific differences in disjunctive populations that have distinct karyotypes, with and without rearrangement.

In *Thaptomys* we failed to find natural hybrids, and although the five new karyotypes from Luminárias, Minas Gerais occurred in a polymorphic population configuration, each karyogroup showed a disjunct distribution, wherein the different karyotypes are geographically isolated and far from each other. These observations make sibling species – species that are morphologically similar but reproductively isolated (and sometimes as genetically distant as any other pair of species) – good candidates for studying the chromosomal speciation process. This is especially observed in *Thaptomys*, since specimens of different karyotypes did not show significant morphological divergence (Moreira and Oliveira 2011).

Dobigny et al. (2015) postulated that there is an extensive karyotypic diversity among extant species, that genomic reorganization (shuffling) in mammals is often rapid, and many closely related species possess different karyotypes, indicating that chromosomal differentiation often occurs during or shortly after cladogenesis. They also listed some suggestions that structural chromosomal change may be central to many evolutionary processes, including adaptation and speciation.

The lack of floating (or transient) tandem fusion polymorphisms suggests that new variants fix rapidly (thus founding a new evolutionary lineage) or are lost extremely quickly, possibly within a few generations (Elder and Hsu 1988). This may be favored in species with a metapopulation structure, where local extinctions may facilitate extreme founder events during recolonization processes (Michalakis and Olivieri 1993; Dobigny et al. 2015). Recently, the literature has indicated that significant advances have been made in identifying large-scale patterns and processes of chromosomal evolution in mammals, mainly through molecular cytogenetic and phylogenomic approaches (Wienberg 2004; Murphy et al. 2005; Ferguson-Smith and Trifonov 2007; Ruiz-Herrera, Farre and Robinson 2012). Although tandem fusions are expected to be rare due to their strong underdominance, sister species differentiated by tandem fusions have been recorded for several genera, (such as *Mastomys*: Volobouev et al. 2002; *Taterillus*: Dobigny et al. 2005; *Muntiacus*: Huang et al. 2006; *Juliomys*: Paresque et al. 2009; *Phyllomys*: Leite et al. 2008; *Deltamys*: Ventura et al. 2011).

In this scenario, the possibility that *T. nigrita* might embrace two or more species remains an open question. However, we should consider the effectiveness of the reproductive barrier shaped by karyotype divergence, and this would be evidenced by morphological and phylogenetic traits in the future.

5. AGRADECIMENTOS

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD Scholarship (VHC), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for PostDoc Scholarship (KV). We also thank the institutions that funded this research: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) to VF; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to YYY, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to VF and Fundo de Apoio à Ciência e à Tecnologia de Vitória (FACITEC) to VF. We are grateful to the people who helped this work by sharing cytogenetic information: Lena Geise (UERJ), Alexandre Uarth Christoff (ULBRA), João Oliveira (UFRJ) and Renata Pardini (USP). Also to those who helped during fieldwork in Minas Gerais: Kassius Santos, Lorena Dinelli and Máira Leone.

6. REFERÊNCIAS

- Bonvicino CR, SM Lindbergh and LS Maroja (2002) Small non-flying mammals in altered and conserved areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology* 62:1–12.
- Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL and Upham NS (2018) How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy* 99:1—11. [<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>].
- D’Elía G, Pardiñas UFJ, Teta P and Patton JL (2007) Definition and diagnosis of a new tribe of Sigmodontine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71:187–194.
- de la Sancha NU, López-González C, D’Elía G, Myers P, Valdez L and Ortiz ML (2017) An annotated checklist of the mammals of Paraguay. *Therya* 8 (3): 241–260.
- de Oliveira EHC, Neusser M and Müller S (2012) Chromosome Evolution in New World Monkeys (Platyrrhini). *Cytogenet Genome Res* 137:259–272.
- de Oliveira EHC, Tagliarini MM, Rissino JD, Pieczarka JC, Nagamachi CY, O’Brien PCM and Ferguson-Smith MA (2010) Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of accipitridae (Aves, Falconiformes). *Chromosome Research* 18:349–355.
- Di-Nizo CB, Ventura K, Ferguson-Smith MA, O’Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y and Silva MJJ (2015) Comparative Chromosome Painting in Six Species of *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Karyotype Evolution of the Genus. *PLoS ONE* 10(2): e0117579. doi:10.1371/journal.pone.0117579.
- Dobigny G, Aniskin V, Granjon L, Cornette R and Volobouev V (2005a) Recent radiation of West African *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): the concerted role of climatic and chromosome changes. *Heredity* 95, 358–368.
- Dobigny G, Britton-Davidian J and Robinson TJ (2015) Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. *Biological Reviews* 1–21.
- Elder FFB and Hsu TC (1988) Tandem fusion in the evolution of Mammalian chromosomes. In *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements* (ed. A. A. Sandberg), pp. 481–506. Alan R. Liss, New York.
- Fagundes V (1993) Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V (1997) Contribuição da Citogenética Molecular no entendimento da evolução cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V 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.

- Faria R e Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology & Evolution* 25 (11): 660-669.
- Ferguson-Smith MA and Trifonov VA (2007) Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews Genetics* 8:950-962.
- Hale DW (1986) Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericentric inversions of the Sitka deer mouse. *Chromosoma* 94:425–436.
- Hale DW and Greenbaum IF (1988) Synapsis of a chromosomal pair heterozygous for a pericentric inversion and the presence of a heterochromatic short arm. *Cytogenet Cell Genet* 48:55-57.
- Huang L, Wang J, Nie W, Su W and Yang F (2006) Tandem chromosome fusions in karyotypic evolution of *Muntiacus*: evidence from *M. feae* and *M. gongshanensis*. *Chromosome Research* 14, 637–647.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Mapa de Biomas do Brasil. In: <http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/images/Mapa%20de%20Biomas%20do%20Brasil%202%20-%20IBGE.pdf>.
- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Changes*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kretschmer R, Gunski RJ, Garner ADV, Furo IdO, O'Brien PCM, et al. (2014) Molecular Cytogenetic Characterization of Multiple Intrachromosomal Rearrangements in Two Representatives of the Genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE* 9(7): e103338. doi:10.1371/journal.pone.0103338.
- Leaché AD, Banbury BL, Linkem CW and de Oca ANM (2016) Phylogenomics of a rapid radiation: is chromosomal evolution linked to increased diversification in north american spiny lizards (Genus *Sceloporus*)? *BMC Evol. Biol.* 16:63. doi: 10.1186/s12862-016-0628-x.
- Leite YLR, Christoff AU and Fagundes V (2008) A new species of Atlantic Forest tree rat, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 89:845–851.
- Medarde N, López-Fuster MJ, Muñoz-Muñoz F and Ventura J (2012) Spatio-temporal variation in the structure of a chromosomal polymorphism zone in the house mouse. *Heredity* 109:78–89.
- Michalakis Y and Olivieri I (1993) The influence of local extinctions on the probability of fixation of chromosomal rearrangements. *Journal of Evolutionary Biology* 6:153–170.
- Moreira JC and Oliveira JA (2011) Evaluating diversification hypotheses in the South American cricetid *Thaptomys nigrita* (Lichtenstein, 1829) (Rodentia: Sigmodontinae): an appraisal of geographical variation based on different character systems. *J Mamm Evol* 18(3):201-214.
- Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beever JE, Chowdhary BP, Galibert F, Gatzke L, Hitte C, Meyers SN, Milan D, Ostrander EA, Pape G, Parker HG, Raudsepp T, Rogatcheva MB, Schook LB, Skow LC, Welge M, Womack, JE, O'Brien SJ, Pevzner PA and Lewin HA (2005). Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 309, 613–617.
- Musser GG e Carleton MD (2005) *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference* (D.E. Wilson e D.M. Reeder, eds), Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

- Nagamachi CY, Pieczarka JC, O'Brien PCM, Pinto JA, Malcher SM, Pereira AL, Rissino JD, Mendes-Oliveira AC, Rossi RV and Ferguson-Smith MA (2013) FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of Oryzomyini (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype. *Chromosome Res* 21:107–119.
- Nie W, Wang J, Su W, Wang D, Tanomtong A, Perelman PL, Graphodatsky AS and Yang F (2012) Chromosomal rearrangements and karyotype evolution in carnivores revealed by chromosome painting. *Heredity* 108:17–27.
- Paresque R, Christoff AU e Fagundes V (2009) Karyology of the Atlantic forest rodent *Juliomys* (Cricetidae): A new karyotype from southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 32(2):301–305.
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL and Fagundes V (2004) Composição cariotípica de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 5-35.
- Patton JL, Pardiñas UFJ and D'Elía G (2015) Rodents. *Mammals of South America*, Volume 2.
- Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PCM, Yang F and Ferguson-Smith MA (2013) A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Res* DOI 10.1007/s10577-013-9365-9.
- Pokorná MJ, Trifonov VA, Rens W, Ferguson-Smith MA and Kratochvíl Lukáš Low rate of interchromosomal rearrangements during old radiation of gekkotan lizards (Squamata: Gekkota). *Chromosome Res* DOI 10.1007/s10577-015-9468-6.
- Potter S, Bragg JG, Blom MPK, Deakin JE, Kirkpatrick M, Eldridge MDB and Moritz C (2017) Chromosomal Speciation in the Genomics Era: Disentangling Phylogenetic Evolution of Rock-wallabies. *Front. Genet.* 8:10.
- Ruiz-Herrera A, Farré M and Robinson TJ (2012) Molecular cytogenetic and genomic insights into chromosomal evolution. *Heredity* 108:28–36.
- Salazar-Bravo J, Pardiñas UFJ and D'Elía G (2013) A phylogenetic appraisal of Sigmodontinae (Rodentia, Cricetidae) with emphasis on phyllotine genera: systematics and biogeography. *Zoologica Scripta* 42 (3): 250–261.
- Silva Gómez JA 2008 Sistemática molecular de *Thaptomys* Thomas, 1916 (Rodentia, Cricetidae). Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil.
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (1998) Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. *Cytogenet Cell Genet* 81:46–50.
- Sotero-Caio CG, Volleth M, Gollahon LS, Fu B, Cheng W, Ng BL, Yang F and Baker RJ (2013) Chromosomal evolution among leaf-nosed nectarivorous bats – evidence from cross-species chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *BMC Evolutionary Biology* 13:276.

- Souza MJ (1981) Caracterização cromossômica em oito espécies de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Sudman PD (1989) Cryogenic preservation of mammalian testicular material for synaptonemal complex analysis. *Cytogenet. Cell Genet.* 52(1-2): 88-89.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA and Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725.
- Teta P, Pardiñas UFJ and D'Elía G (2015) Genus *Thaptomys* Thomas (1916). In *Rodents. Mammals of South America*, Volume 2, p. 875-883.
- Ventura K, de Silva MJJ and Yonenaga-Yassuda Y (2010) *Thaptomys* Thomas 1915 (Rodentia, Sigmodontinae, Akodontini) with karyotypes $2n=50$, $FN=48$ and $2n=52$, $FN=52$: Two monophyletic lineages recovered by molecular phylogeny. *Genet Mol Biol* 33:256–261.
- Ventura K, Fagundes V, D'Elía G, Christoff AU e Yonenaga-Yassuda Y (2011) A new allopatric lineage of the rodent *Deltamys* (Rodentia: Sigmodontinae) and the chromosomal evolution in *Deltamys kemp*i and *Deltamys* sp. *Cytogenetic and Genome Research* 135(2):126-34.
- 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 chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17:1063-1078.
- Ventura K, Sato-Kuwabara Y, Fagundes V, Geise L, Leite YLR, Costa LP Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y and Rodrigues MT (2012) Phylogeographic Structure and Karyotypic Diversity of the Brazilian Shrew Mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest. *Cytogenet Genome Res* 138:19–30.
- Ventura K, Silva MJJ, Pardini R and Yonenaga-Yassuda Y (2004) An undescribed karyotype for *Thaptomys* ($2n=50$) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* ($2n=52$) evidenced by FISH and Ag-NORs. *Caryologia* 57:89–97.
- Volobouev V, Aniskin V, Lecompte E and Ducroz JF (2002) Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid rodents inferred from the comparison of cytogenetic and molecular data. *Cytogenetics and Genome Research* 96:261–275.
- Wienberg J (2004). The evolution of eutherian chromosomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 14:657–666.
- Yang F, Carter NP, Shi L e Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103:642–652.
- Yonenaga Y (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia* 28:269-286.

CAPÍTULO 2

DIVERSIFICAÇÃO DE *THAPTOMYS* THOMAS, 1916: IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS E EVOLUTIVAS

RESUMO

Thaptomys Thomas, 1916 é um gênero de roedor monotípico endêmico da Mata Atlântica. Apesar da baixa diferenciação morfológica, dados citogenéticos e moleculares sugerem uma diversidade subestimada para esse táxon. Assim, o presente trabalho testou a hipótese de que *Thaptomys* não seja monotípico, a partir de uma análise integrativa, com dados morfométricos, citogenéticos, moleculares e de modelagem de nicho, realizando uma revisão taxonômica ampla do gênero. Foram analisados 201 espécimes de 26 localidades, desde Una/BA até San Raphael, no Paraguai. As análises filogenéticas (*Cytb*) recuperaram um “Clado Norte” de abrangência geográfica ampla, desde Una/BA (2n=50/FN=48), Luminárias/MG (2n=48-51/FN=52), até Tapiraí/SP (2n=52/FN=52) e as demais amostras formaram uma politomia (“Sul”), desde Tapiraí/SP (2n=52/FN=52) a San Raphael e Limoy (Paraguai, sem cariótipo), que divergiram em 2,15%. Espécimes com diferentes cariótipos não foram recuperados como monofiléticos, embora espécimes com 2n=50/FN=48 tenham formado dois clados distintos, sem nenhum indivíduo com outros cariótipos. As análises populacionais (*CytB* e seis *loci* de microsatélite) indicaram Una/BA (2n=50/FN=48) como uma população distinta das demais, divergindo em 1,89% de 2n=52/FN=52 e 1,2% de 2n=48-51/FN=52, sem compartilhamento de haplótipos com outro cariótipo ou localidade. Morfológicamente, espécimes com 2n=48-51/FN=52 não apresentaram nenhuma distinção daqueles com 2n=50/FN=48 e 2n=52/FN=52 e que estão isolados geograficamente. A distribuição geográfica dos diferentes cariótipos mostra que eles nunca foram detectados em simpatria, que não há evidências de híbridos entre eles e que parecem estar isolados geograficamente, já que Una/BA (2n=50/FN=48) dista em 938 km de Luminárias/MG (2n=48-51/FN=52), e 500km de Santa Teresa/ES (2n=52/FN=52). A fixação de um rearranjo cromossômico com alta frequência em uma população, como as fissões cêntricas e fusões em *tandem*, observados em espécimes com 2n=50/FN=48, acarretaria na separação das populações de *Thaptomys* em subgrupos não intercruzantes (com e sem o rearranjo cromossômico), representando uma barreira ao fluxo gênico, como sugerido no modelo de especiação peripátrico. Assim, populações fundadoras de pequeno tamanho tenderiam a representar espécies distintas, sendo o cromossomo o fator desencadeador desse processo. A falta de resolução filogenética em recuperar espécimes com diferentes cariótipos como monofiléticos, somada à distinção morfológica sutil (não significativa), pode indicar um processo de especiação abrupto, deflagrado pelos rearranjos cromossômicos complexos em que as linhagens não tiveram tempo de acumular diferenças. Por outro lado, podem representar populações que estejam sofrendo deriva genética, podendo se extinguirem em curto prazo. Diante desses dados, propõem-se uma interpretação bem mais complexa, em que *Thaptomys* seria representado por duas espécies, sendo (I) *Thaptomys* sp. n., com 2n=50/FN=48, exclusivo de Una (BA); e (II) *Thaptomys nigrita*, apresentando polimorfismo cromossômico, com 2n=48-52/FN=52, com três subespécies, sendo (III) *Thaptomys nigrita* ssp. n., com 2n=48-51/FN=52, exclusiva de Luminárias (MG), (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (subespécie nominotípica), ocorrendo de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP) e (V) *Thaptomys nigrita subterraneus*, de Pilar do Sul (SP) à San Raphael (Paraguai).

Palavras-chave: especiação, subespécie, citotaxonomia, genética de populações, filogenética

ABSTRACT

Thaptomys Thomas, 1916 is a monotypic rodent genus of the Atlantic Forest. Despite the low morphological difference, cytogenetic data and molecules suggest an underestimated diversity for this taxon. Thus, the present work tested a hypothesis that *Thaptomys* is not monotypic, from an integrative analysis, with morphometric, cytogenetic, molecular and niche modeling data, performing a broad taxonomic revision for the genus. A total of 201 specimens from 26 localities were analyzed, from Una/BA to San Raphael, Paraguay. Phylogenetic analyzes (Cytb) recovered a "North Clade" of wide geographic range, from Una/BA ($2n=50/FN=48$), Luminárias/MG ($2n=48-51/FN=52$), to Tapiraí/SP ($2n=52/FN=52$) and as samples formed a polytomy ("South"), from Tapiraí/SP ($2n=52/FN=52$) to San Raphael and Limoy (Paraguay, without karyotype), which diverged in 2,15%. Specimens with different karyotypes were not recovered as monophyletic, for example, with $2n=50/FN=48$ having formed two distinct and exclusive clades. Population analysis (CytB and six microsatellite *loci*) indicated Una/BA ($2n=50/FN=48$) as a distinct population from the others, diverging in 1,89% from $2n=52/FN=52$ and 1.2% of $2n=48-51/FN=52$, without sharing of haplotypes with another karyotype or locality. Morphologically, specimens with $2n=48-51/FN=52$ did not distinguish those with $2n=50/FN=48$ and $2n=52/FN=52$ and that are geographically isolated. A geographic distribution of different karyotypes shows that they were never detected in sympatry, that there is no evidence of hybrids among them and seem to be geographically isolated, since Una/BA ($2n=50/FN=48$) is distant in 938 km of Luminárias/MG ($2n=48-51/FN=52$), and 500 km from Santa Teresa/ES ($2n=52/FN=52$). The fixation of a chromosomal rearrangement with a high frequency in a population, such as central fenas and tandem fusions observed in specimens with $2n=50/FN=48$, would result in the separation of *Thaptomys* populations into non-cross-linking subgroups (with and without chromosomal rearrangement), representing a barrier to gene flow, as suggested without peripatric speciation model. Thus, the founding populations of small dimensions have a representative variety of different species, being the production process. The lack of phylogenetic resolution in recovering specimens with different karyotypes as monophyletic, added to the subtle morphological distinction (does not mean), can indicate a process of abrupt speciation, triggered by complex chromosomal rearrangements in which as lineages did not have time to accumulate. In view of the data, a much more complex interpretation is proposed, in which *Thaptomys* would be represented by two species, being (I) *Thaptomys* sp. n., with $2n=50/FN=48$, exclusive from Una, Bahia; and (II) *Thaptomys nigrita*, presenting chromosomal polymorphism, with three subspecies, being (III) *Thaptomys nigrita* ssp. with $2n=48-52/FN=52$, exclusive from Luminárias, Minas Gerais, (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (nominotypical subspecies), occurring from Santa Teresa (ES) to Tapiraí (SP) and (V) *Thaptomys nigrita subterraneus*, from Pilar do Sul (SP) to San Raphael (Paraguay).

Keywords: *speciation, subspecies, cytotaxonomy, population genetics, phylogenetics*

1. INTRODUÇÃO

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

Alguns autores (como Sites e Marshall 2004) dividem os conceitos de espécie em primários e secundários. Nesse contexto, os conceitos primários definiriam, teoricamente, as entidades como espécies (por exemplo, o conceito evolutivo de espécie); enquanto os conceitos secundários tratariam dos métodos operacionais (morfologia, morfometria, cromossomo, sequenciamento de DNA) utilizados para identificar as entidades biológicas de acordo com os conceitos primários. Mesmo assim, diferentes conjuntos de dados e métodos para delimitação das espécies podem resultar em conclusões ambíguas ou conflitantes (Hey et al. 2003; Sites e Marshall 2003) como consequência de múltiplos processos evolutivos que operam dentro e entre populações através de variadas escalas espaço-temporais (Harrison 1998; Lee 2003).

Foi nesse contexto que em 2005 surgiu, pela primeira vez, o termo Taxonomia Integrativa para apontar a falta de comunicação entre as diferentes disciplinas utilizadas para delimitar espécies e a necessidade iminente de integração entre elas para superar o que se chamou de impedimento taxonômico (Gewin, 2002; Godfray, 2002; Mallett & Willmott, 2003; Wilson, 2003; Wheeler, 2004). Assim, a definição da Taxonomia Integrativa, propriamente dita, seria uma ciência que objetiva delimitar as unidades da diversidade biológica (espécies) a partir de múltiplas fontes de dados com perspectivas complementares (filogeografia, morfologia comparativa, genética de populações, ecologia etc.), diante da complexidade biológica e evolutiva dos táxons (Dayrat, 2005).

A Taxonomia Integrativa é uma ferramenta interessante, devido, principalmente, aos limites intrínsecos que cada método apresenta para o delineamento das espécies. Inferências baseadas em dados morfológicos, por exemplo, falham em alguns casos, sendo necessária a utilização de outras fontes de dados. Mesmo quando a morfologia tem sucesso na delimitação de espécies, outras abordagens podem auxiliar significativamente e acelerar esse processo (Bickford et al. 2007; Cardoso et al. 2009; Dayrat, 2005; DeSalle et al. 2005; Malhotra e Thorpe, 2004). Além disso, o uso de várias disciplinas de maneira integrada ajuda a taxonomia além da denominação de espécies, permitindo entender os processos evolutivos responsáveis pelo surgimento de novas espécies. Isso é especialmente evidente em casos de desacordo entre disciplinas, na medida em que tais casos são resolvidos com base na biologia evolutiva (DeSalle et al. 2005; Fisher and Smith, 2008; Funk, 2003).

Nesse contexto, quando mais de um critério operacional indica para a descoberta de um novo táxon, o nível de confiança para essas conclusões é muito maior do que para espécies reconhecidas

por apenas um tipo de fonte de dado (Dayrat, 2005). Existe uma gama de métodos para delimitar espécies e a necessidade de rigor para sua delimitação exige que usemos esses métodos de forma sistemática. Nos últimos 12 anos, diversos trabalhos foram realizados, utilizando a Taxonomia Integrativa, buscando entender vários aspectos da história evolutiva de diversos grupos de organismos (Pires e Marinone, 2010). Esses trabalhos buscaram, essencialmente: (a) testar a congruência entre resultados obtidos a partir de várias fontes de dados, buscando a validação da posição taxonômica de táxons (Smith et al., 2008; Mengual et al., 2006); (b) descobrir espécies novas, principalmente espécies crípticas (Milankov et al., 2008; Vaglia et al., 2008; Roe e Sperling, 2007; Schlick-Steiner et al., 2006); e (c) descrever espécies baseando-se em mais de uma fonte de dado, geralmente utilizando a morfologia e sequenciamento de DNA (Fisher e Smith, 2008; Mengual e Thompson, 2008).

Dentre os critérios operacionais utilizados para a delimitação das espécies, Pante et al. (2015) realizaram um levantamento na literatura de 494 artigos sobre Taxonomia Integrativa e apontou que 47,2% dos artigos analisados usaram dois tipos de caracteres (sendo dados morfológicos e de DNA em 89,7% desses), 15,2% usaram três, e apenas 2,2% usaram quatro tipos (Pante et al. 2015). Ainda, apesar do número crescente de estudos utilizando a Taxonomia Integrativa no período analisado (20 em 2006 e 118 em 2013), há um uso errôneo desse termo, onde 35,4% dos estudos analisados usaram apenas um tipo de critério operacional, sendo 74,9% representados por dados moleculares (Pante et al. 2015).

Curiosamente, dados citogenéticos não aparecem nessa estatística. Informações cariotípicas, aliadas a outros critérios operacionais para a delimitação de espécies, são uma ferramenta fundamental para o reconhecimento da diversidade biológica (Fusu, 2017), principalmente em roedores, onde existem inúmeros casos de espécies crípticas, ou seja, morfologicamente indistintas (por exemplo *Nannospalax*: Savic et al., 2017; *Ctenomys*: Caraballo e Rossi, 2017; *Deltamys*: Quintela et al. 2017; *Akodon*: Silva et al. 1998). Esse contexto é especialmente relevante, uma vez que *Thaptomys* apresenta uma elevada diversidade cariotípica, baixa diferenciação morfológica e um histórico taxonômico bastante complexo.

O gênero *Thaptomys* Thomas, 1916 é endêmico da Mata Atlântica, com distribuição conhecida no Brasil desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, com registros no leste do Paraguai e nordeste da Argentina (de la Sancha et al. 2017; Patton et al. 2015; Suárez et al. 2015; Musser e Carleton 2005). Geralmente, os espécimes são encontrados em regiões de altitude e estão adaptados a um hábito de vida semifossorial. Assim, apresentam características morfológicas peculiares como olhos reduzidos, orelhas curtas, comprimento da cauda igual ou menor que 50% do tamanho do corpo e pelos muito finos, sendo curtos e castanhos acima, brancos abaixo, não escondendo as escamas. As garras são longas e finas, as palmas e as solas dos membros anteriores e posteriores são nuas com

almofadas proeminentes. O dorso é castanho escuro ou marrom castanho-avermelhado brilhante, finamente grisalho com marrom e misturado com alguns cabelos castanhos mais castanhos (Teta et al. 2015).

De acordo com a compilação mais recente de mamíferos da América do Sul, *Thaptomys* é considerado monotípico, sendo *T. nigrita* Lichtenstein, 1829 a única espécie reconhecida, com sugestões de duas subespécies: *T. nigrita nigrita* e *T. nigrita subterraneus* (Teta et al. 2015). A história taxonômica de *Thaptomys* é complexa, sendo que mais de uma espécie já foi reconhecida para o gênero (Tabela 2.1). Lichtenstein (1829) descreveu *Mus nigrita*, com localidade tipo nos arredores do Rio de Janeiro, que foi transferida para *Hesperomys* por Wagner em 1843. Hensel (1873) descreveu *H. subterraneus*, com a localidade tipo restrita à Taquara do Mundo Novo, Rio Grande do Sul. Mais tarde, Trouessart (1898) transferiu *H. nigrita* e *H. subterraneus* para o gênero *Akodon*.

Thaptomys foi mencionado pela primeira vez por Thomas (1916), com a descrição do gênero para acomodar a espécie *A. subterraneus* Hensel, 1873, tornando Taquara do Mundo Novo, no estado do Rio Grande do Sul, a localidade tipo de *Thaptomys*. Gyldenstolpe (1932) incluiu *A. nigrita* em *Thaptomys*, ficando o gênero representado por duas espécies: *T. subterraneus* e *T. nigrita*. Contudo, Ellerman (1941) propôs *Thaptomys* como um subgênero de *Akodon*, embora destacasse que esse gênero caracterizava-se como “um grupo bem diferenciado” em Akodontini. Posteriormente, Cabrera (1961) reconheceu somente uma espécie com duas subespécies: *Akodon (Thaptomys) nigrita nigrita*, com distribuição entre o sul da Bahia até o norte de Santa Catarina e *Akodon (Thaptomys) nigrita subterraneus*, com distribuição do sul de São Paulo até o norte do Rio Grande do Sul, incluindo o leste do Paraguai e o nordeste da Argentina. No entanto, esta divisão subespecífica não foi citada em estudo realizado por Reig (1987) porque o autor considerou que a separação de *Thaptomys* de *Akodon* não era justificada, visto que a diferença observada em *Thaptomys* não representaria características além dos limites de variação já observados em *Akodon*.

Hershkovitz (1990, 1998) destacou que a peculiaridade da presença de um único par de glândulas prostáticas, em adição à cauda curta, unhas das mãos longas, crânio rígido, osso parietal rígido, rostro curto e grosso, com osso nasal longo, região interorbital larga, caixa craniana quadrada, molares relativamente pequenos, incisivos proodontes longos e fortes e o número diploide (2n) igual a 52, seriam características suficientes para distinguir *Thaptomys* de *Akodon*, considerando apenas *T. nigrita* como representante do gênero. Posteriormente, dados de sequência do gene mitocondrial citocromo b revelaram que *Thaptomys* e *Akodon* são grupos irmãos e que a divergência genética encontrada seria suficiente para separá-los como gêneros distintos (Smith e Patton, 1999; 2007).

Do ponto de vista cromossômico, durante muitos anos o único cariótipo associado à *Thaptomys nigrita* fora caracterizado por 2n=52 e número de braços autossômicos (FN) igual a 52, com 24 pares de acrocêntricos e um par metacêntrico pequeno, observado em toda a distribuição

geográfica da espécie no Brasil, nos estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Yonenaga 1975; Souza 1981; Fagundes 1993; 1997; Paresque 2001; Paresque et al. 2004; Colombi, 2013). Apesar da ocorrência no nordeste da Argentina e leste do Paraguai, apenas em 2015 os primeiros dados citogenéticos para Misiones foram publicados (Suaréz et al. 2015). Em 2004, foi descrito um cariótipo com $2n=50$ e $NF=48$, composto por 24 pares de acrocêntricos variando gradativamente de tamanho. Esse cariótipo só foi observado para uma localidade do sul da Bahia (Una), representando o extremo norte da distribuição geográfica para o gênero (Ventura et al. 2004).

Em 2018, Colombi et al. (presente estudo, Capítulo 1) descreveu cinco novos cariótipos em oito espécimes coletados em Luminárias (MG), com $2n=48$ a 51, todos com $FN=52$, devido a rearranjos robertsonianos entre dois pares acrocêntricos (1+15 e 3+4). Nesse estudo o autor descreveu os rearranjos do tipo robertsonianos e em tandem que diferenciam $2n=50$ de $2n=52$. Assim, *Thaptomys* ficou associado a três cariogrupos distintos: (I) $2n=52/FN=52$, o mais frequente e observado na maior parte da distribuição geográfica da espécie, composto em sua maioria por cromossomos acrocêntricos; (II) $2n=50/FN=48$, exclusivo de Una, na Bahia, apresentando rearranjos complexos do tipo robertsonianos e em tandem; e (III) $2n=48-51/FN=52$, exclusivo de Luminárias (MG), com rearranjos robertsonianos originando cromossomos grandes de dois braços. Esses autores sugeriram duas vias distintas de variação do cariótipo, sendo $2n=48-51/FN=52$ variantes polimórficas de $2n=52/FN=51$, e $2n=50/FN=48$ de Una, uma forma que deveria ser associada a um táxon distinto.

A primeira proposta de filogenia molecular apresentada para *Thaptomys* é recente e foi baseada em sequências do gene mitocondrial citocromo b (1077 pb) de 18 indivíduos da Bahia, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (Ventura et al. 2010). Nesse estudo os autores apontaram dois clados congruentes com os cariogrupos $2n=52/FN=52$ e $2n=50/FN=48$. Os autores sugeriram que a divergência cariotípica e molecular (1,9%-3,5%) seriam compatíveis com a distinção interespecífica e sugeriram que o cariótipo com $2n=50/FN=48$ representaria uma espécie nova para o gênero. Porém, análises filogenéticas realizadas com 112 espécimes de 27 localidades ao longo da Mata Atlântica, utilizando um marcador mitocondrial (citocromo b - 801pb) e um nuclear (IRBP - 1084pb), não recuperaram nenhum dos três cariogrupos como monofiléticos. Apesar disso, não houve compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre indivíduos com $2n=52/NF=52$ e $2n=50/NF=48$ e a divergência genética observada entre esses dois cariogrupos foi de 2,2-3,5% (Colombi 2013).

Estudos morfológicos em *Thaptomys* envolveram a análise de características qualitativas e morfométricas (Moreira e Oliveira 2011) em 379 espécimes com representatividade da distribuição geográfica de *Thaptomys* no Brasil (da Bahia ao Rio Grande do Sul), com alguns animais cariotipados, e mostraram que as diferenças nos caracteres qualitativos externos e cranianos são sutis

e não significativas, independentemente da localidade geográfica dos exemplares. Dessa maneira, a questão de uma diversidade subestimada em *Thaptomys* continuou em aberto.

Diante do cenário apresentado, questões sobre a diversidade de *Thaptomys*, no que se refere ao número de espécies, qual o cariótipo ancestral e os processos evolutivos que levaram a tal diversificação, permanecem em aberto. Nesse sentido, baseando-se nas premissas de que (a) há variação cariotípica, sendo reconhecidos três cariogrupos $2n=52/FN=52$, $2n=48-51/FN=52$ e $2n=50/FN=48$; (b) há uma proposta de que $2n=52/FN=52$ seja o cariótipo ancestral da espécie; (c) há variações morfológicas discretas, que independentemente não dão suporte à distinção morfológica; (d) há variação molecular, sem suporte para a distinção de grupos, a priori; o presente trabalho testou a hipótese de que *Thaptomys* não é monoespecífico, utilizando uma análise integrativa, incluindo dados morfológicos e morfométricos (dados secundários), citogenéticos, moleculares e de modelagem de nicho, colocando em prática a proposta de uma ampla revisão taxonômica para o gênero.

Tabela 2.1. Histórico taxonômico de *Thaptomys*.

Epíteto genérico	Subgênero	Epíteto específico	Epíteto subespecífico	Referência
<i>Mus</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Lichtenstein, 1829
<i>Hesperomys</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Wagner, 1843
<i>Hesperomys</i>	-	<u><i>subterraneus</i></u>	-	Hensel, 1873
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	-	<u><i>subterraneus</i></u>	-	Trouessart, 1898
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Thaptomys</i>	-	<u><i>subterraneus</i></u>	-	Thomas, 1916
<i>Akodon</i>	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Thaptomys</i>	-	<u><i>subterraneus</i></u>	-	Gyldenstolpe, 1932
	-	<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	<i>Thaptomys</i>	<u><i>subterraneus</i></u>	-	Ellerman, 1941
		<i>nigrita</i>	-	
<i>Akodon</i>	<i>Thaptomys</i>	<i>nigrita</i>	<u><i>subterraneus</i></u> <i>nigrita</i>	Cabrera, 1961
<i>Thaptomys</i>	-	<i>nigrita</i>	-	Herskovitz, 1990, 1998; Smith e Patton, 1999 Smith e Patton, 2007
<i>Thaptomys</i>	-	<i>nigrita</i>	<u><i>subterraneus</i></u> <i>nigrita</i>	Teta et al., 2015

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra

A amostra é composta por 201 espécimes, distribuída ao longo de 26 localidades (Tabela 2.2, Figura 2.1), abrangendo a distribuição geográfica conhecida para o gênero, que vai do sul da Bahia, em Una (limite norte), passa por toda a costa leste do Brasil, até o leste do Paraguai e o nordeste da Argentina. As amostras foram obtidas através de campanhas realizadas para a coleta específica de espécimes do gênero, amostras já tombadas e disponíveis no Banco de Tecidos do Laboratório de Genética Animal e por doações de pesquisadores: Raquel Moura (UFMG), Leonora Pires Costa e Yuri Luiz Reis Leite (UFES), Marcelo Passamani (UFLA), Renata Pardini e Yatiyo Yonenaga-Yassuda (USP), Alexandre Christoff (ULBRA-RS), Ulyses Pardiñas (IDEAus-CONICET) e Noé U. De La Sancha (Universidade de Chicago).

2.2. DNA e sequenciamento

O DNA total das amostras foi obtido a partir de fragmentos de fígado ou músculo, conservadas em etanol a -20°C, utilizando protocolo padrão (Bruford *et al.* 1992). Os extratos foram quantificados em NanoDrop e diluídos a 50ng/uL afim de se evitar problemas na amplificação por excesso de DNA. Fragmentos parciais de 801pb do gene mitocondrial Citocromo b e de 1084pb do gene nuclear *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein* (IRBP) foram obtidos via PCR utilizando os *primers* descritos por Smith e Patton (1993) e Stanhope *et al.* (1992), respectivamente. Os produtos de PCR foram corados com GelRed, submetidos a eletroforese em gel de agarose 2 % e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras amplificadas foram purificadas com ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, USA) e sequenciadas usando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em sequenciador automático ABI Prism 3550 (Applied Biosystems, Inc.) no Núcleo de Genética Aplicada à Biodiversidade da Universidade Federal do Espírito Santo (NGACB-UFES) ou na Macrogen (Korea). As sequências foram conferidas através da ferramenta BLAST no Geneious 7.1.3 (Kearse *et al.* 2012) e alinhadas visualmente. O teste de saturação foi realizado no programa Dambe (Xia, 2013).

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando dois critérios de otimização: Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 replicações, na plataforma online PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010) e Inferência Bayesiana (IB) no programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist *et al.* 2012) com 1.000.000 de gerações e *burning* de 25%. Para o gene mitocondrial citocromo b, foram criadas duas matrizes de dados, uma contendo 127 indivíduos, todos cariotipados; e uma segunda matriz com todas as 176 sequências obtidas. Os melhores modelos de substituição nucleotídica para as inferências de ML e IB, para cada cenário, foram obtidos no programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Foram considerados clados confiáveis apenas aqueles que apresentaram valores de *bootstrap* acima de 75 % (ML) e probabilidades posteriores acima de 0.95 (IB).

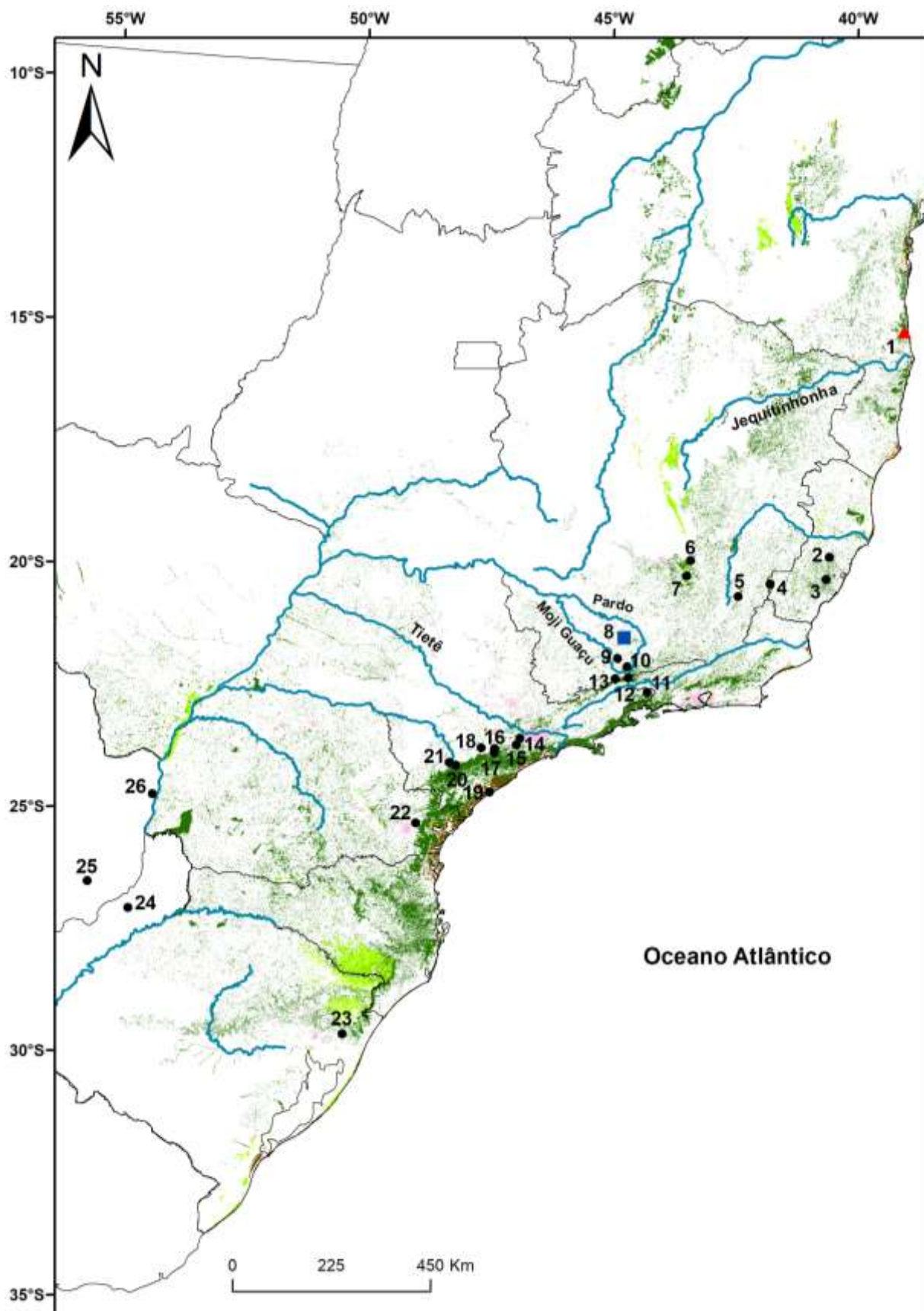


Figura 2.2. Localidades de coleta de exemplares de *Thaptomys nigrita* com material sequenciado no presente estudo. **Brasil:** 1. Una; 2. Santa Teresa, 3. Domingos Martins e 4. Ibitirama. 5. Fervedouro, 6. Catas Altas, 7. Ouro Preto, 8. Luminárias, 9. Minduri, 10. Itamonte; 11. Bananal; 12. Itatiaia; 13. Passa Quatro, 14. Ibiúna, 15. Cotia, 16. Piedade, 17. Tapiraí, 18. Pilar do Sul, 19. Iguape; 20. Capão Bonito, 21. Ribeirão Grande, 22. Piraquara; 23. Maquiné; **Argentina:** 24. Misiones. **Paraguai:** 25. San Raphael, 26. Limoy.

Como grupos externos foram usadas sequências de *Blarinomys breviceps*, *Brucepattersonius soricinus*, *Necromys lasiurus*, *Thalpomys cerradensis* e *Castoria angustidens*, retiradas do GenBank (acessos AY275112, KF815439, KF815437, AY273915 e AY273908, respectivamente) (D'Elia 2003; Smith e Patton, 2007; Ventura et al. 2010).

Os cálculos de divergência genética foram feitos no software MEGA 7.0.14 (Kumar et al. 2015) por meio do modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980).

2.3. Genotipagem

Para genotipagem por microssatélites foram testados 11 pares de primers heterólogos (Tabela 2.3), desenvolvidos para *Akodon cursor* (Moreira et al. 2014) e *Akodon azarae* (Vera et al. 2011). Os iniciadores *foward* foram sintetizados com adição da cauda universal M13(-21), seguindo protocolo de Schuelke (2000), composta por 18 nucleotídeos (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT) que servem como molde para que marcadores universais fluorescentes (6-FAM, NED, PET e VIC – Life Technologies), inseridos ao meio na etapa de amplificação dos fragmentos, possam ser incorporados aos produtos amplificados (uma cor para cada marcador microssatélite) via PCR e serem lidos no sequenciador.

Para a genotipagem de cada indivíduo realizou-se amplificação simplex via PCR loco-a-loco, e a leitura multiplex foi realizada, orientada pelo melhor arranjo de fragmentos determinado pelo software Multiplex Manager v1.2 (Holleley e Geerts, 2009) (Figura 2.2). A leitura foi realizada em sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Inc.) por eletroforese no NGACB-UFES. O tamanho dos fragmentos obtidos, por loco, por indivíduo, foram determinados baseado no Gene Scan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied Biosystems). A visualização dos picos para leitura e determinação do tamanho dos fragmentos foi feita no software Geneious 7.1.3.

Os tamanhos dos fragmentos foram plotados em uma tabela utilizando o suplemento do Microsoft Excel 2013 GenAlEx 6.5.2 (Peakall e Smouse, 2012). O desvio no padrão esperado de migração dos fragmentos pode ser ocasionado pela composição das sequências (Rosenblum et al., 1997) ou pela fluorescência utilizada para marcação dos iniciadores (Wenz et al., 1998). Assim, após plotados, os valores dos tamanhos dos fragmentos foram arredondados para o número inteiro mais próximo, de acordo com o padrão de repetição de cada *locus* (dinucleotídeos). Para corrigir o desvio e tornar o processo de classificação mais preciso, os dados brutos dos tamanhos dos fragmentos foram importados no programa TANDEM (Matschiner & Salzburger, 2009), onde os tamanhos dos alelos foram transformados utilizando uma função potência antes de ser realizado o arredondamento.

O número de alelos, o número efetivo de alelos, o número de alelos privados, o índice de informação de Shannon, a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada foram utilizados como indicativos da diversidade genética das populações e foram realizadas no GenAlEx 6.5.2.

Os dados de cada microssatélite foram analisados no programa R (R Core Team 2017), por meio do pacote estatístico “PopGenReport” (Adamack e Gruber, 2017) para verificar a presença de erros de genotipagem causados por alelos nulos (falha na amplificação de um ou mais alelos devido à presença de mutações na região de hibridização dos iniciadores) e *stuttering* (mutações *in vitro* causadas pelo escorregamento da polimerase durante a PCR, gerando falsos alelos que diferem do alelo verdadeiro por múltiplos da unidade de repetição), segundo Chakraborty et al. (1994) e Brookfield (1996). Os dados das populações de Itatiaia (RJ), Ouro Preto, Passa Quatro, Catas Altas (MG), Bananal, São João da Boa Vista e São Bernardo do Campo (SP) foram retirados das análises posteriores devido ao pequeno número de amostras ($n=1$). Além disso, indivíduos que não tiveram dados de 4 *loci* ou mais, foram retirados das análises, sendo considerados, apenas, para os cálculos de diversidade alélica.

2.4. Rede de haplótipos

Para estabelecer a relação entre os haplótipos mitocondriais (*CytB*), o número de haplótipos (nH) foi determinado no programa DnaSP 6 (Librado e Rozas 2009) e a relação hierárquica entre eles foi estabelecida utilizando o programa PopArt (Leigh e Bryant, 2015).

2.5. Estrutura populacional

A diferenciação genética par-a-par do marcador mitocondrial *Cytb* foi avaliada a partir do índice de **fixação (F_{ST})** (Wright, 1951) e o particionamento hierárquico da diversidade genética (entre grupos de populações, entre populações dentro dos grupos e entre indivíduos dentro das populações) foi avaliado através da análise de variância molecular espacial (SAMOVA; Dupanloup *et al.*, 2002), e da análise da variância molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992), utilizando os marcadores microssatélites. Foram testados diferentes valores de k (número estimado de populações), que variou de 2 a 10. Os índices de fixação par-a-par (F_{ST}) obtidos para cada marcador foram utilizados como medidas de distância genética entre as populações, realizados no GenAlEx 6.5.2.

Os dados dos marcadores microssatélites de todos os indivíduos genotipados foram utilizados para inferir a estrutura genética das populações sem levar em consideração a informação do local de coleta. Para isso, foi utilizada a análise de agrupamento implementada no programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), onde foi selecionado o modelo de ancestralidade “com mistura” (*admixture*) com frequências alélicas correlacionadas entre as populações. Foram realizadas 10 corridas para cada valor de K (número de grupos), o qual variou de um a 10. Cada corrida consistiu em 1.100.000 passos na Cadeia de Markov, sendo que os 100.000 primeiros passos foram descartados como *burn-in*. A definição do número de grupos mais provável foi realizada utilizando o método de Evanno et al. (2005), implementado na plataforma *online* Structure Harvester (Earl & von Holdt, 2012).

2.6. Modelagem de nicho

O levantamento de áreas de ocorrência de *Thaptomys* foi realizado a partir da junção da área amostral do presente trabalho e de uma extensa revisão da literatura em artigos publicados e em coleções científicas *online* (*Species-link*), onde o registro para a espécie só foi considerado quando era identificado com a coordenada geográfica exata do local de coleta e o material testemunho está tombado em coleções zoológicas.

A área de estudo foi construída a partir da interseção das ocorrências de *Thaptomys nigrita* com as ecorregiões definidas pela regionalização biogeográfica a partir da análise da ocorrência da fauna e flora (Löwenberg-Neto 2014; Morrone 2014). Um buffer de aproximadamente 5 km foi adicionado ao redor da área de estudo, correspondente à área de vida da espécie.

Além dos registros de ocorrência da espécie, os três cariogrupos observados em *Thaptomys* foram considerados para essa análise. Assim, foram testados os seguintes cenários: (1) Todos os indivíduos de todos os cariótipos juntos; 2) Toda a amostra, exceto os animais com $2n=50/FN=48$, para verificar se a região de Una (BA) ainda permaneceria como área de adequabilidade para a espécie; 3) Todos os exemplares, exceto os espécimes com $2n=48-51/FN=52$, para verificar se a região de Luminárias (MG) ainda permaneceria como área de adequabilidade para a espécie; e (4) somente os espécimes com $2n=52/FN=52$.

Foram consideradas 22 variáveis ambientais: 19 bioclimáticas, contendo combinações de variações de sazonalidade, temperatura e pluviosidade (Hijmans et al 2005); duas de relevo, com um modelo de elevação digital e uma de inclinação (cortesia do U.S. Geological Survey); e uma de umidade, PET (Evapotranspiração Potencial, Potential Evapo-Transpiration no original - Zomer et al 2007). Um problema que surge com o uso de variáveis correlacionadas entre si é a colinearidade, que pode comprometer seriamente a resolução e interpretação de modelos (O'Brien 2007). Portanto, foi utilizado um método *Variance Inflation Factor* (VIF) para reduzir a colinearidade, correspondente ao recíproco do inverso do coeficiente de regressão de uma variável em relação ao restante das variáveis analisadas (Dormann et al 2013). O limiar adotado foi 10. Sete variáveis foram determinadas para compor o modelo final: Bio 2, Bio 3, Bio 8, Bio 9, Bio 12, Bio 15, e Slope.

Foram utilizados cinco algoritmos para a construção do modelo: ANN, Maxent (Philips e Tsuruoka), MARS e RF, com 10 interações. Um *ensemble* foi composto a partir de todas as interações com TSS superior a 0.5. Todas as análises foram feitas no R (R Core Team 2017) usando os pacotes *rgdal*, *rgeos*, *adehabitatHR*, *raster* e *biomod2*.

Tabela 2.2. Amostragem de espécimes de *Thaptomys* do presente trabalho, localidade, número de indivíduos por localidade (n), cariótipo dos espécimes, número de amostras sequenciadas, número de haplótipos (nH) por localidade, haplótipos e referências. ¹A=acrocêntricos, SM=submetacêntricos grandes, M=metacêntricos grandes, m=metacêntricos pequenos.

País	Estado/Província	Localidade	Cariótipo ¹				CytB		Referências
			n	2n*	NF	Autossomos	n	nH	
BRASIL	Bahia	Uma	7	50	48	48A	9	5	H35-39 Ventura et al. 2004; Presente estudo
	Espírito Santo	Santa Teresa	17	52	52	48A+2m	22	6	H2, H29-33 Presente estudo; Paresque et al. 2004
		Domingos Martins	4	52	52	48A+2m	4	3	H2, H6-H7 Presente estudo; Paresque et al. 2004
		Dores do Rio Preto	5	52	52	48A+2m	6	2	H2, H9 Presente estudo
	Rio de Janeiro	Itatiaia	2	52	52	48A+2m	2	2	H2 Lena Geise (comunicação pessoal)
	Minas Gerais	Minduri	-	-	-	-	19	6	H2, H9, H14-17 Presente estudo
			3	48	52	2SM+2M+40A+2m	3		Presente estudo
			2	49 ^a	52	2SM+1M+42A+2m	2		Presente estudo
			1	49b	52	1SM+2M+42A+2m	1		Presente estudo
			1	50b	52	1SM+1M+44A+2m	1		Presente estudo
			2	51	52	1SM+46A+2m	2		Presente estudo
		Luminárias	-	-	-	-	9		Presente estudo
			-	-	-	-	3	3	H3, H5, H10 Presente estudo
			-	-	-	-	7	2	H2, H8 Presente estudo
			-	-	-	-	1	1	H2 Presente estudo
			-	-	-	-	1	1	H5 Presente estudo
			-	-	-	-	1	1	H21 Presente estudo
			-	-	-	-	1	1	H1 Presente estudo
			25	52	52	48A+2m	-	-	- Yonenaga, 1972; Souza, 1981
			3	52	52	48A+2m	5	3	H2-3, H34 Renata Pardini (comunicação pessoal)
		Biritiba Mirim	2	52	52	48A+2m	-	-	- Ventura et al. 2010
		Pilar do Sul	2	52	52	48A+2m	1	-	- Ventura et al. 2010
	São Paulo	Piedade	1	52	52	48A+2m	2	2	H10, H22 Renata Pardini (Presente estudo)
		São João da Boa Vista	1	52	52	48A+2m	1	1	H28 Presente estudo
		Ibiúna	3	52	52	48A+2m	3	3	H3, H5, H8 Presente estudo
		Cotia	4	52	52	48A+2m	5	3	H3-H5 Presente estudo
		Iguape	24	52	52	48A+2m	12	1	H2 Souza, 1981; Presente estudo
		Itapetininga	1	52	52	48A+2m	-	-	- Souza, 1981
		Capão Bonito	1	52	52	48A+2m	1	1	H2 Presente estudo
		Ribeirão Grande	3	52	52	48A+2m	2	2	H2, H26 Presente estudo
		Santa Virgínia	2	52	52	48A+2m	-	-	- Di-Nizo et al. 2014
		Sete Barras	3	52	52	48A+2m	-	-	- Fagundes, 1993
	Paraná	Piraquara	7	52	52	48A+2m	6	4	H2, H23-25 Presente estudo; Hass et al. 2011
		Ortigueira	3	52	52	48A+2m	-	-	- Ventura et al. 2010
	Santa Catarina	Blumenau	2	52	52	48A+2m	-	-	- Hass et al. 2011
	Rio Grande do Sul	Maquiné	9	52	52	48A+2m	9	2	H12-13 Presente estudo
ARGENTINA	Misiones	-	1	52	52	48A+2m	14	4	H2, H18-H20 Suárez et al. 2015
PARAGUAI	San Raphael	-	-	-	-	-	16	2	H2, H27 Presente estudo
	Limoy	-	-	-	-	-	2	2	H2 Presente estudo
TOTAL			141				173	39	

Tabela 2.3. Marcadores microssatélites utilizados no presente trabalho, com nome (*locus*), sequências dos primers, temperatura de anelamento (T °C), tamanho esperado dos fragmentos amplificados, marcadores fluorescentes utilizados em cada caso e referências.

<i>Locus</i>	Primers¹	T° anelamento² (°C)	Tamanho esperado dos fragmentos	Marcador Fluorescente	Referência
AkJ1	F-GTATGGGTCCAACCTAAGTTG R-CAGGATTGAACTCAGTTTCTC	55 (55)	131-167	6-FAM	Moreira et al. 2014
AkL1	F-GTAGTGGGTCCAACCTAAGTTG R-CATACTTGTAAGGGAAGCGTC	58 (52)	111-147	VIC	Moreira et al. 2014
AkLi1.2	F-CACCGCCCTGCTTTTATTTA R-ACAAAAAGGTGGTGGTGCAT	61 (57)	195-253	6-FAM	Moreira et al. 2014
AkPQAc1	F-AGGTACCCGCAACTCTTACA R-GGCAAGTTCTAAGCCAACGA	45 (55)	188-252	PET	Moreira et al. 2014
AkPQAs1	F-CTCCTGCCCTGTGTTTATCA R-CTTGAAGGGCTTCCAGACAC	60 (60)	164-214	NED	Moreira et al. 2014
AkPQT1	F-GGGAAAGCACGACAAGTATGAT R-TTCCTCTTTCCCCTTCCTGT	60 (57)	191-235	VIC	Moreira et al. 2014
Aaz 1	F:GCACAGGACCTTTGTGCT R:GGTCTAGGGTATCCAACACCT	52 (64)	170-194	PET	Vera et al. 2011
Aaz3	F:CTAGCAGAATCCCTCTGTGTGAAA R:GCCTCTCTAAAAAACGAGATTTGC	48 (-)	146-170	-	Vera et al. 2011
Aaz 4	F:GATCTTCTTTCTGGTAAGGATAAAAC R:TGATTGACATACTTGAACAATGT	50 (58)	180-242	NED	Vera et al. 2011
Aaz 5	F:GCAATGATTCTTTAGAAATATCACCA R:CAAACAATTAAGGATTTTGGTC	50 (-)	116-142	-	Vera et al. 2011
Aaz 11	F: GCCTATAGCACACATGTGCA R: AGCAGAATCTTTTCATTTCCAAGA	52 (-)	112-138	-	Vera et al. 2011

¹ Sem a cauda M13; ² Entre parênteses, temperatura de anelamento após a adição da cauda M13.

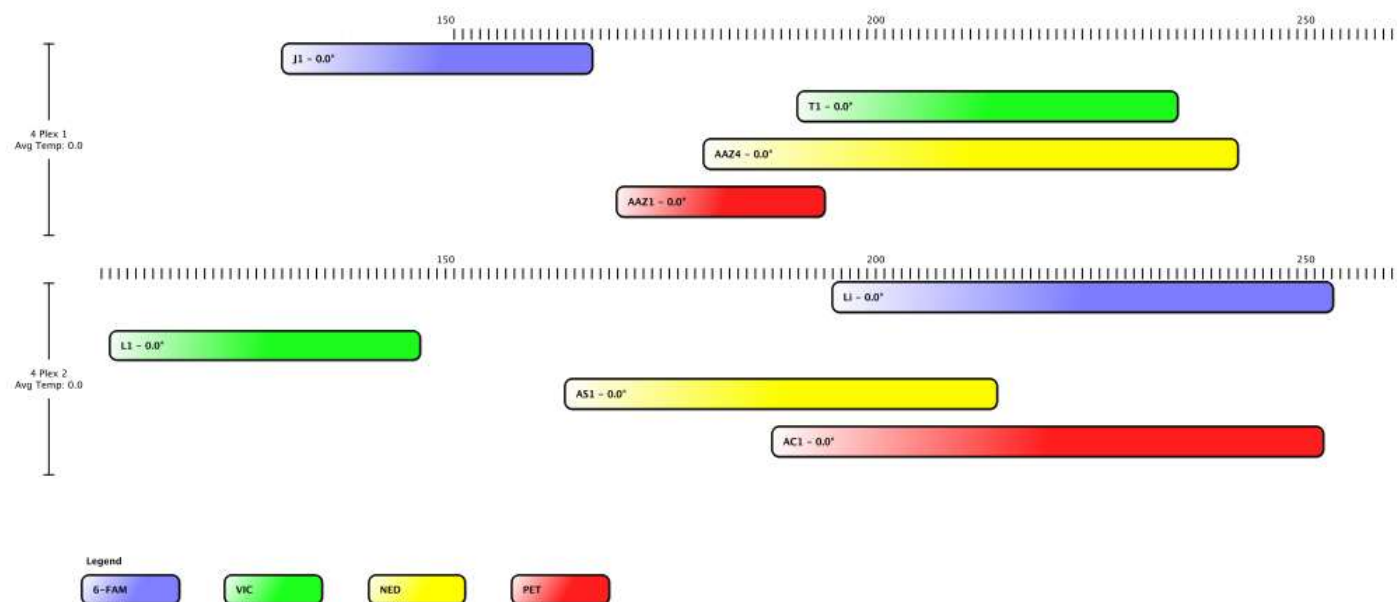


Figura 2.2. Divisão dos marcadores microssatélites para genotipagem multiplex de *Thaptomys nigrita* feita no programa Multiplex Manager. Em azul, marcadores microssatélites marcados com 6-FAM; em verde, com VIC; em amarelo, NED; em vermelho, PET.

3. RESULTADOS

3.1 Análises Filogenéticas

Das 201 amostras foram obtidas sequências de 173 indivíduos para o *CytB*, revelando 39 haplótipos e de 89 indivíduos para o *IRBP*. O melhor modelo evolutivo, para ambos os critérios de otimização, foi o HKY + G (gamma=0.2730). O teste de saturação mostrou que as sequências não estavam saturadas em nenhuma posição das bases do códon.

Thaptomys mostrou-se como um grupo monofilético nas análises do *CytB* e do *IRBP*, exceto por seis dos 19 animais de Mindurí (MG; MP102, MP108, MP111, MP115, MP118, MP124; localidade 9, Figura 2.2) que formaram um grupo monofilético, irmão aos grupos externos, com alto suporte (88 e 1, respectivamente; Figura 2.3) e divergência genética de 9,39% em relação às demais amostras de *Thaptomys*.

Assim, o clado *Thaptomys* foi composto por amostras de 25 localidades, compreendendo Una, na Bahia, que representa o extremo norte da distribuição geográfica para a gênero, passando pelo Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Misiones (Argentina) e San Raphael (extremo sul da distribuição geográfica conhecida para o gênero), incluindo Itatiaia (RJ; ponto 12, Figura 2.1), a localidade mais próxima da localidade-tipo da espécie (proximidades da cidade do Rio de Janeiro; Hershkovitz 1998).

Dentro de *Thaptomys*, recuperou-se um grupo monofilético “Clado Norte” (MV=58; IB=1) de abrangência geográfica ampla, com 104 amostras que compreende amostras de Una (BA; 2n=50/FN=48), Ibitirama (ES; 2n=52/FN=52), Luminárias (MG; 2n=48-51/FN=52), Mindurí (MG; 2n não definido), Itatiaia (RJ; 2n=52/FN=52), até Tapiraí (SP; 2n=52/FN=52). Nenhum cariótipo formou um grupo monofilético, embora os 9 espécimes com 2n=50/FN=48 de Una (BA), se organizaram em dois clados distintos e exclusivos. As demais 63 amostras apresentaram 2n=52/FN=52 e formaram uma politomia, compreendendo as localidades “Sul”: Tapiraí (SP), Iguape (SP), Capão Bonito (SP), Ribeirão Grande (SP), Piraquara (PR), Maquiné (RS), Misiones (Argentina, sem cariótipo), San Raphael e Limoy (Paraguai, sem cariótipo). Assim, não se pode concluir se o 2n=52/FN=52 é o cariótipo básico em *Thaptomys*.

Em todos os critérios de otimização (ML e IB) com sequências de *IRBP*, *Thaptomys* foi recuperado como grupo monofilético com suportes significativos para o clado (100 e 1, respectivamente). Em nenhuma das análises foi observada a formação de

grupos monofiléticos correspondentes aos cariótipos ou que demonstrasse qualquer estruturação geográfica (Apêndice 2).

3.2 Rede de haplótipos

A relação hierárquica entre os haplótipos com as 167 amostras (Figura 2.4) apresentou uma configuração em estrela, com um haplótipo central (H2), mais frequente ($n=78$ indivíduos, 16 localidades), e os demais se diferenciando a partir dele, com poucos passos mutacionais, não indicando estruturação populacional. A localidade Una (BA) foi a única a possuir 5 haplótipos exclusivos (H34-38), diferenciando-se de dois a cinco passos mutacionais do haplótipo mais frequente (Figura 2.4).

Quando a análise envolveu apenas espécimes cariotipados ($n=89$, Figura 2.5), a configuração em estrela se repete, sendo o haplótipo mais frequente (H1) representado, principalmente, por indivíduos com $2n=52/FN=52$. Os indivíduos com $2n=50/FN=48$ apresentaram haplótipos exclusivos e os com $2n=48-51/FN=52$ apresentaram quatro haplótipos, sendo H1 e H2 compartilhados com indivíduos com $2n=52/FN=52$ e H13 e H14, exclusivos.

3.3 Divergência Genética

3.3.1. Entre cariogrupos

A divergência genética entre espécimes com diferentes cariótipos, utilizando o *CytB*, foi de 1,89% entre $2n=50/FN=48$ e $2n=52/FN=52$, 1,2%, entre $2n=50/FN=48$ e $2n=48-51/FN=52$ e 1,81%, entre $2n=48-51/FN=52$ e $2n=52/FN=52$. A divergência dentro dos grupos $2n=50/FN=48$, $2n=48-51/FN=52$ e $2n=52/FN=52$ foi, respectivamente, de 1,37%, 0,83% e 1,06%.

3.3.2. Entre localidades

Na análise de divergência genética par a par, considerando todas as amostras, cariotipadas ou não, a amostra RM75, de Una, apresentou divergência de 3,85%, quando comparada a um espécime do Paraguai (TK 145116). Quando se observou a distribuição das localidades na filogenia, notou-se que Tapiraí (SP) foi a única localidade presente no grupo monofilético e na politomia. A divergência genética entre esses dois grupos foi de 2,15%. Dos 1084 pb gerados do gene nuclear IRBP para 65 espécimes de 17 localidades, com divergência par a par variando de 0,1%, entre amostras de Una e Iguape, a 1,1% entre Una e Iguape, distantes a cerca de 1.373 km (Apêndice 3).

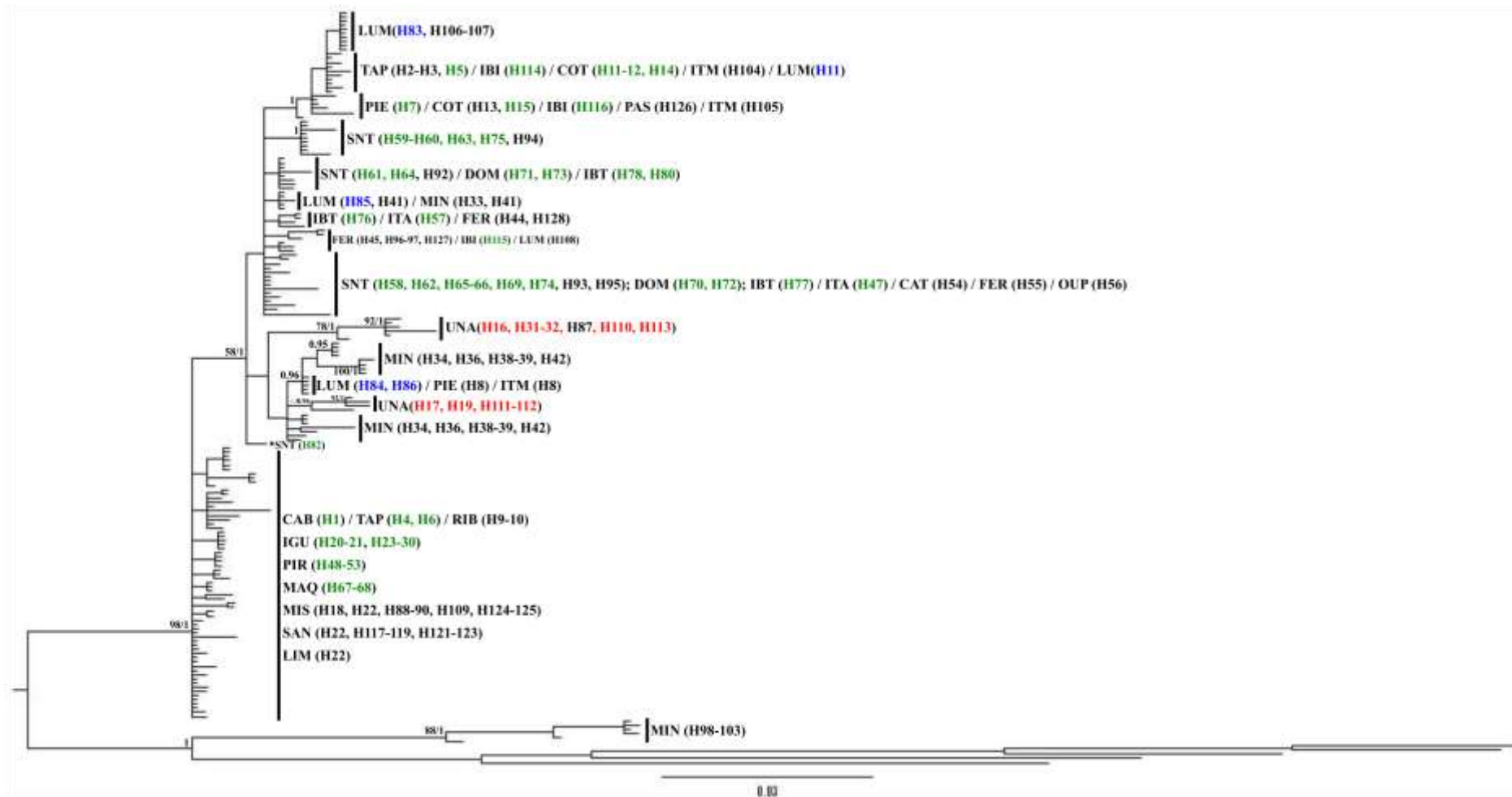


Figura 2.3. Árvore filogenética obtida através da análise de Inferência Bayesiana com sequências parciais de 801pb do gene mitocondrial *CytB* de 176 espécimes de *Thaptomys*. Os números nos nós representam os suportes nas análises de Máxima Verossimilhança (*bootstrap*) e na Inferência Bayesiana as (probabilidades a posteriore), respectivamente. As cores dos haplótipos nos ramos terminais representam os três cariogrupos observados no gênero, onde vermelho são indivíduos com 2n=50/FN=48, azul, 2n=48-51/FN=52 e verde, 2n=52/FN=52. Em preto, não há informação citogenética.

Tabela 2.4. Divergência genética (K2P) entre localidades ao longo da distribuição geográfica de *Thaptomys* utilizando apenas espécimes cariotipados.

	UNA	SNT	DOM	IBT	ITA	PIE	LUM	CAP	SJB	IBIU	TAP	COT	IGU	PIR
UNA														
SNT	0,0165													
DOM	0,0173	0,0051												
IBT	0,0157	0,0065	0,0058											
ITA	0,0169	0,0050	0,0047	0,0058										
PIE	0,0228	0,0107	0,0102	0,0119	0,0094									
LUM	0,0182	0,0093	0,0091	0,0093	0,0084	0,0088								
CAP	0,0220	0,0146	0,0146	0,0146	0,0141	0,0200	0,0169							
SJB	0,0183	0,0158	0,0160	0,0133	0,0155	0,0214	0,0161	0,0227						
IBIU	0,0201	0,0081	0,0077	0,0092	0,0069	0,0062	0,0076	0,0173	0,0187					
TAP	0,0213	0,0133	0,0132	0,0134	0,0125	0,0151	0,0134	0,0084	0,0214	0,0133				
COT	0,0221	0,0097	0,0096	0,0111	0,0084	0,0046	0,0070	0,0193	0,0207	0,0048	0,0137			
IGU	0,0199	0,0127	0,0127	0,0126	0,0122	0,0173	0,0147	0,0029	0,0207	0,0148	0,0083	0,0166		
PIR	0,0220	0,0148	0,0150	0,0150	0,0145	0,0197	0,0170	0,0037	0,0227	0,0171	0,0090	0,0190	0,0045	
MAQ	0,0206	0,0151	0,0151	0,0151	0,0146	0,0196	0,0170	0,0066	0,0232	0,0171	0,0109	0,0189	0,0051	0,0069

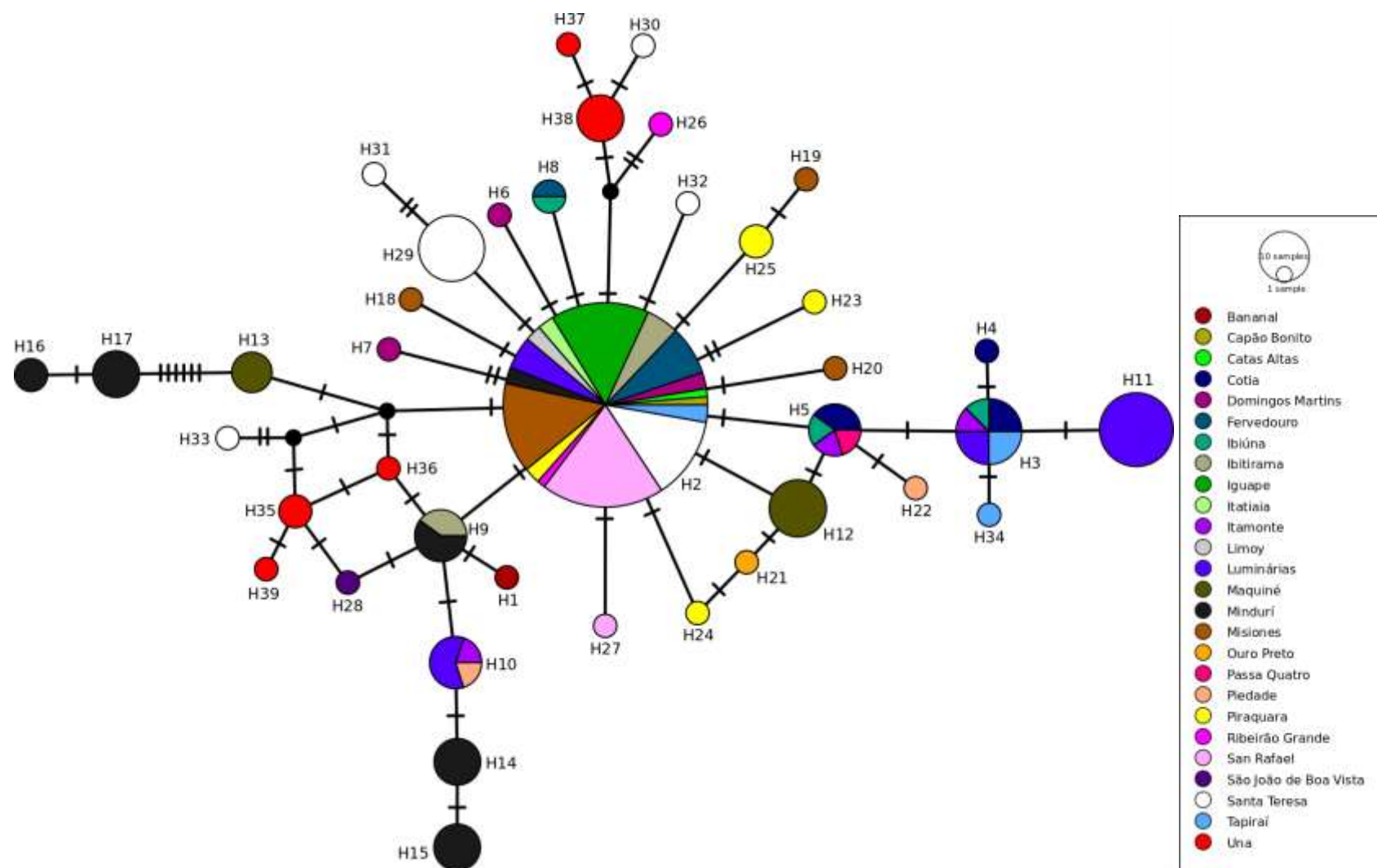


Figura 2.4. Rede de haplótipos evidenciando o compartilhamento de haplótipos para o gene mitocondrial *CytB* (801pb) entre os 176 espécimes de *Thaptomys* ao longo de sua distribuição geográfica. Cada cor representa uma localidade (legenda). O tamanho de cada haplótipo é proporcional ao número de indivíduos.

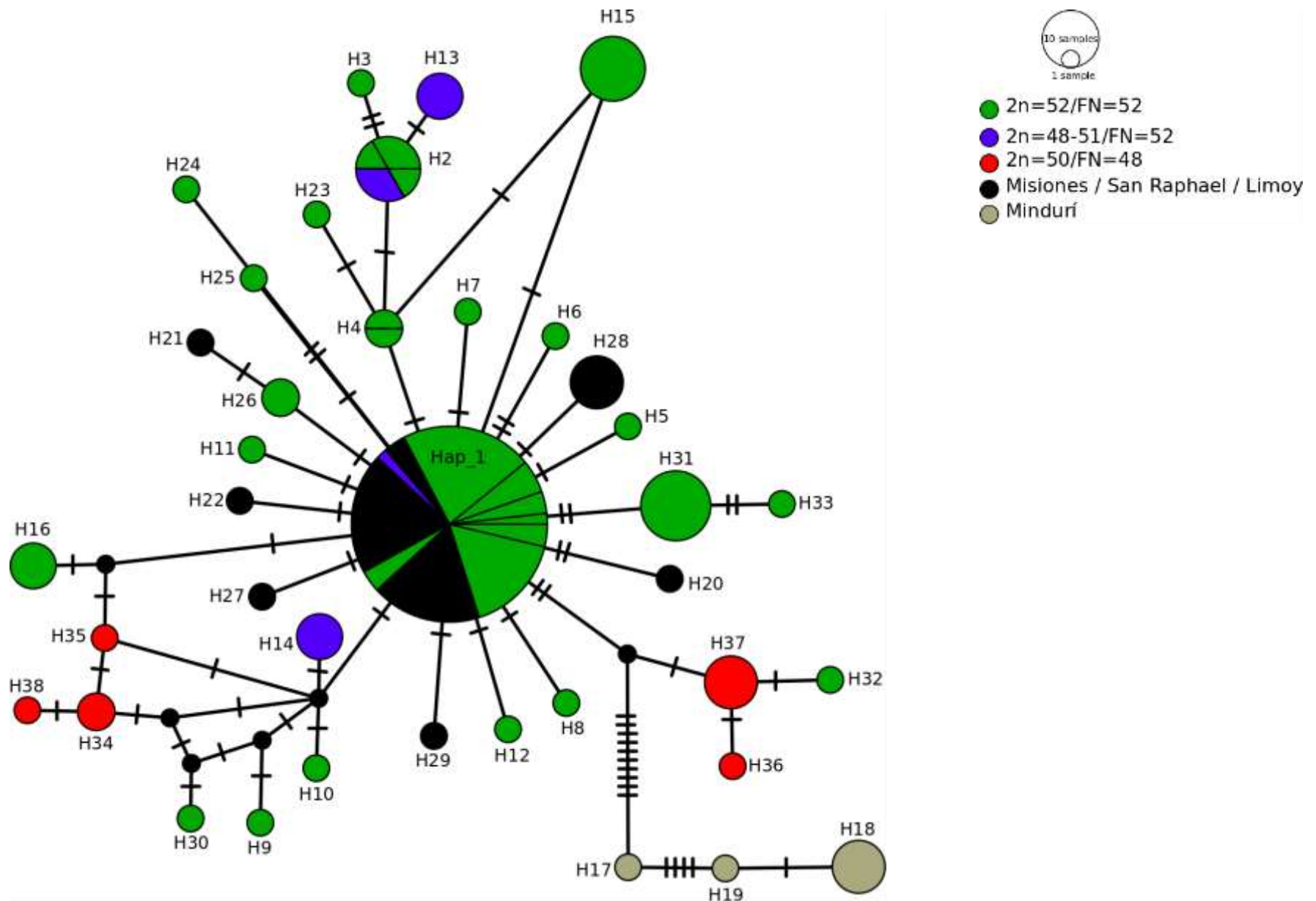


Figura 2.5. Rede de haplótipos evidenciando o compartilhamento de haplótipos entre os espécimes de *Thaptomys*, com base nas informações cariotípicas dos espécimes utilizados. Cada cor representa um cariógrupo, sendo vermelho 2n=50/FN=48; verde, 2n=52/FN=52; e azul, 2n=48-51/FN=52. Em preto, espécimes de Misiones (Argentina), San Raphael e Limoy (Paraguai), que foram utilizados como representativos para abranger a maior distribuição geográfica possível. Em cinza, animais de Minduri (Minas Gerais) que formam o clado irmão dos grupos externos nas análises filogenéticas.

3.4. Análises Populacionais

3.4.1. Marcador mitocondrial (*CytB*)

O teste de SAMOVA utilizando *CytB* mostrou que as amostras de *Thaptomys* estão organizadas em oito agrupamentos ao longo de sua distribuição geográfica (Tabela 5), sendo este o arranjo que apresenta menor diferenciação genética entre as localidades dentro dos grupos, e a maior entre grupos (Tabela 2.5; Figura 2.6).

Tabela 2.5. Teste de Variância Molecular Espacial para a obtenção da melhor organização populacional das amostras de *Thaptomys* do presente trabalho a partir do índice de diversidade molecular Φ_{ST} . k representa o número de populações admitidas para o teste (variou de 2 a 10).

Populações Admitidas	Φ_{ct}	Φ_{st}	Entre Grupos	Entre Localidades Dentro Dos Grupos	Dentro De Localidades
K=2	0,47	0,65	47,4	17,16	35,44
K=3	0,49	0,62	49,27	12,28	38,44
K=4	0,52	0,62	51,53	10,14	38,33
K=5	0,52	0,62	52,08	9,64	38,27
K=6	0,52	0,61	52,17	9,2	38,63
K=7	0,52	0,61	52,12	8,7	39,18
K=8	0,54	0,58	53,91	4	42,1
K=9	0,53	0,58	52,7	5,78	41,52
K=10	0,53	0,58	53,14	5,01	41,85

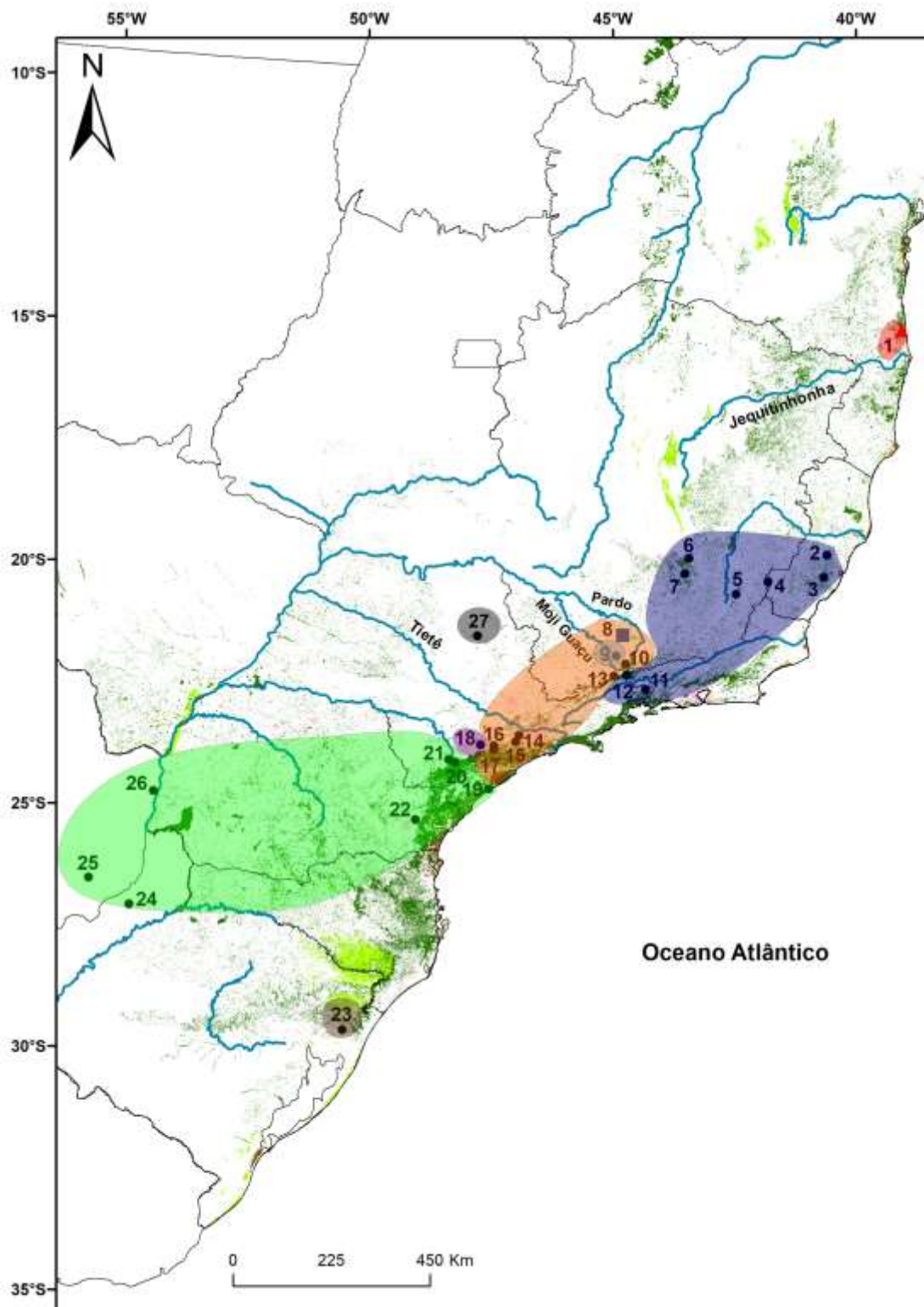


Figura 2.6. Estrutura populacional em *Thaptomys* determinada pela análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) a partir dos 801pb do gene mitocondrial *CytB*. Podem ser observadas 8 populações, que são representadas por cores distintas: **vermelho** (1 - Una-BA), **azul** (2 - Santa Teresa, 3 - Domingos Martins, 4 - Ibitirama – ES; 12 - Itatiaia – RJ; 5 – Fervedouro, 7 - Ouro Preto, 6 - Catas Altas – MG; 11 - Bananal – SP), **laranja** (10 - Itamonte, 8 - Luminárias, 13 - Passa Quatro – MG; 15 - Cotia, 14 - Ibiúna, 16 - Piedade e 17 - Tapiraí – SP), **cinza** (9 – Minduri – MG), **roxo** (18 - Pilar do Sul – SP), **preto** (27 – São João da Boa Vista – SP), **marrom** (23 – Maquiné – RS) e **verde** (19 – Iguape, 20 – Capão Bonito e 21 – Ribeirão Grande – SP; 22 – Piraquara – PR; 24 – Misiones – Argentina; 25 – San Raphael e 26 – Limoy – Paraguai).

3.4.2. Microssatélites

Oito dos 11 *loci* amplificaram em 175 exemplares, com sucesso de (87,06%). O número de alelos por *locus* variou de 15 a 23 (Tabela 2.6), sendo San Raphael-Limoy (Paraguai, cariótipo desconhecido) a que apresentou maior diversidade de alelos efetivos para o *locus* J1 ($N_e=7,895$), Santa Teresa (ES, $2n=52/FN=52$), para os *loci* T1 ($N_e=9,778$), Aaz4 ($N_e=9,047$) e As1 ($N_e=7,224$) e Mindurí (MG, cariótipo desconhecido) para os *loci* Li ($N_e=2,941$) e Ac1 ($N_e=6,541$) (Tabela 2.7). Os tamanhos observados dos alelos variaram em relação aos esperados nas descrições originais, mostrando uma maior diversidade em número e tamanho de alelos.

A análise para verificar a presença de alelos nulos sugeriu a possível presença de alelos nulos em nos *locus* Aaz1 e L1 devido ao elevado número de homozigotos observados (Figura 2.7). Assim, esses *loci* foram retirados das análises posteriores. Também foram excluídos os indivíduos em que se amplificou menos que quatro *loci*. Dessa maneira, foram utilizados 149 indivíduos de 21 localidades nas demais análises com *missing data* de 5,9%. Para algumas localidades os marcadores As1 (Santa Teresa/ES, Luminárias/MG e Iguape/SP) J1 (Una/BA) e Li (SAR/Paraguai) desviaram do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As localidades que apresentaram as maiores diversidades de alelos privados foram Santa Teresa ($2n=52/FN=52$), com cinco alelos, seguido de Una ($2n=50/FN=48$) e Luminárias ($2n=48-51/FN=52$), com quatro alelos cada (Tabela 2.7).

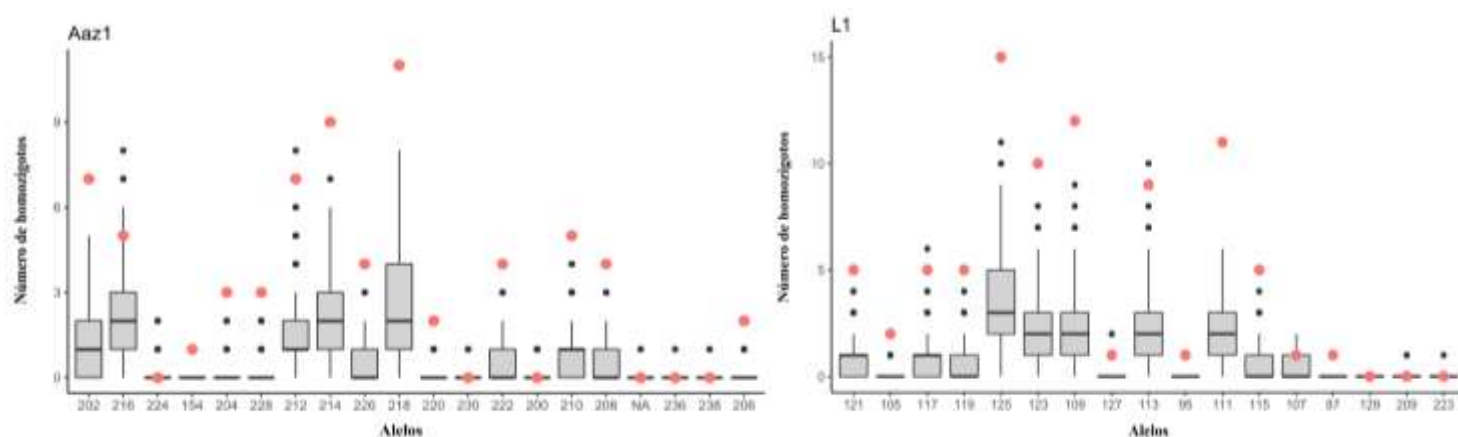


Figura 2.7. Gráficos *boxplots* mostrando o número de homozigotos esperados para cada alelo nos indivíduos do presente estudo para os marcadores Aaz1 e L1. Pontos pretos indicam *outliers*, enquanto os vermelhos indicam o número de homozigotos para cada alelo. Pontos vermelhos acima das linhas verticais nos *boxplots* indicam excesso de homozigotos para cada alelo.

Tabela 2.6. Marcadores microssatélites utilizados no presente trabalho, com nome (*locus*), temperatura de anelamento (T °C), tamanho esperado dos fragmentos amplificados, tamanho observado dos fragmentos amplificados, número total de alelos e referência original da descrição dos primers.

<i>Locus</i>	T° anelamento ¹ (°C) ²	Tamanho esperado (pb)	Tamanho observado (pb)	Número total de alelos	Referência
AkJ1	55 (55)	131-167	113-191	23	Moreira <i>et al.</i> 2014
AkL1	58 (52)	111-147	95-223	16	Moreira <i>et al.</i> 2014
AkLi1.2	61 (57)	195-253	197-277	15	Moreira <i>et al.</i> 2014
AkPQAc1	45 (55)	188-252	140-244	20	Moreira <i>et al.</i> 2014
AkPQAs1	60 (60)	164-214	142-218	21	Moreira <i>et al.</i> 2014
AkPQT1	60 (57)	191-235	187-225	20	Moreira <i>et al.</i> 2014
Aaz 1	52 (64)	170-194	154-228	15	Vera <i>et al.</i> 2011
Aaz3	48 (-)	146-170	-	-	Vera <i>et al.</i> 2011
Aaz 4	50 (58)	180-242	126-236	22	Vera <i>et al.</i> 2011
Aaz 5	50 (-)	116-142	-	-	Vera <i>et al.</i> 2011
Aaz 11	52 (-)	112-138	-	-	Vera <i>et al.</i> 2011

¹ Sem a cauda M13; ² Entre parênteses, temperatura de anelamento após a adição da cauda M13.

Tabela 2.7. Número de alelos privados por localidade, *locus*, tamanho do alelo e a respectiva frequência observada.

Localidade	Locus	Tamanho do alelo (pb)	Frequência observada
UNA	J1	161	0,100
		163	0,250
		165	0,100
	Aaz4	200	0,045
ST	J1	113	0,023
	Aaz4	126	0,023
	As1	156	0,023
		158	0,023
	Ac1	220	0,071
	Aaz4	228	0,125
DM	As1	190	0,125
	Ac1	200	0,125
	T1	187	0,100
IBI	Li	223	0,100
	As1	166	0,100
FER	Ac1	218	0,300
LUM	T1	189	0,026
	Li	233	0,026
		237	0,026
	As1	214	0,026
BIT	Ac1	222	0,500
COT	Ac1	210	0,125
IGU	Aaz4	236	0,091
	As1	194	0,050
	Ac1	216	0,111
PIE	Li	245	0,500
TAP	T1	225	0,100
	As1	218	0,200
PIS	Li	269	0,500
		277	0,500
MAQ	Aaz4	232	0,063
		234	0,063
SAR	J1	123	0,033
		291	0,033
	Ac1	140	0,033

Tabela 2.8. Valores de F_{st} , par a par, entre as populações de *Thaptomys* analisadas no presente trabalho, a partir dos dados de microssatélite.

UNA	ST	DM	IBI	MIN1	FER	ITA	LUM	MIN2	BIT	COT	IBIU	IGU	PIE	RIB	TAP	PIS	ORT	PIR	MAQ	MIS	SAR	
0,000																					UNA	
0,056	0,000																				ST	
0,078	0,036	0,000																			DM	
0,097	0,064	0,077	0,000																		IBI	
0,066	0,054	0,057	0,091	0,000																	MIN1	
0,099	0,080	0,091	0,085	0,094	0,000																FER	
0,113	0,090	0,108	0,100	0,099	0,074	0,000															ITA	
0,109	0,075	0,076	0,090	0,091	0,131	0,153	0,000														LUM	
0,089	0,069	0,077	0,096	0,044	0,108	0,119	0,108	0,000													MIN2	
0,200	0,188	0,177	0,240	0,167	0,232	0,257	0,223	0,134	0,000												BIT	
0,188	0,162	0,183	0,228	0,124	0,221	0,231	0,241	0,111	0,137	0,000											COT	
0,232	0,217	0,236	0,227	0,203	0,229	0,250	0,270	0,179	0,295	0,255	0,000										IBIU	
0,151	0,132	0,138	0,178	0,111	0,159	0,200	0,191	0,096	0,116	0,105	0,233	0,000									IGU	
0,156	0,140	0,162	0,203	0,124	0,212	0,238	0,211	0,149	0,247	0,168	0,230	0,160	0,000								PIE	
0,243	0,218	0,255	0,291	0,230	0,319	0,364	0,291	0,227	0,303	0,257	0,398	0,228	0,302	0,000							RIB	
0,145	0,131	0,133	0,156	0,088	0,160	0,181	0,179	0,083	0,136	0,097	0,218	0,082	0,152	0,203	0,000						TAP	
0,290	0,261	0,264	0,291	0,251	0,236	0,262	0,337	0,253	0,358	0,328	0,370	0,302	0,354	0,411	0,256	0,000					PIS	
0,285	0,262	0,267	0,289	0,239	0,254	0,283	0,313	0,223	0,374	0,320	0,330	0,280	0,319	0,378	0,242	0,391	0,000				ORT	
0,153	0,133	0,134	0,152	0,115	0,136	0,138	0,173	0,089	0,148	0,139	0,188	0,112	0,178	0,240	0,077	0,228	0,171	0,000			PIR	
0,160	0,131	0,134	0,161	0,107	0,140	0,128	0,199	0,094	0,135	0,114	0,205	0,104	0,168	0,244	0,087	0,222	0,203	0,050	0,000		MAQ	
0,247	0,238	0,242	0,283	0,229	0,269	0,270	0,260	0,243	0,322	0,330	0,336	0,295	0,340	0,360	0,262	0,378	0,317	0,197	0,225	0,000	MIS	
0,178	0,133	0,139	0,181	0,142	0,208	0,238	0,187	0,126	0,191	0,197	0,265	0,180	0,209	0,216	0,142	0,314	0,213	0,151	0,171	0,236	0,000	SAR

O teste de AMOVA, considerando todas as localidades como uma única população, mostrou que a maior porcentagem de variação molecular está entre indivíduos dentro das localidades, com 82% de divergência, enquanto que a diversidade entre localidades foi de 13% e dentro das localidades foi de 5%.

A Análise de Componente Principal (PCoA) mostrou que a maior parte da diversidade genética dos microssatélites ao longo da distribuição geográfica do gênero é explicada pelos três primeiros eixos (22,16%, 18,28% e 15,19%, respectivamente; Figura 2.8). Além disso, é observada a formação de dois grupos (“Grupo Sul” e Clado “Norte”) com ampla distribuição geográfica que, de acordo com as localidades das amostras, são semelhantes aos das árvores obtidas nas análises filogenéticas do gene mitocondrial *Cytb* (tanto para MV, quanto para IB, Figura 2.3). As diferenças observadas na organização das amostras nos grupos formados nas filogenias moleculares e na PCoA é a presença das amostras de Cotia (SP) no “Grupo S” e o não compartilhamento de amostras de Tapiraí (SP) entre os dois grupos (Figura 2.8), o que é observado nas filogenias moleculares.

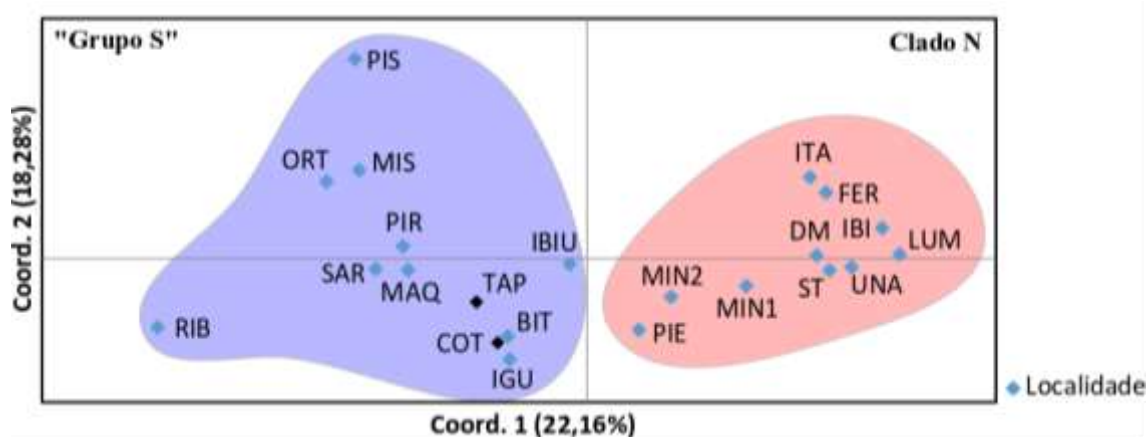


Figura 2.8. Análise de Componente Principal (PCoA) mostrando a organização das localidades em dois grandes grupos com ampla distribuição geográfica, de acordo com os dados de microssatélites (6 loci). Em destaque, em preto, as amostras de Tapiraí e Cotia (SP), que estão no “Grupo S”, diferindo dos dados obtidos nas filogenias moleculares com o gene mitocondrial *Cytb* (801pb).

A estruturação geográfica obtida através do STRUCTURE mostrou que o número de populações que melhor explica a diversidade observada em *Thaptomys*, segundo o conjunto de dados com os seis loci de microssatélites, é igual a cinco ($k=5$; Figura 2.9), sendo elas: G1; Una (BA); Santa Teresa, Domingos Martins e Ibitirama (ES); Fervedouro, Itamonte e Ouro Preto (MG); Ibiúna, São João da Boa Vista e Pilar do Sul (SP); G2: Minduri (MG); G3: Luminárias (MG); G4: Biritiba Mirim, Cotia, Iguape,

Tapiraí e Piedade (SP); Piraquara (PR) e Maquiné (RS); e G5: Ribeirão Grande (SP), Ortigueira (PR), Misiones (Argentina) e San Raphael-Limoy (Paraguai).

As populações recuperadas pelos dados de microsatélites mostram uma variação geográfica de acordo com um gradiente Norte-Sul, onde se observa uma mudança gradual na composição genética e nas probabilidades das amostras pertencerem a diferentes populações (Figura 2.10). Cada população apresenta um perfil distinto das demais populações. Os indivíduos localizados nos extremos da distribuição geográfica de *Thaptomys*, como Una-BA (2n=50/FN=48; extremo norte – amarelo) e em San Raphael-PAR (não cariotipados) no extremo sul, são bastante distintos, do mesmo modo que as amostras de Luminárias-MG (2n=48-51/FN=52) e as amostras de Iguape-SP (2n=52/FN=52) apresentam composição genética distinta de todas as demais (Figura 2.9).

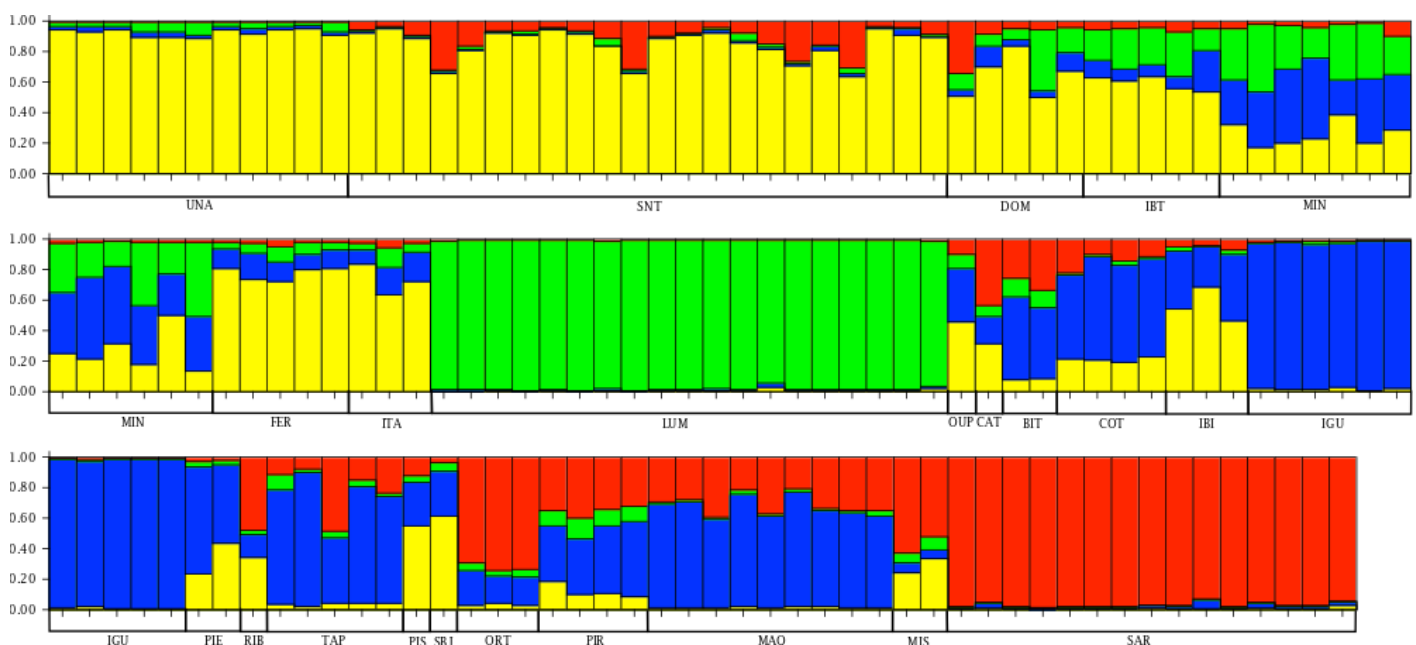


Figura 2.9. Estruturação geográfica com $k = 5$ populações para *Thaptomys* ao longo da distribuição geográfica para o gênero, a partir da análise realizada no programa Structure com os genótipos de microsatélites (6 *loci*). Cada barra representa um indivíduo e as cores são as probabilidades deles pertencerem a um grupo ou outro. Barras pretas e siglas (abaixo) representam as localidades das amostras, segundo a Tabela 2.2.

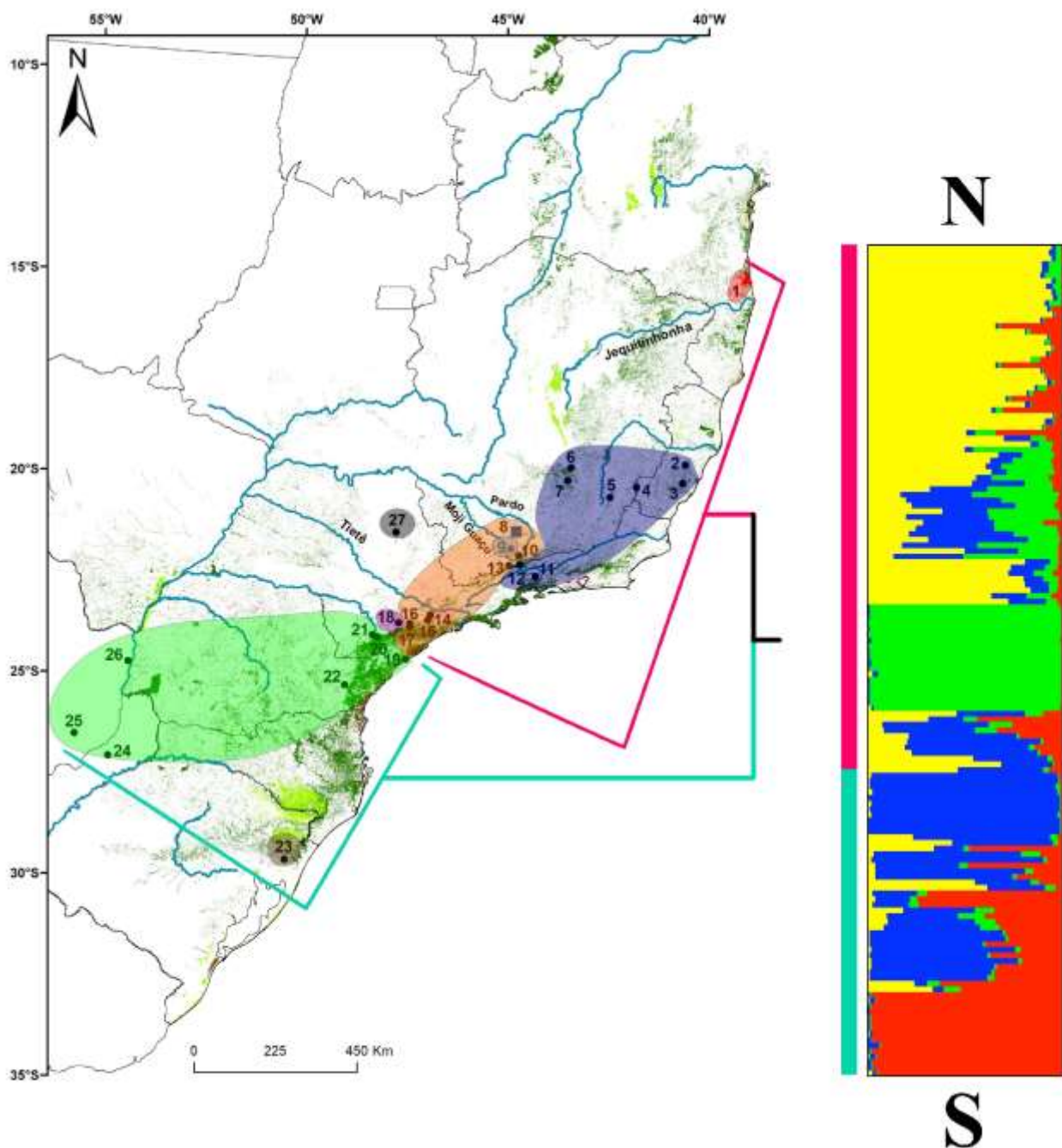


Figura 2.10. Estruturação geográfica de *Thaptomys* ao longo da sua distribuição geográfica na Mata Atlântica por diferentes metodologias. No mapa estão as populações determinadas pela Análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) a partir de sequências parciais (801pb) do gene mitocondrial *CytB*, as quais apresentam cores específicas; o ramo representa o grupo norte recuperado nas filogenias moleculares a partir do mesmo conjunto de dados no teste de SAMOVA; e o bar plot, evidencia as cinco populações recuperadas pelos dados dos seis *loci* de microssatélites, em que se observa uma diferenciação norte-sul dos indivíduos analisados.

3.5. Modelagem de nicho

A modelagem de nicho revelou as áreas de maior adequabilidade para *Thaptomys*, de acordo com as variáveis ambientais utilizadas. As áreas de adequabilidade foram praticamente iguais em todos os cenários testados, abrangendo, principalmente, as regiões serranas do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, no Brasil. Na Argentina e no Paraguai, as áreas de ocorrência para a espécie apareceram, de maneira geral, pouco adequadas (Figura 2.11).

Quando comparou-se as áreas de adequabilidade nos diferentes cenários testados, algumas diferenças importantes foram observadas. Ao considerar todos os pontos de ocorrência e cariótipos, Una ($2n=50/NF=48$; BA), Luminárias ($2n=48-51/NF=52$; MG) e as demais localidades com $2n=52/NF=52$ apresentaram-se como adequadas (Figura 13a). Entretanto, quando Una, única localidade onde o cariótipo com $2n=50/NF=48$ é observado, foi retirada da análise, a região deixou de ser adequada (Figura 2.11b). Quando Luminárias foi retirada da análise, aquela região continuou como adequada (Figura 2.11c). Por fim, quando apenas as localidades com registros de espécimes com $2n=52/NF=52$ foram mantidas para a análise, Una continuou com baixa adequabilidade e Luminárias, com alta adequabilidade. (Figura 2.11d). Nossos dados podem indicar que a população de Uma, na Bahia, apresenta diferentes necessidades ambientais que as populações com os demais cariótipos.

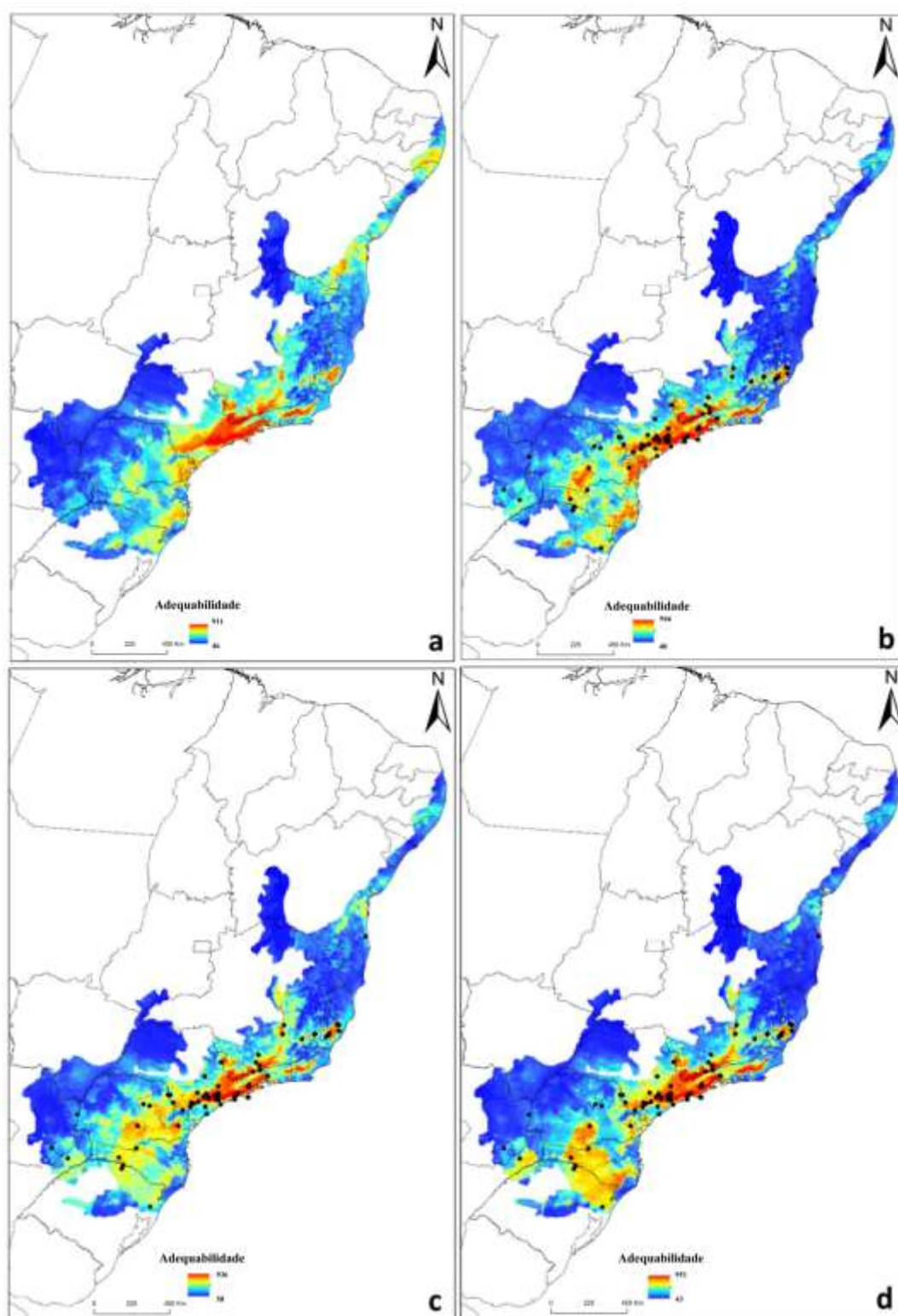


Figura 2.11. Modelagem de nicho revelando as áreas de maior adequabilidade para *Thaptomys* ao longo da distribuição geográfica na Mata Atlântica e os cenários testados, considerando (a) todos os cariogrupos, (b) retirando os pontos de registro de espécimes com 2n=50/FN=48, (c) retirando apenas os registros de animais com 2n=48-51/FN=52 e (d), considerando apenas as localidades de espécimes com 2n=52/FN=52.

4. DISCUSSÃO

4.1. As dificuldades dos estudos taxonômicos em *Thaptomys*

O gênero *Thaptomys* foi reconhecido pela primeira vez por Thomas, em 1916. Desde então, os estudos taxonômicos com o grupo foram realizados, exclusivamente, baseados em dados morfológicos até 1961, com Cabrera. Apenas em 1999 *Thaptomys* foi incluído em um trabalho com abordagem molecular (Smith e Patton, 1999) e, posteriormente, em 2003 (D'Elia et al. 2003) e 2007 (Smith e Patton 2007). Apesar desses trabalhos incluírem *Thaptomys* em suas análises, não houve proposta de se discutir a taxonomia do gênero, mas, somente indicar sua posição filogenética dentro de Akodontini.

Por outro lado, dados citogenéticos são conhecidos para o gênero desde 1978, analisados pela primeira vez, ainda como *Akodon nigrita*, para espécimes coletados em regiões do estado de São Paulo (Yonenaga, 1978). Nesse estudo, foram analisados poucos indivíduos de São Paulo. Posteriormente, em 1993, Fagundes analisou espécimes que apresentaram o mesmo cariótipo com $2n=52/FN=52$ observado por Yonenaga.

Após 50 anos do trabalho realizado por Cabrera (1961), Moreira e Oliveira (2011) direcionaram seus esforços para analisar morfológicamente a maior amostra de *Thaptomys* em um único trabalho, compreendendo toda a distribuição geográfica do gênero na Mata Atlântica brasileira, com 379 espécimes e 30 localidades. Nesse trabalho, os autores relatam a inclusão de 103 animais coletados entre 1943-1945 no programa “*Yellow Fever Research Service*” nas regiões de Ilhéus e Buerarema, próximas à Una (BA) (73 km e 47 km, respectivamente).

Os primeiros dados citogenéticos para espécimes da Bahia só foram obtidos em 1998 (V. Fagundes, comunicação pessoal) e publicados em 2004 (Ventura et al. 2004) como um cariótipo novo com $2n=50/FN=48$, exclusivo de Una.

Apenas em 2010 foi publicada a primeira filogenia molecular buscando-se entender a diversidade cariotípica e geográfica no gênero (Ventura et al. 2010), utilizando 18 espécimes de oito localidades. Nota-se, portanto, que os trabalhos com abordagem taxonômica em *Thaptomys* ou demoram muito tempo para serem feitos, como no caso das análises morfológicas, ou são feitos com amostras pequenas, de pouca representatividade geográfica, o que dificulta a resposta de algumas questões importantes.

Isso pode estar associado a vários impedimentos, dos quais pode-se destacar a dificuldade em se capturar espécimes de *Thaptomys* pela sua própria história natural. *Thaptomys* é um gênero semi-fossorial, terrestre e principalmente diurno (Teta et al. 2015). São coletados tanto em florestas primárias, quanto secundárias, e nas pastagens próximas à essas florestas (Davis 1947; Myers e Wetzel, 1979). No

Brasil, geralmente são encontrados sob troncos e raízes de árvores (Davis 1947). No Paraguai, são capturados em regiões de floresta tropical úmida ao longo de caminhos através de grama, em pilhas de madeira e ao lado de troncos caídos (Myers e Wetzel, 1979). Essas características, portanto, podem refletir em uma interpretação de que *Thaptomys nigrita* é uma espécie rara, com populações pequenas e, por isso, um baixo índice de captura, o que é recorrentemente relatado em vários trabalhos (Gatto-Almeida et al. 2016; Geise et al. 2004; Bonvicino et al. 2002). Com isso, precisa-se de estudos mais detalhados sobre a biologia da espécie, como de captura, marcação e recaptura, acompanhamento dos indivíduos capturados com linhas de carretel, com o intuito de observar onde e como vivem e estudo de hábitos alimentares, por exemplo.

De 2013 a 2015 foram realizadas várias campanhas em Una (BA) na tentativa de capturar novos espécimes de *Thaptomys*, pois o último registro que se tem desse gênero na região é de 1998 (ao menos dos indivíduos utilizados no presente estudo). Nesse período, apenas um indivíduo foi coletado e incorporado à presente amostra (LGA 4014).

No presente trabalho é apresentada a maior amostragem (em número de indivíduos e abrangência geográfica) de *Thaptomys* em uma abordagem citogenética (n=141), sendo aplicadas técnicas de coloração de cromossomos, bandejamento, FISH e pintura cromossômica; numa análise molecular (n=201), com sequenciamento de genes mitocondrial e nuclear e genotipagem por microssatélites; e numa análise de distribuição geográfica, com coletas, obtenção de tecidos por doação de vários pesquisadores e levantamento de pontos de ocorrência para análises de modelagem de nicho.

Cada método utilizado no presente estudo pode apresentar problemas que muitas vezes são intrínsecos à própria técnica. Um exemplo é a amplificação de sequências mitocondriais que estão presentes no genoma nuclear, conhecidas como *Numts* ou pseudogenes. *Numts* são cópias não funcionais de sequências mitocondriais que se incorporaram ao genoma nuclear (Leite 2012). Esse tipo de cópia já foi detectada em mais de 85 organismos de eucariotos (Hazkani-Covo et al. 2010). A transferência de genes mitocondriais para o DNA nuclear pode ocorrer através de transferência direta, ou pode ser mediada por RNAs, caso em que os elementos virais participam (Williams & Knowlton 2001, D'Errico et al. 2004, Frézal & Leblois 2008, Song et al. 2008). Assim, quando transferido para o núcleo, o gene mitocondrial perde sua função original e é livre para acumular mutações, mesmo que em taxas diferentes que a do genoma mitocondrial (Strugnell e Lindgren 2007). Por isso, conclusões errôneas podem ser observadas quando os pseudogenes são incluídos nas análises de sequências mitocondriais (Leite 2012).

Nas análises filogenéticas utilizando o marcador mitocondrial *Cytb* no presente estudo, seis das 19 amostras de *Thaptomys* da localidade de Minduri (MG), que não possuem dados cariotípicos, se relacionaram mais proximamente com os grupos externos do que com as demais amostras e não

compõem o grupo monofilético recuperado para *Thaptomys* nas análises de ML e IB (98/1, respectivamente). As seis amostras divergiram em 9,99%, com amostras do cariogrupo 2n=52/FN=52, 9,81% com 2n=50/FN=48 e 9,47% com 2n=48-51/FN=52. Nas redes de haplótipos, esses animais não compartilharam nenhum haplótipo com outras localidades (H16 e H17) e são os mais divergentes, diferindo de H13 em 15 passos mutacionais (Figura 6). As demais 13 amostras se posicionaram no “Clado Norte” relacionadas com amostras com 2n=48/FN=52 (Luminárias/MG) e 2n=50/FN=48 (Una/BA) e divergência genética de 1,21% e 2,25%, respectivamente.

Nos eletroferogramas das seis sequências dessas amostras foram observados picos duplos em diversas posições, sem a presença de códons de parada, além de apresentar 9% de diferença entre as sequências depositadas no *GenBank* (Figura 2.12). Além disso, nos dados de microssatélite os mesmos seis indivíduos compuseram a mesma população (Minduri-MG), junto com as demais amostras dessa localidade (Figura 2.12). Todas essas evidências reforçam a presença de pseudogenes nesses espécimes.

Na tentativa de reduzir possíveis problemas com *Numts*, pode-se adotar algumas estratégias, como a amplificação de material fresco, o uso de primers específicos, a análise cuidadosa dos eletroferogramas e a comparação com outras sequências (Leite 2012). Portanto, os *Numts*, se ignorados, principalmente em trabalhos de taxonomia com a utilização de inferências filogenéticas, podem causar interpretações e conclusões errôneas, como a identificação e descrição de táxons novos.



Figura 2.12. Eletroferograma da sequência do gene mitocondrial Citocromo B de um espécime de Minduri (MG), como evidência da amplificação de *Numts*. Em destaque (contorno preto), posições com picos duplos e ambiguidade na composição das bases nitrogenadas. Abaixo, a ferramenta *Blast* utilizada para verificar a similaridade entre as sequências mitocondriais geradas e as presentes no *GenBank*.

4.2. Uma interpretação integrativa em *Thaptomys*

4.2.1. $2n=50/FN=48$: uma espécie nova?

Desde 2004, quando foi descrito pela primeira vez para espécimes de Una, na Bahia, o cariótipo $2n=50/FN=48$ foi apontado como um táxon novo para o gênero. Essa interpretação foi possível graças à identificação de rearranjos cromossômicos do tipo fusão em *tandem* e inversão pericêntrica que, segundo os autores, atuariam como barreira pré-zigótica em um possível cruzamento com espécimes de $2n=52/FN=52$ (Ventura et al. 2004). Corroborando esses dados, as filogenias moleculares obtidas por Ventura et al. (2010), recuperaram cada cariótipo, $2n=50/FN=48$ e $2n=52/FN=52$, como grupos reciprocamente monofiléticos e com divergência genética entre eles variando de 1,9% a 3,5%. Assim, os dados filogenéticos reforçaram a proposta de que o $2n=50/FN=48$ seria um táxon distinto, ainda não descrito.

Os dados morfológicos e morfométricos apresentados por Moreira e Oliveira (2011) sugerem uma “discriminação morfométrica muito sutil” a partir de diferenças craniodentais entre espécimes do “Grupo Norte”, com representantes de Una ($2n=50/FN=48$), Almada, Pirataquissé e Buerarema, na Bahia (sem cariótipo), e Biritiba-Mirim e Iguape de São Paulo ($2n=52/FN=52$), e do “Grupo Sul”, abrangendo espécimes de Santa Teresa (ES) até Torres (RS), com $2n=52/FN=52$. Além disso, essa distinção sutil se acentua quando as amostras dos extremos da distribuição geográfica do gênero foram comparadas entre si (Bahia, com $2n=50/FN=48$; e Telêmaco Borba, Paraná, com $2n=52/FN=52$), desconsiderando as demais amostras de outras localidades.

Apesar da detecção dessa diferença sutil e congruente entre espécimes com $2n=50/FN=48$ e $2n=52/FN=52$, os próprios autores apontaram que, em uma escala geográfica mais ampla, o padrão de diferenciação morfológica entre populações se assemelha ao modelo de isolamento por distância. Portanto, a divergência morfométrica sutil de espécimes da Bahia em relação às amostras do sul e do sudeste brasileiro não poderia ser interpretada como resultado de uma descontinuidade morfológica, mas sim como um artefato de amostragem geográfica desigual de *Thaptomys* (Moreira e Oliveira 2011), devido ao *gap* amostral de 540 km entre Santa Teresa (ES; registro mais ao norte) e Una (Bahia).

Diante dessas evidências citogenéticas, moleculares e morfológicas, espécimes com $2n=50/FN=48$ poderiam representar um táxon distinto e críptico a $2n=52/FN=52$, situação observada na literatura para vários grupos de Sigmodontinae (*Oecomys*, Suárez-Villota et al. 2017; *Calomys*, González-Ittig et al. 2014 e *Akodon*, Ástua et al. 2015; Fagundes e Nogueira 2007).

Entretanto, os dados do presente estudo apontam para uma interpretação bem mais complexa, em que são apresentados novos dados, tanto citogenéticos, quanto moleculares, de uma amostragem ampla e representativa da distribuição geográfica de *Thaptomys*.

Colombi (2018) traz novas interpretações quanto à evolução cariotípica de *Thaptomys* (Capítulo 1) e mostra que os rearranjos cromossômicos responsáveis pela distinção de $2n=50/FN=48$ e $2n=52/FN=52$ são mais complexos do que os apresentados previamente por Ventura et al. (2004). Na verdade, os rearranjos que ocorrem são uma fissão cêntrica desigual do par 25, um metacêntrico pequeno, seguida de fusão em *tandem* com outros dois pares cromossômicos, 2 e 23 ($2+25$ e $23+25$), mais complexos do que a fusão em *tandem* dos pares 2 e 24 e a inversão pericêntrica do par 25, como sugeridos previamente.

Os rearranjos detectados após a reinterpretação dos dados são reportados em vários grupos de mamíferos (Dobigny et al. 2015). Entretanto, fissões são raramente identificadas como um polimorfismo, isto é, uma variação intraespecífica (Perry et al., 2004), assim como fusões em *tandem* são consideradas rearranjos altamente deletérios quando em estado heterozigótico (nunca sendo detectada nessa condição; Dobigny et al. 2015), exibindo pelo menos uma diminuição de 50% na produção de gametas equilibrados (White, 1973; King, 1993).

Mesmo que em *Thaptomys* as fusões em *tandem* no cariótipo com $2n=50/FN=48$ não sejam heterozigóticas, o que implicaria em problemas gaméticos, essa observação é interessante, pois a falta de relatos de estados polimórficos intermediários entre $2n=50$ e $2n=52$, sugere que o $2n=50/FN=48$ se fixou rapidamente na população, ao passo que, ao contrário, poderia ser perdido extremamente rápido, possivelmente dentro de poucas gerações (Elder e Hsu, 1988). Além disso, se a condição do cariótipo com $2n=50/FN=48$ fosse transitória e não estivesse fixada na população, é razoável pensar que não seria a única constituição cariotípica observada naquela região ou que *Thaptomys* estaria extinto localmente.

De fato, a distribuição geográfica dos diferentes cariótipos de *Thaptomys* mostra que eles nunca foram detectados em simpatria. Esse fato pode refletir apenas um problema amostral. Por outro lado, os diferentes cariótipos parecem estar isolados geograficamente e as populações não estão próximas umas das outras, já que Una (BA; $2n=50/FN=48$) dista em 938 km de Luminárias (MG; $2n=48-51/FN=52$), e 540km de $2n=52/FN=52$ (ES; Santa Teresa). Além disso, não há evidências de híbridos entre nenhum dos cariogrupos. Nesse caso, é esperado que não esteja ocorrendo fluxo gênico entre as diferentes carioformas observadas em *Thaptomys*, pois a fixação de um rearranjo cromossômico com alta frequência em uma população acarretaria na separação dessa população em dois subgrupos não intercruzantes (com e sem o rearranjo cromossômico), representando uma barreira ao fluxo gênico (Rieseberg 2001). O modelo de especiação cromossômico peripátrico (Baker e Bickham 1986), assim,

leva em consideração aspectos geográficos, no qual populações fundadoras de pequeno tamanho tenderiam a representar espécies distintas, sendo o cromossomo o fator desencadeador do processo de especiação.

As filogenias moleculares apresentadas aqui foram discordantes daquelas recuperadas por Ventura et al. (2010), uma vez que nenhum dos cariótipos foi recuperado como grupo monofilético em todas as análises, com exceção dos espécimes com $2n=50/FN=48$, que formaram dois grupos monofiléticos não recíprocos (Figura 2.3). Além disso, foi o único cariótipo que não compartilhou haplótipos com nenhum outro cariótipo ou quaisquer localidades (Figuras 2.4 e 2.5).

Uma análise comparativa dos dados de Ventura *et al.* (2010) e do presente estudo mostra que no primeiro foram utilizadas 18 sequências (1077 pb) do gene *Cytb*, de quatro estados, sete localidades (Una-BA; Santa Teresa e Domingos Martins-ES, Biritiba Mirim, São Bernardo do Campo, Pilar do Sul e Iguape-SP; e Ortigueira-PR) que apresentaram baixos valores de *bootstrap* para os clados recuperados (96-89% para MP e 61-52% para ML). Por outro lado, no presente estudo, utilizou-se 201 espécimes de 26 localidades e com o clado norte com suporte elevado (58 para ML e 1 para IB). Assim, atribuímos a formação dos clados descrito por Ventura *et al.* (2010) como decorrência de uma amostra reduzida e descontínua, com pequena abrangência geográfica se comparada à distribuição geográfica conhecida para o gênero, o que provavelmente levou à formação desses agrupamentos (por cariótipo e subgrupos geográficos). Essa mesma observação é feita por Moreira e Oliveira (2011) comparativamente aos dados morfológicos.

Um aspecto importante levantado por Moreira e Oliveira (2011) é a falta de registros desse gênero acima de Santa Teresa (ES), sendo observado novamente em Una (BA), deixando um *gap* de 500km. Roedores do gênero *Thaptomys* possuem hábito semifossorial, área de vida reduzida de até 100m, e são característicos de ambientes com elevada altitude (Teta et al. 2015). A região norte do Espírito Santo, acima do Rio Doce, até o sul da Bahia, é composta por Florestas de Tabuleiro (Costa e Leite 2012), regiões de baixa altitude, altamente impactadas por monoculturas extensivas e pastos, quase não restando remanescentes florestais, com exceção da Reserva Biológica de Sooretama (Sooretama) e do Córrego do Veado (Pinheiros). Costa e Leite (2012) apontam para a necessidade de se realizar inventários biológicos intensivos nessa região, tendo em vista o seu potencial para ajudar a elucidar os padrões de diversificação animal na Mata Atlântica. Nesse intuito, foram realizados três anos de coleta nessa região, porém, nunca foram registradas capturas de *Thaptomys*. Uma exceção a esse padrão, são as amostras coletadas em Una (BA), onde foram capturados ao nível do mar. Portanto, aspectos ambientais e intrínsecos à biologia desses roedores podem influenciar na ocorrência e na distribuição geográfica do gênero.

A fixação dos rearranjos cromossômicos observados em $2n=50/FN=48$ pode ser favorecida por uma estrutura de metapopulação, onde as subpopulações não se encontram ligadas entre si (corroborando com o fato de que os diferentes cariótipos nunca foram detectados em simpatria), apesar de terem uma história evolutiva em comum, onde as extinções locais podem facilitar eventos fundadores durante os processos de recolonização (Michalakis e Olivieri, 1993). As estruturas geográficas nas análises populacionais, tanto para o gene mitocondrial, quanto para os microssatélites, apontam Una ($2n=50/FN=48$) como uma população distinta das demais.

A falta de resolução filogenética em recuperar esses espécimes como monofiléticos somada à distinção morfológica sutil, mas não significativa, pode estar associado a um processo de especiação abrupto e recente, deflagrado pelos rearranjos cromossômicos complexos em que as linhagens não tiveram tempo de acumular diferenças, não sendo descartada a possibilidade de estar associado aos marcadores moleculares utilizados.

Um cenário semelhante foi observado na descrição de uma espécie nova de *Phyllomys*, em que os autores apontam para o papel da reestruturação cromossômica na especiação, diante das semelhanças genéticas e morfológicas entre *P. sulinus* e *P. dasythrix*, que contrastam com as características cariotípicas (Leite et al, 2008).

Assim, diante das evidências de que as amostras de Una, com $2n=50/FN=48$, são identificadas como populações distintas das demais, portadoras de rearranjos cromossômicos complexos, altamente deletérios em um cruzamento experimental hipotético com qualquer um dos outros cariótipos, e aparentemente isoladas geograficamente, acreditamos que trata-se de um táxon distinto de *T. nigrita*, ainda não descrito.

Essa proposição não é inédita na literatura para *Thaptomys*, uma vez que já foram classificadas duas espécies no gênero, *T. nigrita* e *T. subterraneus* (Gyldenstolpe, 1932). Entretanto, apesar de monotípico, é intrigante, a partir das evidências apresentadas aqui, assumir que ocorra apenas uma espécie no gênero, diante da área geográfica extensa em que é observado, em um bioma tão complexo quanto a Mata Atlântica.

Recuperando os nomes que estariam disponíveis para a denominação de uma espécie nova, levantou-se algumas formas nominais que foram historicamente incluídas em *Thaptomys*: (I) *Mus orycter* (localidade tipo em Lagoa Santa/MG), (II) *Mus nigrita* (Rio de Janeiro/RJ), (III) *Hesperomys fuliginosus* (Ipanema/SP), (IV) *Hesperomys subterraneus* (Taquara/RS). Entretanto, aparentemente, nenhuma dessas sinônimas se refere e inclui espécimes de Una/BA, sendo necessária a designação de um nome novo para esses espécimes.

4.2.2. O curioso caso de $2n=52/FN=52$

Na revisão mais recente de Mamíferos da América do Sul, Teta et al. (2015) se referem ao gênero *Thaptomys* como monotípico, com a sugestão de duas subespécies: *T. nigrita nigrita* e *T. nigrita subterraneus*, sem indicar as regiões geográficas que cada um compreenderia. Essa proposta, segundo os autores, já havia sido sugerida por Cabrera (1961) e Massoia (1963).

Os dados apresentados no presente trabalho dão suporte para a identificação dessas duas subespécies em *Thaptomys nigrita*. A filogenia molecular utilizando dados do gene mitocondrial *Cytb* recupera um grupo monofilético, identificado como “Clado Norte”, de abrangência geográfica ampla, de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP), sem estruturação geográfica interna, tanto nas análises filogenéticas, quanto nas redes de haplótipos. As demais amostras, nomeadas artificialmente como “Grupo Sul”, formaram uma politomia, com amostras de Tapiraí (SP) até San Raphael (Paraguai). Esses mesmos agrupamentos, com composição de localidades semelhantes, foram recuperados na Análise de Componente Principal (Figura 2.8) a partir dos dados de microsatélite. Além disso, a estruturação geográfica obtida pela análise no STRUCTURE, mostra que esses agrupamentos são distintos para os marcadores utilizados.

Uma observação interessante é que, nas análises filogenéticas utilizando o gene mitocondrial, as amostras de Tapiraí não foram exclusivas do clado Santa Teresa-Tapiraí, permanecendo algumas delas no “Grupo Sul”, com amostras de Tapiraí (SP) até San Raphael (Paraguai). O município de Tapiraí está localizado nos contrafortes da Serra do Mar e seu relevo é montanhoso com declives e vales em “V”, dividindo a Serra do Mar em duas grandes porções. Aparentemente, as formações dos vales ou processos geológicos mais recentes (neotectonismo; Menezes et al. 2017) podem ter tido alguma influência no processo de diversificação de *Thaptomys* que reflete na estruturação geográfica observada atualmente, inclusive para outros grupos de animais na mesma região (Pellegrino et al. 2005; Rezende et al. 2010, Ventura et al. 2012b, Carnaval et al. 2009) e plantas (Cazé et al. 2016).

Nesse mesmo enfoque, os dados morfométricos falharam em recuperar uma estruturação geográfica em *Thaptomys*, sugerindo baixos níveis de regionalização e a falta de uma estruturação geográfica clara da diversidade morfológica em *Thaptomys* (Moreira e Oliveira 2011).

Gomes (2008), a partir de inferências filogenéticas de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e análises populacionais, também utilizando 833pb do *Cytb*, propõe que espécimes de *Thaptomys* com $2n=52/FN=52$ constituam três grupos diferentes, denominando (I) *T. nigrita* para espécimes do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro; (II) *Thaptomys* sp2, para amostras do leste e centro de São Paulo e para uma pequena porção do sul de Minas Gerais; e (III) *Thaptomys subterraneus*

para espécimes do sul de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Misiones (Argentina). Nesse trabalho, a autora utilizou 74 indivíduos de 16 localidades (que foram incorporadas às análises do presente trabalho) e obtém baixos valores de *bootstrap* para os grupos propostos.

Nesse contexto, diante dos agrupamentos obtidos nas análises filogenéticas e da organização geográfica recuperada nas análises populacionais, tanto para o marcador mitocondrial, quanto para os microsatélites, *T. nigrita* está representado por duas subespécies: (I) *T. n. nigrita*, com $2n=52/FN=52$, com espécimes de Santa Teresa (ES) a Tapiraí (SP), recebendo essa denominação por incluir o Rio de Janeiro, localidade-tipo de *Mus nigrita* Lichtenstein 1829; e (II) *T. n. subterraneus*, por abranger Taquara (RS), localidade-tipo de *Hesperomys subterraneus*, também com $2n=52/FN=52$, abrangendo espécimes de Pilar do Sul (SP), a San Raphael, no Paraguai.

Teta et al. (2015) ainda destacam a necessidade de se analisar o material original referido por Lund como *Mus orycter*, uma vez que essa espécie foi sinonimizada com *Thaptomys nigrita* (Avila-Pires 1960b). O holótipo de *Mus orycter* é um fragmento de crânio grande que está depositado no Museu de História Natural da Dinamarca (ZMK 1/1845: 13239, figuras em http://www.zmuc.dk/VerWeb/lund/lund_mammals.html), ilustrado por Winge (1887) (pl. II, figura. 8) e por Hansen (2012:56-57). A localidade de tipo *M. orycter* é "Lapa da Serra das Abelhas", no município de Lagoa Santa, em Minas Gerais, onde esse fóssil foi coletado (Winge 1887: 27; Hansen 2012: 56). As análises morfológicas do holótipo, segundo esses trabalhos, estão de acordo com *Thaptomys*. No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar se *M. orycter* representa uma espécie distinta (extinta?) de *Thaptomys* ou se é um sinônimo de *T. nigrita*.

4.2.3 A surpreendente diversidade cariotípica em Luminárias ($2n=48-51/FN=52$)

Historicamente, *Thaptomys* era caracterizado por apresentar apenas dois cariótipos, um com $2n=50/FN=48$, em Una (Bahia), e outro com $2n=52/FN=52$, de Santa Teresa (Espírito Santo) até Maquiné (Rio Grande do Sul).

Colombi (2018; Capítulo 1), ao realizar uma campanha em Luminárias (Minas Gerais), coletou oito espécimes de *Thaptomys* e, ao cariotipá-los, descreveu 5 cariótipos novos, facilmente reconhecíveis pela presença de dois cromossomos grandes de dois braços, oriundos de fusões cêntricas envolvendo 4 pares acrocêntricos, 1 e 15, formando um submetacêntrico grande 1+15, e 3 e 4, originando um metacêntrico grande 3+4, tanto em heterozigose, como em homozigose, o que leva a variação observada de $2n=48, 49a, 49b, 50b$ e 51, todos com $FN=52$.

Esse tipo de rearranjo cromossômico é considerado o mais comum em mamíferos (Primates: Hamilton, Beuttner-Janush e Chu, 1977; Cetartiodactyla: Cribiu et al., 1990; Vassart et al., 1993; Kingswood et al., 1998; Rubes et al., 2007; Perissodactyla: Trifonov et al., 2008; Eulipotyphla: Qumsiyeh et al., 1997; Rogatcheva et al., 1998; Carnivora: Larsen et al., 1979; Wada e Imai, 1991; Rodentia: Hima et al., 2011), geralmente não está associado com problemas de fertilidade (Rodentia: Nachman e Myers, 1989; Nachman, 1992), mesmo que em heterozigose (Hima et al., 2011; Searle, 1993; Rogatcheva et al., 1998; Sans-Fuentes et al., 2010), como no caso de *Thaptomys*, e podem indicar uma zona híbrida entre populações cariotipicamente diferentes (Searle e Wojcik, 1998; Sans-Fuentes et al., 2010).

O fato desse tipo de rearranjo, mesmo em heterozigose, como no caso de *Thaptomys*, no cariótipo com $2n=51/FN=52$, não encadear nenhum problema gamético para seus portadores, é perceptível nos dados apresentados no presente trabalho. Apesar de dados meióticos não terem sido analisados, nas inferências filogenéticas os cinco cariótipos novos não foram recuperados como grupos monofiléticos, apresentaram baixa divergência genética quando comparado ao $2n=52/FN=52$ (0,84% a 0,93%) e compartilharam haplótipos com esse mesmo cariótipo, o que sugere que esteja ocorrendo fluxo gênico e que não formam uma linhagem distinta de $2n=52/FN=52$.

Além disso, com o intuito de verificar como as amostras de Luminárias ($2n=48-51/FN=52$) se comportariam nas análises morfométricas, as mesmas medidas cranianas mensuradas por Moreira e Oliveira (2011) também foram obtidas para esses espécimes e incorporadas aos dados. Os indivíduos de Luminárias se agruparam com amostras de Santa Teresa e Ibitirama/ES, com $2n=52/FN=52$, revelando que a estrutura observada parece não ser influenciada pelo cariótipo (J. Moreira, comunicação pessoal).

Assim, diante dos rearranjos cromossômicos envolvidos (fusões cêtricas), de não formarem um grupo monofilético distinto nas análises filogenéticas, da baixa divergência genética e da falta de diferenciação morfométrica, quando analisados em conjunto, não fornecem suporte para considerar $2n=48-51/FN=52$ como um táxon distinto de *T. nigrita*. Dessa maneira, os cinco cariótipos novos encontrados em Luminárias são considerados um polimorfismo em *Thaptomys*.

Teta et al. (2015) destaca a necessidade de investigar se *Mus orycter* representa uma espécie distinta de *Thaptomys* ou se é um sinônimo de *T. nigrita*. Na tentativa de averiguar se $2n=48-51/FN=52$ e *M. orycter* estariam relacionados, observou-se que Luminárias e Lagoa Santa (localidade tipo de *M. orycter*) distam em 243 km e não existem outras informações, quanto ao cariótipo de *M. orycter*, por exemplo. Assim, não foi possível determinar se *M. orycter* e o $2n=48-51/FN=52$ estão relacionados.

Por outro lado, as análises populacionais levantam uma questão interessante. Apesar da SAMOVA (dados mitocondriais) mostrar que Luminárias pertence à mesma população que outras

localidades de Minas Gerais e São Paulo (Figura 2.6), a estruturação geográfica obtida pelos microssatélites (Figura 2.9), marcadores moleculares que evoluem mais rapidamente, revela que as amostras dessa localidade são distintas das demais e parecem estar isoladas.

Os cinco cariótipos de Luminárias, considerando a ausência de coletas em localidades próximas e adjacentes, sugere que são exclusivos de uma localidade situada ao extremo oeste da distribuição geográfica de *Thaptomys* (localidade 8; Figura 2.1), com altitude variando de 800m a 1300m.

Ao plotar em um mapa as localidades das amostras utilizadas no presente estudo, foi possível observar que Luminárias, curiosamente, está delimitada pelos rios Pardo e Moji Guaçu. O rio Moji Guaçu nasce na cidade de Bom Repouso, no sul de Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira (MG) a 1.650 m de altitude com o nome de Ribeirão do Corisco, e suas águas percorrem a região central e nordeste do estado de São Paulo, até desaguar a 470 m de altitude no Rio Pardo, na divisa dos municípios de Pontal, Pitangueiras e Morro Agudo. Sendo *Thaptomys* um roedor semifossorial e com área de vida menor que 100m (Davis, 1947), esses rios podem estar isolando esses indivíduos com $2n=48-51/FN=52$ nessa região.

O fato dos indivíduos de Luminárias serem recuperados como uma população distinta, isolada geograficamente, podendo ser identificada pelo cariótipo, com $2n=48-51/FN=52$, e, a partir das análises integrativas no presente estudo, ser uma variação geográfica (polimorfismo), pode-se sugerir que essa população represente uma subespécie em *Thaptomys*, com a necessidade de ser formalmente descrita.

A existência de subespécies no gênero já foi observada ao longo de sua história taxonômica e mais uma vez sugerida recentemente (Teta et al. 2015). Mayr (1963) definiu subespécie como "um conjunto de populações locais de uma espécie, habitando uma subdivisão geográfica dentro da distribuição geográfica da espécie e diferindo taxonomicamente de outras populações dessa espécie". Entretanto, mais recentemente, Patton e Cornoy (2017) apontam sobre a utilização errônea do conceito de subespécie, definindo-a como "redes genealógicas de populações, muitas vezes sem estrutura cladística". A ausência de estruturação cladística seria um reflexo das relações dentro das espécies, pois permanecem conduzidas por compatibilidades reprodutivas que promovem o fluxo gênico, que só podem ser interrompidas pela população (variância no tamanho efetivo da população, filopatria, acasalamento seletivo, dispersão sexual) ou processos ecológicos (vales de densidade baseados em habitat, barreiras vicariantas). As espécies, por outro lado, seriam unidades hierárquicas com uma história de ramificação dicotômica (Patton e Cornoy, 2017).

A taxonomia integrativa considera os múltiplos tipos de evidências dos critérios operacionais como independentes na tentativa de atribuir o estado de uma espécie a um determinado conjunto de

dados (Lecocq et al. 2014; Fisher e Smith, 2008). Essas evidências podem revelar padrões complexos, como os observados em *Thaptomys*.

Portanto, seguindo a sugestão de Patton e Cornoy (2017) de que uma subespécie é considerada “uma unidade que apresenta forte concordância entre conjuntos de caracteres estruturados geograficamente”, a proposta aplicada, aqui, é para ajudar na compreensão da variação geográfica em populações alopátricas, que apresentam concordância entre alguns dos critérios operacionais utilizados no contexto taxonômico (Hawlitschek et al., 2012). Sendo assim, espécimes de *Thaptomys* que apresentam o cariótipo com $2n=48/FN=51$ são sugeridas, aqui, como uma subespécie nova, com a necessidade de um nome novo, uma vez que os nomes disponíveis para essa categoria taxonômica já foram atribuídos os exemplares com $2n=52/FN=52$.

Thaptomys, portanto, após as propostas do presente estudo, seria representado por duas espécies, sendo (I) *Thaptomys* sp1, com $2n=50/FN=48$, exclusivo de Una, na Bahia; e (II) *Thaptomys nigrita*, apresentando polimorfismo cromossômico, com $2n=48-52/FN=52$, com três subespécies, sendo (III) *Thaptomys nigrita ssp1*, com $2n=48-51/FN=52$, exclusiva de Luminárias, em Minas Gerais, (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (subespécie nominotípica), ocorrendo de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP) e (V) *Thaptomys nigrita subterraneus*, de Pilar do Sul (SP) à San Rapheal (Paraguai).

Por fim, os dados do presente trabalho mostram que *Thaptomys* apresenta uma evolução cariotípica complexa, sem formação de grupos monofiléticos congruentes com os cariótipos, divergência genética relativamente baixa e sem diferenças morfológicas significativas. Esse conjunto de dados é interessante do ponto de vista evolutivo, pois pode-se tratar de um processo de especiação incipiente deflagrado pelos rearranjos cromossômicos.

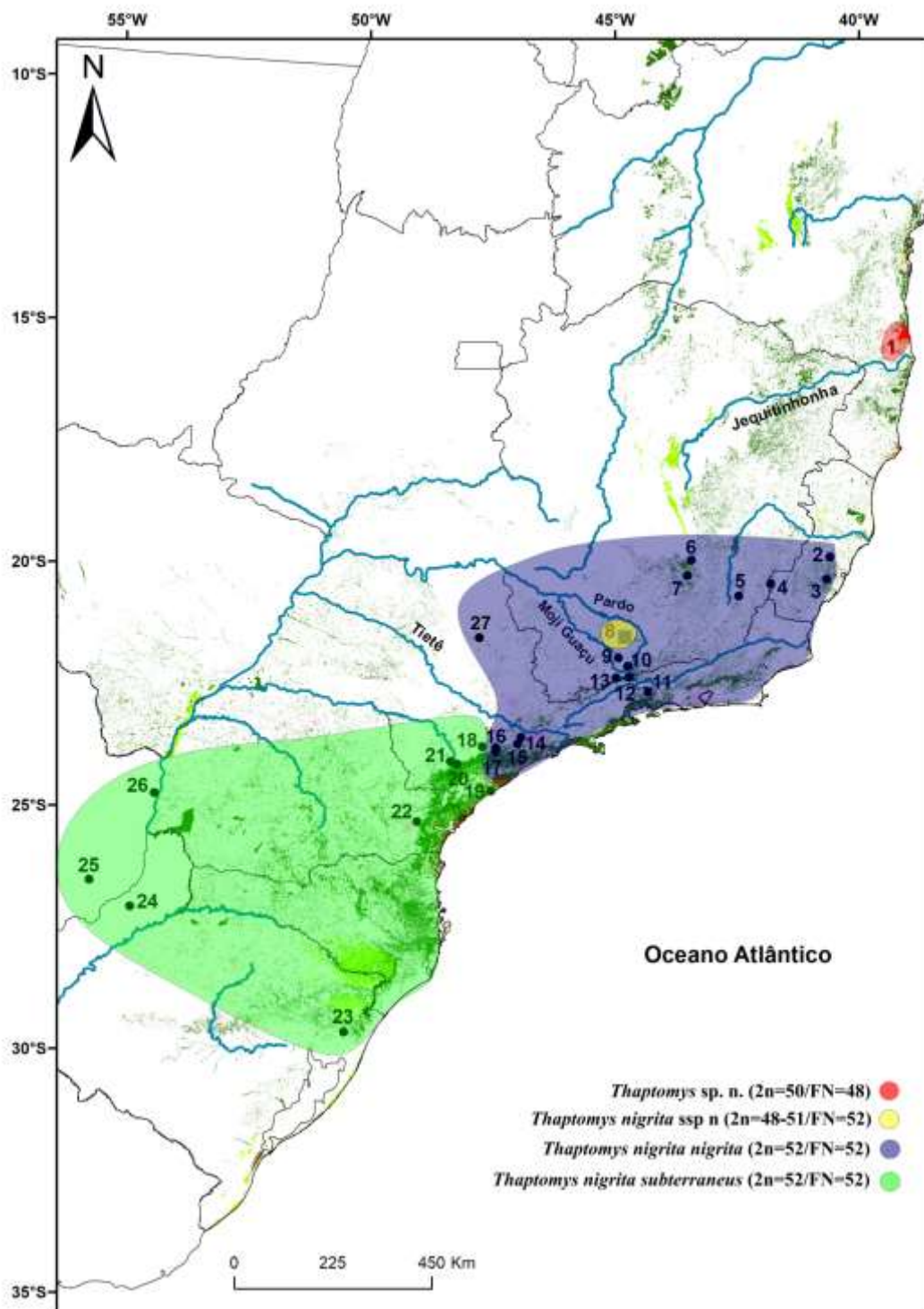


Figura 2.13. Proposta taxonômica para *Thaptomys* do presente estudo, sendo representado por duas espécies: (I) *Thaptomys* sp1, com $2n=50/FN=48$, exclusivo de Una, na Bahia (vermelho); e (II) *Thaptomys nigrita*, apresentando polimorfismo cromossômico, com $2n=48-52/FN=52$ (azul, amarelo e verde), com três subespécies, sendo (III) *Thaptomys nigrita* ssp1, com $2n=48-51/FN=52$, exclusiva de Luminárias, em Minas Gerais (amarelo), (IV) *Thaptomys nigrita nigrita* (subespécie nominotípica; em azul), ocorrendo de Santa Teresa (ES) até Tapiraí (SP) e (V) *Thaptomys nigrita subterraneus* (verde), de Pilar do Sul (SP) à San Rapheal (Paraguai).

5. REFERÊNCIAS

- Adamack AT and Gruber B (2014) PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5: 384-387. doi: 10.1111/2041-210X.12158.
- 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.
- Avila-Pires FD de (1960b) Roedores colecionados na região de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. *Arquivos do Museu Nacional* 50:25–45.
- Baker RJ and Bickham JW (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (21):8245-8.
- Bickford D, Lohman DJ, Navjot SS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK and Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*, 22:148-155.
- Bonvicino CR, Lindbergh SM and Maroja LS (2002) Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz. J. Biol.*, 62(4B): 765-774.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453-455.
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY and Burke T (1992) Single-locus and DNA fingerprinting In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach*. Oxford: IRL Press. p.225–269.
- Cabrera A (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia, Ciencias Zoológicas* 4:309–327.
- Cardoso A, Serrano A and Vogler AP (2009) Morphological and molecular variation in tiger beetles of the *Cicindela hybrida* complex: is an 'integrative taxonomy' possible? *Mol Ecol* 2009, 18:648-664.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad Célio FB, Rodrigues MT and Moritz Craig (2009) Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789
- Cazé ALR, Mädera G, Nunes TS, Queiroz LP, Oliveira G, Diniz-Filho JAF, Bonatto SL and Freitas LB (2016) Could refuge theory and rivers acting as barriers explain the genetic variability distribution in the Atlantic Forest? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 101, 242-251.
- Chakraborty R, Zhong Y, Jin L and Budowle B (1994) Nondetectability of restriction fragments and independence of DNA fragment sizes within and between loci in RFLP typing of DNA. *American Journal of Human Genetics* 55:391-401.

- Colombi VH (2013) *Thaptomys* Thomas (1916) (Rodentia, Cricetidae): um gênero monotípico? Uma abordagem citogenética e molecular. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- Costa LP and Leite YLR (2012) Historical fragmentation shaping vertebrate diversification in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. Pp. 283-306. Em: *Bones, Clones, and Biomes* (BD Patterson e LP Costa eds.). The University of Chicago Press, Chicago e Londres.
- Cribiu EP, Asmondé JF, Durand V, Greth A and Anarariyah S (1990) Robertsonian chromosome polymorphism in the Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Cytogenetics and Cell Genetics* 54, 161–163.
- D'Elia G, EM González and UFJ Pardiñas (2003) Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology* 68:351–364.
- Davis DE (1947) Notes on the life histories of some Brazilian mammals. *Boletim de Museu Nacional*, novo ser., Zoology 76:1 Darwin, C. 8.
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85: 407–415.
- de la Sancha NU, López-González C, D'Elia G, Myers P, Valdez L and Ortiz ML (2017) An annotated checklist of the mammals of Paraguay. *Therya* 8 (3): 241-260.
- D'errico I, Gadaleta G and Saccone C (2004) Pseudogenes in metazoa: Origin and features. *Brief. Funct. Gen. Prot.* 3:157-167.PMid:15355597. 4.
- DeSalle R, Egan MG and Siddal M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil Trans R Soc B*, 360:1905-1916.
- Di-Nizo CB, Neves CL, Vilela JF and Silva MJJ (2014) New karyological data and cytotaxonomic considerations on small mammals from Santa Virgínia (Parque Estadual da Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil). *Comp Cytogenet.* 8(1): 11–30.
- Dobigny G, Britton-Davidian J and Robinson TJ (2015) Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. *Biological Reviews* 1-21.
- Dormann CF, J Elith, S Bacher, C Buchmann, G Carl, G Carré, JR García Marquéz, B Gruber, B Lafourcade, PJ Leitão, T Münkemüller, C McClean, PE Osborne, B Reineking, B Schröder, AK Skidmore, D Zurell and S Lautenbach. Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography* 35(1):27-46.
- Dupanloup I, Schneider S and Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11: 2571-2581.
- Earl, DA and von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

- Elder FFB and Hsu TC (1988) Tandem fusion in the evolution of Mammalian chromosomes. In *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements* (ed. A. A. Sandberg), pp. 481–506. Alan R. Liss, New York.
- Excofer L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131, 479–491.
- Fagundes V (1993) Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V (1997) Contribuição da Citogenética Molecular no entendimento da evolução cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Fagundes V and Nogueira CDA (2007) The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents in the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini). *Genetics and Molecular Biology* 30:698–701.
- Faria R and Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology & Evolution* 25 (11): 660-669.
- Fisher BL and Smith MA (2008) A revision of Malagasy Species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *Plos One* 3(5):e1787.
- Frézal L and Leblois R (2009) Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 8:727-736. PMID:18573351.
- Funk DJ and Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 34:397-423.
- Gatto-Almeida F, Pontes JS, Sbalqueiro IJ, Hass I, Tiepolo LM and Quadros J (2016) Diversidade, biogeografia, caracterização cariotípica e tricológica dos pequenos mamíferos não voadores do Parque Estadual Rio da Onça, Litoral Sul do Paraná. *Papéis Avulsos de Zoologia* 56(7):69-96.
- Geise L, LG Pereira, DEP Bossi and HG Bergallo (2004) Pattern of elevational distribution and richness of nonvolant mammals in Itatiaia National Park and surroundings, in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 64:92–101.
- Gewin V (2002) All living things, online. *Nature* 418: 362–363.
- Godfray HCJ (2002) Challenges for taxonomy. *Nature* 417:17–19.
- Gomes JAS (2008) “Sistemática molecular de *Thaptomys* Thomas, 1916 (Rodentia, Cricetidae)” (master’s thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil).

- González-Ittig RE, Kandel N, Levis S, Calderón G, Salazar-Bravo J and Gardenal CN. <https://doi.org/10.1139/cjz-2014-0133>.
- Gruber B and Adamack A (2017) A Simple Framework to Analyse Population and Landscape Genetic Data. February 1,. Version 3.0.0.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W and Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3):307-21.
- Gylsdenstolpe N (1932) A manual of neotropical sigmodont rodents. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 11(3):1-164.
- Hamilton AE, Beuttner-Janush J and Chu EH (1977) Chromosomes of lemuriformes: II. Chromosome polymorphism in *Lemur fulvus collaris* (E. Geoffroy 1812). *American Journal of Physical Anthropology* 46, 395–406.
- Hansen KL (2012) E Museo Lundii: Addendum. 1st edition. Copenhagen: Statens Naturhistoriske Museum, 104 pp.
- Harrison RG (1998) Linking evolutionary pattern and process. The relevance of species concepts for the study of speciation. In *Endless Forms. Species and Speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, Eds.), pp. 19–31. Oxford University Press, New York.
- Lee MSY (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.* 16:179–88.
- Hass I, Müller S, Artoni RF and Sbalqueiro IJ (2011) Comparative Chromosome Maps of Neotropical Rodents *Necomys lasiurus* and *Thaptomys nigrita* (Cricetidae) Established by ZOO-FISH. *Cytogenet Genome Res* 135:42–50.
- Hawiltschek O, Nagy ZT and Glaw F (2012) Island evolution and systematic revision of comoran snakes: why and when subspecies still make sense. *PLoS ONE* 7, e42970.
- Hazkani-Covo E, Zeller RM and Martin W (2010) Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLoS Genet* 6(2): e1000834. doi:10.1371/journal.pgen.1000834
- Hershkovitz P (1990) Mice of the *Akodon boliviensis* group size class (Sigmodontinae, Cricetidae), with the description of two new species from Brazil. *Fieldiana Zoology, New Series* 57:1-35.
- Hershkovitz P (1998) Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoolische Beiträge* 47:193-256.
- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK and Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 18:597–603.

- Hijmans RJ, SE Cameron, JL Parra, PG Jones and A Jarvis (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965-1978.
- Hima K, Thiam M, Catalan J, Gauthier P, Duplantier JM, Piry S, Sembène M, Britton-Davidian J, Granjon L and Dobigny G (2011) Extensive Robertsonian polymorphism in the African rodent *Gerbillus nigeriae*: geographic and meiotic data. *Journal of Zoology* 284, 276–285.
- Holleley CE and Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a crossplatform computer program that plans and optimizes multiplex PCR *BioTechniques*, Vol 46, No 7, pp 511-517.
- Kearse et al (2012) Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data April. *Bioinformatics* 28(12):1647-9.
- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Changes*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kingswood SC, Kumamoto AT, Charter SJ, Aman RA and Ryder OA (1998) Centric fusion polymorphisms in waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*). *Journal of Heredity* 89, 96–100.
- Larsen RE, Dias E, Flores G and Selden JR (1979) Breeding studies reveal segregation of a canine Robertsonian translocation along Mendelian proportions. *Cytogenetics and Cell Genetics* 24, 95–101.
- Lecocq T, Brasero N, De Meulemeester T, Michez D, Dellicour S, Lhomme P, Jonghe R de, Valterová I, Urbanová K and Rasmont P (2015) An integrative taxonomic approach to assess the status of Corsican bumblebees: implications for conservation. *Animal Conservation* 18: 236–248.
- Leigh JW and Bryant D (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*, 6: 1110–1116. doi:10.1111/2041-210X.12410.
- Leite LAR (2012) Pseudogenes mitocondriais no DNA barcoding em insetos: diferentes pontos de vista sobre a mesma questão. *Biota Neotrop.* 12:3 <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n3/pt/abstract?thematic-review+bn02412032012>.
- Leite YLR, Christoff AU and Fagundes V (2008) A new species of Atlantic Forest tree rat, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 89(4):845–851.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Löwenberg-Neto P (2014) Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalization. *Zootaxa* 3802(2):300-300.
- Malhotra A and Thorpe RS (2004) Maximizing information in systematic revisions: a combined molecular and morphological analysis of a cryptic green pitviper complex (*Trimeresurus stejnegeri*). *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 219–235.

- Mallett JND and Willmott K (2003) Taxonomy: renaissance or Tower of Babel. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 57–59.
- Massoia E (1963a) Sobre la posición sistemática y distribución geográfica de *Akodon (Thaptomys) nigrita* (Rodentia, Cricetidae). *Physis* 24:73–80.
- Matschiner M and Salzburger W (2009) TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics* 25: 1982–1983.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. New York: Columbia University Press.
- Mayr E (1963) Animal Species and Evolution. The Belknap Press of Harvard University Press, Massachusetts.
- Menezes RST, Brady SG, Carvalho AF, Del Lama MA and Costa MA (2017) The roles of barriers, refugia, and chromosomal clines underlying diversification in Atlantic Forest social wasps. *Scientific Reports* 7: 7689 | DOI:10.1038/s41598-017-07776-7.
- Mengual X, Stahls G, Vujic A and Marcos-Garcia MA (2006) Integrative taxonomy of Iberian Merodon species (Diptera, Syrphidae). *Zootaxa*, 1377:1–26.
- Michalakis Y and Olivieri I (1993) The influence of local extinctions on the probability of fixation of chromosomal rearrangements. *Journal of Evolutionary Biology* 6:153–170.
- Milankov V, Stahls G, Stamenkovic J and Vujic A (2008) Genetic diversity of populations of Merodon aureus and M. cinereus species complexes (Diptera, Syrphidae): integrative taxonomy and implications for conservation priorities on the Balkan Peninsula. *Conservation Genetics*, 9:1125–1137
- Moreira JC and Oliveira JA (2011) Evaluating diversification hypotheses in the South American cricetid *Thaptomys nigrita* (Lichtenstein, 1829) (Rodentia: Sigmodontinae): an appraisal of geographical variation based on different character systems. *J Mamm Evol* 18(3):201–214.
- Moreira JC, Cunha AB, Moreira AMM, Oliveira J, Bonvicino C and Cerqueira R (2014) More isolation of polymorphic microsatellite loci in *Akodon cursor* (Cricetidae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other akodontine rodents. *Bol. Soc. Bras. Mastozool.*, 71: 33–36.
- Morrone JJ (2014) Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782(1):1–110.
- Musser GG and MD Carleton (2005) Superfamily Muroidea. In *Mammal species of the world*, 3rd ed., ed. D. E. Wilson and D. M. Reeder, 894–1,531. Baltimore, MD: The Johns Hopkins Press, 2:xx + 745–2,142.5.
- Myers P and RM Wetzel (1979) New records of mammals from Paraguay. *Journal of Mammalogy* 60:638–641.

- Nachman MW (1992b) Meiotic studies of Robertsonian polymorphisms in the South American marsh rat, *Holochilus brasiliensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 61:17-24.
- Nachman MW (1992a) Geographic patterns of chromosomal variation in South American marsh rats, *Holochilus brasiliensis* and *H. vulpinus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 61:10–16.
- O’Brien RM (2007) A caution regarding rules of thumb for variance inflation factors. *Quality & Quantity* 41:673-690.
- Pante E, Schoelinck C and Puillandre N (2015) From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *Syst. Biol.* 64(1):152–160.
- Paresque R (2001) Estudos citogenéticos em marsupiais e roedores da Mata Atlântica, município de Santa Teresa, ES. Monografia. Monografia de Graduação. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL and Fagundes V (2004) Composição cariotípica de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 5-35.
- Patton JL, Pardiñas UFJ and D’Elía G (2015) Rodents. *Mammals of South America*, Volume 2.
- Patton JL and Conroy CJ (2017) The conundrum of subspecies: morphological diversity among desert populations of the California vole (*Microtus californicus*, Cricetidae). *Journal of Mammalogy*, Volume 98, Issue 4, 1 August 2017, Pages 1010–1026. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx074>.
- Peakall R and Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pellegrino KC, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda Y.Y and Sites Jr JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 85,13–26.
- Perry J, Slater H and Choo K (2004) Centric fission: simple and complex mechanisms. *Chromosome Research* 12, 627–640.
- Pires AC and Marinoni L (2010) DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotrop.*, vol. 10, no. 2.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253-1256.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

- Qumsiyeh MB, Coate JL, Peppers JA, Kennedy PK and Kennedy ML (1997) Robertsonian chromosomal rearrangements in the short-tailed shrew *Blarina carolinensis*, in Western Tennessee. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76, 153–158.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reig OA (1987) An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Fieldiana Zoologica* 39:347-99.
- Resende HC, Yotoko SCK, Delabie JHC, Costa MA, Campiolo S, Tavares MG, Campos LAO and Fernander-Salomão TM (2010) Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 949–960.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16:351-358.
- Rogatcheva MB, Oda SI, Axenovich TI, Aulchenko YS, Searle JBS and Borodin PM (1998) Chromosomal segregation and fertility in Robertsonian chromosomal heterozygotes of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Heredity* 81, 335–341.
- Ronquist et al (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol.* May; 61(3): 539–542.
- Rosenblum BB, Oaks F, Menchen S and Johnson B (1997) Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 25: 3925-3929.
- Rubes J, Pagacova E, Kopečna O, Kubickova S, Cernohorska H, Vahala J and Di Berardino D (2007) Karyotype, centric fusion polymorphism and chromosomal aberrations in captive-born mountain reedbuck (*Redunca fulvorufula*). *Cytogenetics and Genome Research* 116, 263–268.
- Sans-Fuentes MA, Garcia-Valero J, Ventura J and Lopez-Fuster MJ (2010). Spermatogenesis in house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction* 140, 569–581.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E and Crozier RH (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring Biodiversity. *Annu Rev Entomol*, 55:421-438.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234.
- Searle JBS (1993) Chromosomal hybrid zones in Eutherian mammals. In *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (ed. R. G. Harisson), pp. 309–353. Oxford. University Press, Oxford.
- Searle JBS and Wojcik JM (1998) Chromosomal evolution: the case of *Sorex araneus*. In *Evolution of Shrews* (eds J. M. Wojcik and M. Wolsan), pp. 219–268. Polish Academy of Sciences, Białowieża.

- Sites JW Jr and Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol* 18:462–70.
- Sites JW Jr and Marshall JC (2004) Operational Criteria for Delimiting Species. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 35:199–227.
- Smith MF and Patton JL (1993) Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biol J Linn Soc Lond* 50:149–177.
- Smith MF and Patton JL (1999) Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b . *J Mamm Evol* 6:89–128.
- Smith MF and Patton JL (2007) Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. In *The Quintessential Naturalist: Honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*, ed. D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo, and J. L. Patton, 827–858. University of California Publications in Zoology 134:xii + 1–981.
- Smith MA, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Deans AR, Janzen DH, Hallwachs W and Hebert PDN (2008) Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *P. Natl.Acad. Sci. USA* 105:12359–12364.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF and Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:13468–13491. PMID:21564980.
- Souza MJ (1981) Caracterização cromossômica em oito espécies de roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Stanhope MJ, Czelusniak J, Si JS, Nickerson J and Goodman M (1992) A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1:148–160.
- Strugnell JM and Lindgren AR (2007) A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns. *Rev. Fish Biol.Fisher.* 17:337–344. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-007-9043-0>.
- Suárez P, Nagamachi CY, Lanzone C, Malleret MM, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, et al. (2015) Clues on Syntenic Relationship among Some Species of Oryzomyini and Akodontini Tribes (Rodentia: Sigmodontinae). *PLoS ONE* 10(12):e0143482. doi:10.1371/journal.pone.0143482.
- Suárez-Villota EY, Carmignotto AP, Brandão MV, Percequillo AR and Silva MJJ (2017) Systematics of the genus *Oecomys* (Sigmodontinae: Oryzomyini): molecular phylogenetic, cytogenetic and morphological approaches reveal cryptic species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, XX, 1–29.

- Teta P, Pardiñas UFJ and D'Elía G (2015) Genus *Thaptomys* Thomas, 1916. In Patton JL, Pardiñas UFJ, D'Elía G 2015 Rodents. Mammals of South America, Volume 2.
- Thomas O (1916) The grouping of the South-American Muridae commonly referred to *Akodon*. *J. Nat. Hist* 8(18):336-340.
- Trifonov VA, Stanyon R, Nesterenko AI, Fu B, Perelman PL, O'Brien PCM, Stone G, Rubtsova NV, Houck ML, Robinson TJ, Ferguson-Smith MA, Dobigny G, Graphodatsky AS and Yang F (2008) Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Research* 16, 89–107.
- Vaglia T, Haxaire J, Kitching IJ, Meusnier I and Rougerie R (2008) Morphology and DNA barcoding reveal three cryptic species within the *Xylophanes neoptolemus* and *loelia* species-groups (Lepidoptera: Sphingidae). *Zootaxa*. 1923:18-36.
- Vassart M, Greth A, Durand V and Cribiu EP (1993) Chromosomal polymorphism in sand gazelles (*Gazella subgutturosa marica*). *Journal of Heredity* 84,478–481.
- Ventura K, Silva MJJ, Pardini R and Yonenaga-Yassuda Y (2004) An undescribed karyotype for *Thaptomys* (2n=50) and the mechanism of differentiation from *Thaptomys nigrita* (2n=52) evidenced by FISH and Ag-NORs. *Caryologia* 57:89–97.
- Ventura K, de Silva MJJ and Yonenaga-Yassuda Y (2010) *Thaptomys* Thomas 1915 (Rodentia, Sigmodontinae, Akodontini) with karyotypes 2n=50, FN=48 and 2n=52, FN=52: Two monophyletic lineages recovered by molecular phylogeny. *Genet Mol Biol* 33:256–261.
- Ventura K, Sato-Kuwabara Y, Fagundes V, Geise L, Leite YLR, Costa LP, Silva MJJ et al (2012) Phylogeographic structure and karyotypic diversity of the Brazilian shrew mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest. *Cytogenetic and Genome Research* 138:31–35.
- Vera NS, Chiappero MB, Priotto JW and Gardenal CN (2011) Isolation of microsatellite loci in *Akodon azarae* (Muridae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other Akodontini species. *J. Genet.* 90, e25–e29.
- Wada MY and Imai HT (1991) On the robertsonian polymorphism found in the Japanese racoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). *Japanese Journal of Genetics* 66, 1–11.
- Wenz HM, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum, BB, Wike C, Gilbert DA and Efcavitch JW (1998) High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Research* 8: 69-80.
- Wheeler QD (2004) Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 359, 571–83.
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. Third Edition. Cambridge University, Cambridge.

- Williams ST and Knowlton N (2001) Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp Genus *Alpheus*. *Mol. Biol. Evol.* 18:1484-1493.
- Wilson EO (2003) The encyclopedia of Life. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 77–80.
- Winge H (1887) [1888]. Jordfunde og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien: med udsigt over gnavernes indbyrdes slægtskab. *E Museo Lundii*, Kjöbenhavn 1(3):1–178 + 8 pls.
- Xia X (2013) DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30(7) 1720–1728, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst064>
- Yonenaga Y (1972a) “Polimorfismo cromossômico em roedores brasileiros” (master’s thesis, Universidade de São Paulo, Brazil).
- Yonenaga Y (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia* 28:269-286.
- Zomer RJ, A Trabucco, O van Straaten and DA Bossio (2007) Carbon, Land and Water: A global analysis of the hydrologic dimensions of climate change mitigation through afforestation/reforestation. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute. 44p. (IWMI Research Report 101)

6. APÊNDICES

APÊNDICE 1

Espécimes de *Thaptomys* utilizados no presente trabalho. Em ordem: Estado brasileiro (maiúsculo, em negrito), número total de espécimes amostrados (entre parênteses, em negrito), localidade (em itálico), coordenadas geográficas (entre parênteses), número de identificação dos espécimes.

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

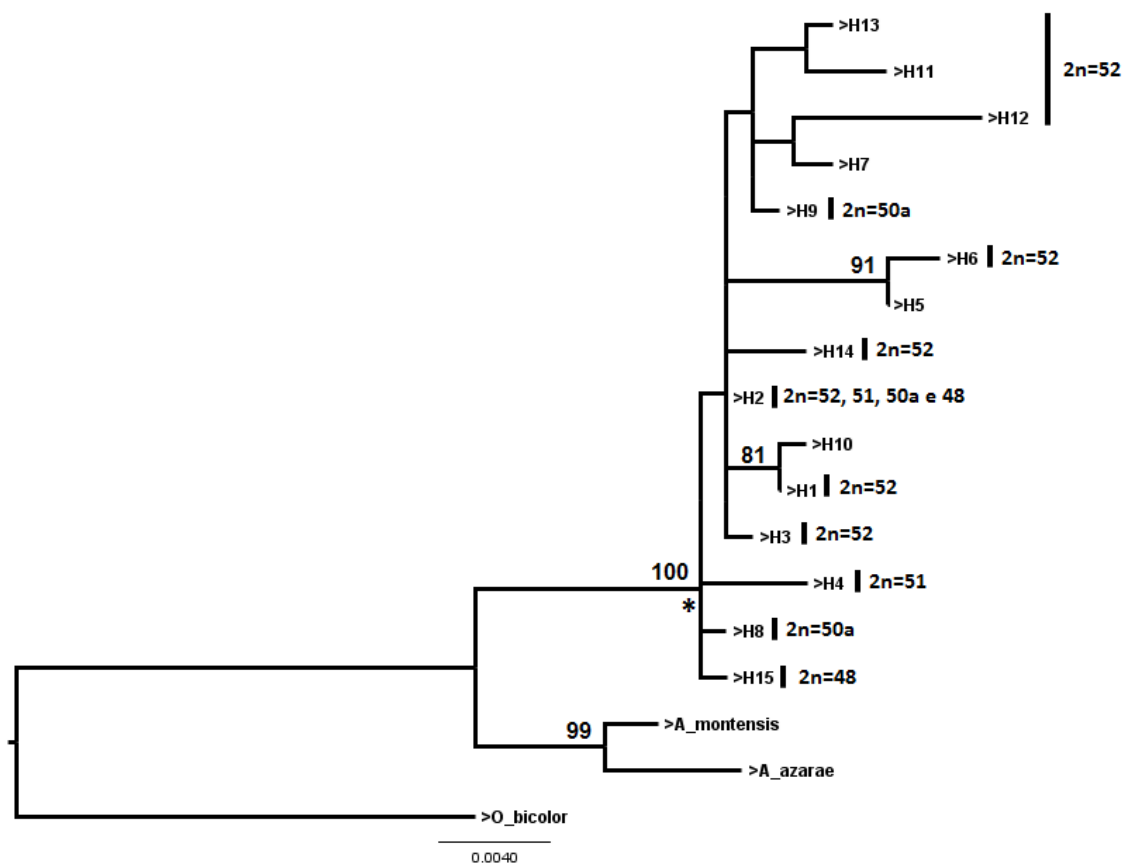
BRASIL – BAHIA: Una (15°18'S; 39°04'W): Fazenda Jueirana: UFMG 2017, UFMG 2018, UFMG 2180, UFMG 2181; Reserva Biológica de Una: UFMG 2019, CIT 0935, CIT 913; Fazenda Bolandeira: UFMG 2020; RPPN Nova Angélica: LGA 4014. **ESPÍRITO SANTO: Santa Teresa** (19°55'S, 40°36'W): Estação Biológica de Santa Lúcia: LGA 76, LGA 77, LGA 81, LGA 83, LGA 93, LGA 94, LGA 98, LGA 102, LGA 103, LGA 105, LGA 111, LGA 116, LGA 117, LGA 127, LGA 703, LGA 997, LGA 2943, MBML 2288, MBML 2337; **Domingos Martins** (20°22'S, 40°40'W): Parque Estadual Pedra Azul: LGA 958, LGA 959, LGA 974, LGA 977; **Castelo** (20°36'13"S, 41°11'05"W): Fazenda Forno Grande: MBML 2650; **Dores do Rio Preto** (20°28'S, 41°49'W): Parque Nacional do Caparaó: LGA 1376, LGA 1486, LGA 1491, LGA 1632, LGA 1635, LGA 1652. **MINAS GERAIS: Catas Altas** (-43,44, -19,98): KRTP 54; **Delfim Moreira** (22°30'S, 45°17'W): Fazenda da Onça: UFMG 1839; **Passa Quatro** (22°24'S, 44°59'W): Fazenda do Itaguaré: UFMG 1838; **Ouro Preto** (20°18'S, 43°31'W): UFMG 1851; **Fervedouro** (20°43'S, 42°28'W): Fazenda Neblina: UFMG 1841, UFMG 1843, UFMG 1847, UFMG 1848, UFMG 1849, UFMG 1850; **Monte Verde** (19°53'S, 41°57'W): EF 206815; **Luminárias** (21°34'12"S, 44°47'24"W): Fazenda Pedra do Navio: LGA 3065, LGA 3066, LGA 3067, LGA 3819, LGA 3821, LGA 3825, LGA 3827, LGA 3830, LGA 3836, MP 594, MP 607, MP 611, MP 619, MP 626, MP 627, MP 629, MP 630, MP 631, MP 632; **Itamonte** (22°09'S, 44°44'24"W): Serra do Papagaio: MP 474, MP 496, MP 508; **Minduri** (-44,933333, -21,983333): MP 95, MP 102, MP 104, MP 108, MP 111, MP115, MP118, M124, CPT 10, 40, 68, 102, 118, 197, 221, 232, 312, 356, 357, 358, 369. **RIO DE JANEIRO: Itatiaia** (22°23'S, 44°43'W): Parque Nacional de Itatiaia: MN 48074, HGB 385. **SÃO PAULO: São João da Boa Vista** (21°58'S, 46°47'W): Fazenda Santa Tereza: HGB DB 05; **Ibiúna** (23°37'S, 46°56'W): Reserva de Morro Grande: RP 66, RP 193; **Iguape** (24°43'S, 47°33'W): CIT 204, CIT 260, CIT 261, CIT 262, CIT 275, CIT 319, CIT 320, CIT 324, CIT 325, CIT 330, CIT 331, CIT 332; **Piedade** (23°49'48"S, 47°27'W): AB 276, AB 274; **Tapiraí** (23°54'36"S, 47°27'W): AB 194, AB 214, AB 185, AB 209, AB 236; **Ribeirão Grande** (22°10'48"S, 48°46'12"W): RP 155, AB 577, AB 744 (C42); **Cotia** (23°45'S, 47°W): B_302, B_712, B_789,

B_355, B_716; **Capão Bonito** (24°10'12"S, 48°14'24"W): AB 127; **Boracéia** (24°04'48"S, 48°22'12"W): AF 108666. **Bananal** (- 44,328553, -22,682428): EEB1017. Pilar do Sul: CIT 1035, CIT 1034. **PARANÁ: Piraquara** (25°21'S, 49°04'W): Mananciais da Serra: JAO 1020, JAO 1021, JAO 1024, JAO 1563, JAO 1573, JAO 1575 **Ortigueira** (24°12' S, 50°56' W): II M077, II M078, II M082. **RIO GRANDE DO SUL: Maquiné** (29°40'S, 50°34'W): AC 662, AC 666, AC 684, AC 675, AC 679, AC 680, AC 685, LGA 323.

ARGENTINA – MISIONES: Valle del Arroyo Cunã Pirú (27°05'S, 54°57'W): Reserva Privada de la UNLP: UP 735, UP 736, CG 45, CG 27, LTU 356, LTU 361, LTU 362, LTU 695, LTU 846, LTU 858, LTU 859, LTU 860, LTU 877, 879, LTU 890, LTU 905, RBO 159, RBO 258.

PARAGUAI – SAN RAPHAEL (-55,7838889, -26,5291667): FMNH 145107, TTU 145116, FMNH 145117, TTU 145138, FMNH 145147, FMNH 145148, TTU 145158, FMNH 145163, TTU 145164, FMNH 145227, FMNH 145228, FMNH 129362, TTU 129416, FMNH 129424, FMNH 129474, FMNH 129573, FMNH 129638; **LYMOY** (-54,447671, -24,7534074): TK 129625 TK 129627

APÊNDICE 2



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

APÊNDICE 3

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

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

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

APÊNDICE 4

Divergências genéticas (K2P) gene mitocondrial *Cytb* (801pb) entre espécimes das localidades amostradas no presente trabalho.

	UNA	SNT	DOM	IBT	FER	CAT	OUP	LUM	MIN	ITM	BAN	ITA	IBIU	COT	PIE	SJB	TAP	IGU	CAB	RIB	PIR	MAQ	MIS	SAR	LIM
UNA		0,0035	0,0037	0,0032	0,0034	0,0035	0,0041	0,0038	0,0031	0,0036	0,0037	0,0035	0,0040	0,0044	0,0035	0,0039	0,0038	0,0038	0,0042	0,0044	0,0041	0,0040	0,0039	0,0039	0,0039
SNT	0,0236		0,0015	0,0016	0,0014	0,0016	0,0025	0,0022	0,0027	0,0021	0,0035	0,0015	0,0021	0,0027	0,0023	0,0042	0,0025	0,0036	0,0041	0,0043	0,0038	0,0038	0,0036	0,0034	0,0036
DOM	0,0241	0,0054		0,0015	0,0014	0,0015	0,0025	0,0022	0,0028	0,0022	0,0035	0,0017	0,0022	0,0028	0,0024	0,0043	0,0025	0,0036	0,0041	0,0044	0,0039	0,0038	0,0037	0,0034	0,0037
IBT	0,0226	0,0068	0,0058		0,0014	0,0015	0,0024	0,0023	0,0023	0,0021	0,0027	0,0016	0,0021	0,0028	0,0023	0,0036	0,0025	0,0033	0,0039	0,0041	0,0037	0,0035	0,0034	0,0032	0,0034
FER	0,0235	0,0056	0,0048	0,0062		0,0014	0,0024	0,0020	0,0028	0,0019	0,0034	0,0014	0,0019	0,0024	0,0023	0,0042	0,0023	0,0035	0,0041	0,0043	0,0038	0,0037	0,0036	0,0034	0,0036
CAT	0,0227	0,0042	0,0033	0,0048	0,0036		0,0018	0,0023	0,0030	0,0022	0,0037	0,0018	0,0022	0,0029	0,0025	0,0043	0,0026	0,0036	0,0041	0,0044	0,0039	0,0038	0,0037	0,0034	0,0037
OUP	0,0256	0,0069	0,0060	0,0076	0,0061	0,0027		0,0030	0,0036	0,0029	0,0047	0,0027	0,0028	0,0033	0,0031	0,0047	0,0031	0,0041	0,0046	0,0049	0,0043	0,0040	0,0042	0,0040	0,0042
LUM	0,0259	0,0093	0,0086	0,0096	0,0079	0,0073	0,0093		0,0030	0,0019	0,0038	0,0022	0,0017	0,0014	0,0024	0,0042	0,0022	0,0037	0,0042	0,0044	0,0039	0,0039	0,0038	0,0036	0,0038
MIN	0,0225	0,0109	0,0106	0,0090	0,0103	0,0092	0,0121	0,0126		0,0026	0,0025	0,0028	0,0032	0,0036	0,0025	0,0035	0,0032	0,0040	0,0044	0,0047	0,0043	0,0042	0,0041	0,0039	0,0041
ITM	0,0244	0,0087	0,0082	0,0085	0,0074	0,0070	0,0089	0,0068	0,0104		0,0033	0,0021	0,0017	0,0016	0,0022	0,0039	0,0022	0,0036	0,0042	0,0044	0,0039	0,0038	0,0038	0,0035	0,0037
BAN	0,0208	0,0097	0,0091	0,0064	0,0092	0,0087	0,0125	0,0133	0,0075	0,0104		0,0034	0,0041	0,0047	0,0031	0,0033	0,0041	0,0051	0,0057	0,0058	0,0056	0,0055	0,0053	0,0049	0,0053
ITA	0,0237	0,0052	0,0047	0,0058	0,0042	0,0033	0,0061	0,0079	0,0099	0,0076	0,0078		0,0021	0,0026	0,0023	0,0042	0,0024	0,0036	0,0041	0,0044	0,0039	0,0038	0,0037	0,0034	0,0037
IBIU	0,0268	0,0084	0,0077	0,0091	0,0066	0,0066	0,0080	0,0065	0,0134	0,0066	0,0134	0,0069		0,0013	0,0023	0,0045	0,0022	0,0038	0,0044	0,0046	0,0041	0,0040	0,0039	0,0037	0,0039
COT	0,0284	0,0097	0,0091	0,0107	0,0078	0,0081	0,0096	0,0055	0,0149	0,0059	0,0157	0,0080	0,0046		0,0023	0,0048	0,0020	0,0042	0,0047	0,0049	0,0044	0,0043	0,0043	0,0041	0,0043
PIE	0,0247	0,0102	0,0097	0,0094	0,0090	0,0085	0,0107	0,0091	0,0102	0,0077	0,0096	0,0090	0,0090	0,0088		0,0039	0,0027	0,0037	0,0042	0,0045	0,0040	0,0039	0,0039	0,0036	0,0038
SJB	0,0251	0,0160	0,0159	0,0132	0,0157	0,0146	0,0175	0,0177	0,0126	0,0155	0,0069	0,0155	0,0186	0,0202	0,0152		0,0044	0,0051	0,0054	0,0054	0,0052	0,0052	0,0050	0,0051	
TAP	0,0280	0,0123	0,0117	0,0125	0,0109	0,0105	0,0126	0,0101	0,0161	0,0102	0,0168	0,0110	0,0098	0,0088	0,0126	0,0210		0,0028	0,0031	0,0034	0,0029	0,0031	0,0028	0,0028	0,0028
IGU	0,0260	0,0130	0,0126	0,0126	0,0125	0,0113	0,0142	0,0150	0,0158	0,0143	0,0166	0,0121	0,0147	0,0161	0,0155	0,0206	0,0116		0,0016	0,0023	0,0015	0,0018	0,0008	0,0010	0,0007
CAB	0,0278	0,0149	0,0146	0,0145	0,0146	0,0132	0,0162	0,0174	0,0179	0,0168	0,0193	0,0141	0,0172	0,0188	0,0179	0,0226	0,0127	0,0028		0,0022	0,0015	0,0026	0,0019	0,0019	0,0018
RIB	0,0317	0,0196	0,0193	0,0192	0,0191	0,0179	0,0210	0,0221	0,0226	0,0215	0,0202	0,0185	0,0215	0,0236	0,0226	0,0261	0,0171	0,0086	0,0072		0,0020	0,0029	0,0023	0,0023	0,0023
PIR	0,0281	0,0150	0,0149	0,0149	0,0148	0,0135	0,0160	0,0174	0,0182	0,0167	0,0198	0,0144	0,0171	0,0185	0,0179	0,0226	0,0129	0,0045	0,0037	0,0084		0,0022	0,0014	0,0015	0,0013
MAQ	0,0267	0,0153	0,0150	0,0150	0,0149	0,0137	0,0148	0,0173	0,0183	0,0166	0,0199	0,0145	0,0171	0,0184	0,0179	0,0231	0,0140	0,0051	0,0066	0,0112	0,0068		0,0018	0,0018	0,0017
MIS	0,0264	0,0134	0,0130	0,0131	0,0131	0,0116	0,0145	0,0160	0,0163	0,0153	0,0168	0,0125	0,0157	0,0173	0,0164	0,0212	0,0124	0,0026	0,0039	0,0085	0,0045	0,0053		0,0008	0,0004
SAR	0,0260	0,0125	0,0121	0,0122	0,0122	0,0108	0,0138	0,0151	0,0156	0,0144	0,0150	0,0114	0,0148	0,0165	0,0155	0,0203	0,0121	0,0033	0,0046	0,0090	0,0052	0,0058	0,0033		0,0007
LIM	0,0254	0,0122	0,0119	0,0119	0,0119	0,0106	0,0135	0,0148	0,0152	0,0141	0,0157	0,0114	0,0146	0,0162	0,0152	0,0200	0,0111	0,0013	0,0026	0,0072	0,0033	0,0039	0,0013	0,0020	

APÊNDICE 5

Localidades que compõem as oito populações determinadas pelo teste de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) utilizando sequências do gene mitocondrial *Cytb* (801pb).

País	População	Estados	Localidades	Identificação no mapa (cor; Figura 8)
Brasil	G1	BA	Una	Vermelho
	G2	ES	Santa Teresa, Domingo Martins, Ibitirama	Azul
		RJ	Itatiaia	
		MG	Fervedouro, Ouro Preto, Catas Altas	
		SP	Bananal	
	G3	MG	Itamonte, Luminárias, Passa Quatro	Laranja
		SP	Cotia, Ibiúna, Piedade, Tapiraí	
	G4	MG	Mindurí	Cinza
	G5	SP	Pilar do Sul	Roxo
	G6	SP	São João da Boa Vista	Preto
	G7	RS	Maquiné	Marrom
	Argentina	G8	SP	Capão Bonito, Iguape, Ribeirão Grande
PR			Piraquara	
Misiones				
San Raphael, Limoy				

APÊNDICE 6

Diversidade alélica por localidade, por *locus*, em todos os espécimes analisados no presente estudo. N=número de indivíduos; Na=número de alelos observados; Ne=número de alelos efetivos; I=índice de Shannon; Ho=heterozigosidade observada; He=heterozigosidade esperada; uHe= heterozigosidade esperada após fator de correção para o tamanho amostral; F=índice de fixação.

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
UNA	N	11	11	12	9	11	5	10	11
	Na	9	7	7	5	3	4	5	6
	Ne	7,563	4,939	5,053	3,600	1,716	3,571	4,082	3,103
	I	2,111	1,721	1,751	1,446	0,709	1,332	1,496	1,362
	Ho	0,727	0,818	0,917	0,444	0,545	0,000	0,700	0,909
	He	0,868	0,798	0,802	0,722	0,417	0,720	0,755	0,678
	uHe	0,909	0,835	0,837	0,765	0,437	0,800	0,795	0,710
	F	0,162	-0,026	-0,143	0,385	-0,307	1,000	0,073	-0,341
ST	N	23	22	22	20	21	20	22	21
	Na	11	14	14	9	5	10	10	9
	Ne	6,826	9,778	9,047	5,333	1,583	7,207	7,224	6,438
	I	2,105	2,431	2,386	1,891	0,792	2,127	2,108	2,003
	Ho	0,565	0,909	0,909	0,600	0,429	0,250	0,409	0,905
	He	0,853	0,898	0,889	0,813	0,368	0,861	0,862	0,845
	uHe	0,872	0,919	0,910	0,833	0,377	0,883	0,882	0,865
	F	0,338	-0,013	-0,022	0,262	-0,163	0,710	0,525	-0,071
DM	N	4	4	4	4	4	4	4	4
	Na	5	7	6	5	3	3	5	6
	Ne	4,000	6,400	5,333	3,200	1,684	2,462	4,571	5,333
	I	1,494	1,906	1,733	1,386	0,736	0,974	1,560	1,733
	Ho	1,000	1,000	1,000	0,750	0,500	0,500	0,250	0,500
	He	0,750	0,844	0,813	0,688	0,406	0,594	0,781	0,813
	uHe	0,857	0,964	0,929	0,786	0,464	0,679	0,893	0,929
	F	-0,333	-0,185	-0,231	-0,091	-0,231	0,158	0,680	0,385

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
IBI	N	5	5	5	2	5	5	5	5
	Na	4	7	9	4	2	4	5	5
	Ne	2,941	6,250	8,333	4,000	1,220	2,941	3,125	3,125
	I	1,221	1,887	2,164	1,386	0,325	1,221	1,359	1,359
	Ho	0,800	1,000	1,000	1,000	0,200	0,800	0,400	0,400
	He	0,660	0,840	0,880	0,750	0,180	0,660	0,680	0,680
	uHe	0,733	0,933	0,978	1,000	0,200	0,733	0,756	0,756
	F	-0,212	-0,190	-0,136	-0,333	-0,111	-0,212	0,412	0,412
RJ	N	1	1	1	1	1	0	1	1
	Na	2	2	2	2	1	0	1	2
	Ne	2,000	2,000	2,000	2,000	1,000	0,000	1,000	2,000
	I	0,693	0,693	0,693	0,693	0,000	0,000	0,000	0,693
	Ho	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
	He	0,500	0,500	0,500	0,500	0,000	0,000	0,000	0,500
	uHe	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
	F	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-	-	-	-1,000
MIN	N	13	13	13	13	12	8	10	11
	Na	8	6	7	6	4	6	4	9
	Ne	4,333	3,449	4,761	3,841	2,380	3,765	3,175	6,541
	I	1,726	1,432	1,721	1,495	1,053	1,511	1,249	2,035
	Ho	0,538	0,769	0,923	0,462	0,667	0,625	0,300	0,818
	He	0,769	0,710	0,790	0,740	0,580	0,734	0,685	0,847
	uHe	0,800	0,738	0,822	0,769	0,605	0,783	0,721	0,887
	F	0,300	-0,083	-0,169	0,376	-0,150	0,149	0,562	0,034
FER	N	5	5	5	4	5	5	5	5
	Na	7	6	6	4	2	5	2	5
	Ne	5,556	4,545	4,167	2,909	1,471	2,500	1,471	4,167
	I	1,834	1,643	1,609	1,213	0,500	1,228	0,500	1,505
	Ho	0,800	0,800	1,000	0,500	0,400	0,600	0,000	0,800
	He	0,820	0,780	0,760	0,656	0,320	0,600	0,320	0,760
	uHe	0,911	0,867	0,844	0,750	0,356	0,667	0,356	0,844
	F	0,024	-0,026	-0,316	0,238	-0,250	0,000	1,000	-0,053

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
ITA	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	Na	5	5	5	3	2	3	1	5
	Ne	4,500	4,500	4,500	2,571	1,385	3,000	1,000	4,500
	I	1,561	1,561	1,561	1,011	0,451	1,099	0,000	1,561
	Ho	0,667	1,000	1,000	0,667	0,333	0,000	0,000	1,000
	He	0,778	0,778	0,778	0,611	0,278	0,667	0,000	0,778
	uHe	0,933	0,933	0,933	0,733	0,333	0,800	0,000	0,933
	F	0,143	-0,286	-0,286	-0,091	-0,200	1,000	#N/D	-0,286
LUM	N	19	20	18	14	20	19	19	17
	Na	8	8	8	5	5	7	6	5
	Ne	3,967	3,089	4,596	4,261	1,370	3,072	2,299	3,635
	I	1,654	1,516	1,782	1,489	0,609	1,472	1,186	1,453
	Ho	0,684	0,550	0,722	0,643	0,300	0,474	0,263	0,529
	He	0,748	0,676	0,782	0,765	0,270	0,675	0,565	0,725
	uHe	0,768	0,694	0,805	0,794	0,277	0,693	0,580	0,747
	F	0,085	0,187	0,077	0,160	-0,111	0,298	0,534	0,270
MIN2	N	6	5	6	4	7	8	6	8
	Na	6	6	8	5	5	7	5	7
	Ne	4,500	5,000	6,000	4,000	3,379	4,571	3,600	3,879
	I	1,633	1,696	1,936	1,494	1,376	1,721	1,424	1,629
	Ho	0,833	1,000	0,833	0,500	0,286	0,375	0,333	0,875
	He	0,778	0,800	0,833	0,750	0,704	0,781	0,722	0,742
	uHe	0,848	0,889	0,909	0,857	0,758	0,833	0,788	0,792
	F	-0,071	-0,250	0,000	0,333	0,594	0,520	0,538	-0,179
OUP	N	1	1	1	0	0	1	1	1
	Na	1	2	1	0	0	2	2	1
	Ne	1,000	2,000	1,000	0,000	0,000	2,000	2,000	1,000
	I	0,000	0,693	0,000	0,000	0,000	0,693	0,693	0,000
	Ho	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000
	He	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	0,000
	uHe	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000
	F	-	-1,000	-	-	-	-1,000	-1,000	-

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
BIT	N	2	2	2	2	2	1	2	2
	Na	4	4	3	2	1	1	3	3
	Ne	4,000	4,000	2,667	2,000	1,000	1,000	2,667	2,667
	I	1,386	1,386	1,040	0,693	0,000	0,000	1,040	1,040
	Ho	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,500	1,000
	He	0,750	0,750	0,625	0,500	0,000	0,000	0,625	0,625
	uHe	1,000	1,000	0,833	0,667	0,000	0,000	0,833	0,833
	F	-0,333	-0,333	-0,600	1,000	-	-	0,200	-0,600
COT	N	4	4	4	4	4	5	5	5
	Na	4	6	5	5	3	5	5	7
	Ne	2,909	5,333	4,000	4,000	1,684	3,846	5,000	6,250
	I	1,213	1,733	1,494	1,494	0,736	1,471	1,609	1,887
	Ho	0,500	0,750	1,000	0,500	0,250	0,600	0,000	1,000
	He	0,656	0,813	0,750	0,750	0,406	0,740	0,800	0,840
	uHe	0,750	0,929	0,857	0,857	0,464	0,822	0,889	0,933
	F	0,238	0,077	-0,333	0,333	0,385	0,189	1,000	-0,190
IBIU	N	3	3	3	3	0	4	4	2
	Na	6	4	4	4	0	3	3	4
	Ne	6,000	3,600	3,000	3,600	0,000	2,667	2,667	4,000
	I	1,792	1,330	1,242	1,330	0,000	1,040	1,040	1,386
	Ho	1,000	0,333	1,000	0,333	0,000	0,000	0,000	1,000
	He	0,833	0,722	0,667	0,722	0,000	0,625	0,625	0,750
	uHe	1,000	0,867	0,800	0,867	0,000	0,714	0,714	1,000
	F	-0,200	0,538	-0,500	0,538		1,000	1,000	-0,333
IGU	N	10	11	11	12	13	14	14	13
	Na	8	9	8	6	2	6	8	6
	Ne	5,882	5,261	4,840	2,880	1,742	3,920	4,667	2,641
	I	1,921	1,893	1,807	1,363	0,617	1,538	1,808	1,302
	Ho	0,800	0,636	0,636	0,333	0,000	0,214	0,143	0,462
	He	0,830	0,810	0,793	0,653	0,426	0,745	0,786	0,621
	uHe	0,874	0,848	0,831	0,681	0,443	0,772	0,815	0,646
	F	0,036	0,214	0,198	0,489	1,000	0,712	0,818	0,257

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
PIE	N	2	2	2	2	2	2	2	2
	Na	4	4	3	2	2	3	3	3
	Ne	4,000	4,000	2,667	2,000	2,000	2,667	2,667	2,667
	I	1,386	1,386	1,040	0,693	0,693	1,040	1,040	1,040
	Ho	1,000	1,000	0,500	0,000	0,000	1,000	0,500	1,000
	He	0,750	0,750	0,625	0,500	0,500	0,625	0,625	0,625
	uHe	1,000	1,000	0,833	0,667	0,667	0,833	0,833	0,833
	F	-0,333	-0,333	0,200	1,000	1,000	-0,600	0,200	-0,600
RIB	N	1	1	1	1	1	2	2	2
	Na	2	2	2	2	2	3	2	4
	Ne	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,667	2,000	4,000
	I	0,693	0,693	0,693	0,693	0,693	1,040	0,693	1,386
	Ho	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,000	1,000
	He	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,625	0,500	0,750
	uHe	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,833	0,667	1,000
	F	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	0,200	1,000	-0,333
TAP	N	5	5	5	4	4	4	5	5
	Na	6	7	5	5	2	4	4	6
	Ne	5,000	5,556	3,571	4,571	1,600	3,556	3,571	5,556
	I	1,696	1,834	1,418	1,560	0,562	1,321	1,332	1,748
	Ho	0,800	1,000	0,800	0,250	0,000	0,250	0,000	0,600
	He	0,800	0,820	0,720	0,781	0,375	0,719	0,720	0,820
	uHe	0,889	0,911	0,800	0,893	0,429	0,821	0,800	0,911
	F	0,000	-0,220	-0,111	0,680	1,000	0,652	1,000	0,268
PIS	N	1	1	1	1	2	3	3	3
	Na	2	2	2	1	3	5	2	3
	Ne	2,000	2,000	2,000	1,000	2,667	4,500	1,800	2,571
	I	0,693	0,693	0,693	0,000	1,040	1,561	0,637	1,011
	Ho	1,000	1,000	1,000	0,000	0,500	0,667	0,000	0,667
	He	0,500	0,500	0,500	0,000	0,625	0,778	0,444	0,611
	uHe	1,000	1,000	1,000	0,000	0,833	0,933	0,533	0,733
	F	-1,000	-1,000	-1,000	#N/D	0,200	0,143	1,000	-0,091

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
SBC	N	1	1	1	1	1	1	1	1
	Na	1	1	2	1	2	2	1	2
	Ne	1,000	1,000	2,000	1,000	2,000	2,000	1,000	2,000
	I	0,000	0,000	0,693	0,000	0,693	0,693	0,000	0,693
	Ho	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000
	He	0,000	0,000	0,500	0,000	0,500	0,500	0,000	0,500
	uHe	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000
	F	#N/D	#N/D	-1,000	#N/D	-1,000	-1,000	#N/D	-1,000
ORT	N	3	3	3	3	2	3	3	3
	Na	2	3	3	3	1	1	1	4
	Ne	1,385	2,000	2,571	2,571	1,000	1,000	1,000	3,600
	I	0,451	0,868	1,011	1,011	0,000	0,000	0,000	1,330
	Ho	0,333	0,667	1,000	0,333	0,000	0,000	0,000	1,000
	He	0,278	0,500	0,611	0,611	0,000	0,000	0,000	0,722
	uHe	0,333	0,600	0,733	0,733	0,000	0,000	0,000	0,867
	F	-0,200	-0,333	-0,636	0,455	#N/D	#N/D	#N/D	-0,385
PIR	N	4	4	4	3	6	4	6	5
	Na	5	5	4	5	2	4	3	6
	Ne	4,000	4,571	3,556	4,500	2,000	2,909	2,000	4,545
	I	1,494	1,560	1,321	1,561	0,693	1,213	0,868	1,643
	Ho	0,500	1,000	0,750	1,000	0,333	0,250	0,000	1,000
	He	0,750	0,781	0,719	0,778	0,500	0,656	0,500	0,780
	uHe	0,857	0,893	0,821	0,933	0,545	0,750	0,545	0,867
	F	0,333	-0,280	-0,043	-0,286	0,333	0,619	1,000	-0,282
MAQ	N	8	9	9	9	8	6	9	7
	Na	6	7	8	4	4	6	2	6
	Ne	4,741	5,226	6,231	2,793	2,246	4,500	1,246	3,769
	I	1,663	1,802	1,937	1,162	1,041	1,633	0,349	1,537
	Ho	0,625	0,667	0,889	0,333	0,500	0,667	0,000	0,714
	He	0,789	0,809	0,840	0,642	0,555	0,778	0,198	0,735
	uHe	0,842	0,856	0,889	0,680	0,592	0,848	0,209	0,791
	F	0,208	0,176	-0,059	0,481	0,099	0,143	1,000	0,028

Localidade		J1	T1	Aaz4	Aaz1	Li	L1	As1	Ac1
MIS	N	2	2	2	2	2	2	2	2
	Na	1	2	1	2	2	2	2	3
	Ne	1,000	2,000	1,000	1,600	2,000	1,600	1,600	2,667
	I	0,000	0,693	0,000	0,562	0,693	0,562	0,562	1,040
	Ho	0,000	1,000	0,000	0,500	0,000	0,500	0,500	1,000
	He	0,000	0,500	0,000	0,375	0,500	0,375	0,375	0,625
	uHe	0,000	0,667	0,000	0,500	0,667	0,500	0,500	0,833
	F	#N/D	-1,000	#N/D	-0,333	1,000	-0,333	-0,333	-0,600
SAR	N	15	15	15	15	16	16	15	15
	Na	11	10	7	6	4	12	2	5
	Ne	7,895	7,031	3,879	3,571	1,903	7,314	1,471	3,309
	I	2,203	2,099	1,587	1,412	0,872	2,193	0,500	1,328
	Ho	0,800	0,867	0,667	0,667	0,125	0,813	0,267	0,867
	He	0,873	0,858	0,742	0,720	0,475	0,863	0,320	0,698
	uHe	0,903	0,887	0,768	0,745	0,490	0,891	0,331	0,722
	F	0,084	-0,010	0,102	0,074	0,737	0,059	0,167	-0,242

