

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA PAULA SAMPAIO AMORIM

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PROECHIMYS* EM UMA REGIÃO DE ECÓTONO

São Luis
2015

ANA PAULA SAMPAIO AMORIM

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PROECHIMYS* EM UMA REGIÃO DE ECÓTONO

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Prof.^a Dr.^a Alcina Vieira de Carvalho Neta
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Lígia Tchaicka
Co-orientadora

São Luis
2015

ANA PAULA SAMPAIO AMORIM

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PROECHIMYS* EM UMA REGIÃO DE ECÓTONO

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Alcina Vieira de Carvalho Neta - UEMA/ Orientadora.

Prof^ª Dr^ª Lígia Tchaicka - UEMA/ Co-Orientadora.

Prof. Dr. Tadeu Gomes de Oliveira.

Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa.

A Deus, aos meus Pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus amados pais José Maria e Elzani e meus irmãos Paulo de Tarso e Marcos José pelo amor e carinho.

A todos os meus familiares em especial meus avós

A minha orientadora Prof^a Dr^a Alcina Vieira de Carvalho neta pela oportunidade que me foi dada e por confiar em meu trabalho.

A minha Co-orientadora Prof^a Dr^a Lígia Tchaicka por toda dedicação, carinho, paciência, incentivo e esforços para a conclusão deste trabalho, sem seu apoio não teria conseguido.

Ao professor Tadeu Gomes de Oliveira e sua equipe (em especial ao Odgley) por sua grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao meu querido amigo e companheiro de mestrado Carlos Licar que sempre esteve comigo me apoiando em todos os momentos alegres e tristes, você é um exemplo de dedicação.

As minhas amigas Camila Abreu Souza e Joana Alves que mesmo distantes sempre me incentivam.

As minhas amigas Suelen, Thércia, Vanessa, Hanna, Joseane, Nathália, Lília Carla e pelos momentos de descontração e apoio. A Fernanda Paz pela amizade e ajuda nas análises.

A todos os amigos do Grupo de Genética da Conservação - GGC.

À todos os Amigos do Laboratório de Patologia Molecular.

À secretária Francisca Silva Araújo nossa querida Frann por sua paciência e carinho.

À todos os amigos do mestrado em especial Eliane Ribeiro, Wilany Esposito, Maria Cecília, Débora de Matos.

Obrigada!!

“Nossa maior fraqueza está em desistir.

O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

RESUMO

Os Roedores representam a maior ordem de mamíferos e uma distribuição extensa. Neste grupo, a classificação taxonômica é geralmente baseada em estudos morfológicos. Devido às semelhanças entre as espécies, *Proechimys* pode ser identificada com maior precisão utilizando outras técnicas para além da morfologia externa. Este estudo teve como objetivo contribuir com a descrição da variação genética intra e interespecífica existente entre as populações de *Proechimys* na região geográfica que abrange os domínios sudeste da Amazônia, norte do Cerrado até áreas de transição com a Caatinga. Os animais analisados foram coletados com auxílio de armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, entre as bacias hidrográficas do Tapajós e Parnaíba. Para análise citogenética foi feita a coloração com Giemsa e o bandeamento G, C e NOR. Na análise molecular foi utilizado marcador molecular da região mitocondrial do gene citocromo b. A descrição dos blocos cariотípicos de *Proechimys roberti* foram melhorados na área leste de sua distribuição. Foram observados cinco linhagens evolutivas diferentes para a área de estudo, evidenciando a alta diversidade desta região.

Palavras-chaves: Echimyidae, citogenética, DNA mitocondrial.

ABSTRACT

Rodents represent the largest order of mammals and an extensive distribution. In this group, the taxonomic classification is usually based on morphological studies. Due to the similarities among the species *Proechimys* can be identified more accurately by using techniques other than the external morphology. This study aimed to contribute to the description of the intra and inter-existing genetic variation among populations of *Proechimys* in the geographic region covering the southeast areas of the Amazon, northern Cerrado to transition areas with the Caatinga. Animals analyzed were collected with the help of the Tomahawk and Sherman traps, between the river Tapajós and Parnaíba. Cytogenetic analysis was done with Giemsa staining and G, C and NOR banding. Molecular analysis used molecular marker of mitochondrial cytochrome b gene. The description of karyotypic blocks of *Proechimys roberti* had been improved in the east area of its distribution. We observed five different evolutionary lineages for the study area, showing the high diversity of this region.

Keywords: Echimyidae, Cytogenetics, Mitochondrial DNA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Distribuição das espécies de *Proechimys* no Brasil. Fonte: Guia dos roedores do Brasil, 2008. 15

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Mapa mostrando a origem dos *Proechimys roberti* cariotipados no presente estudo (círculos rosa), por Weksler (2001) (círculos azuis) e por Machado (2005) (círculos vermelhos). Os blocos cromossomos propostos por Machado (2005) são indicados pelas linhas negras e sua expansão pela linha vermelha..... 30

- Figura 2. Cariótipo com coloração convencional por Giemsa de *Proechimys roberti* (macho) coletado na região de São Luís-MA. Par cromossômico de numero nove mostrando a marcação para NOR. 29

- Figura 3. Banda G fêmea da região de Bacabal-Ma setas indicam o par sexual..... 29

CAPITULO 3

- Figura 1. Origem geográfica dos haplótipos definidos por um fragmento de 544pb do gene do citocromo b do DNA mitocondrial de *Proechimys* e número de espécime por haplótipo (N)..... 42

- Figura 2. Árvore filogenética obtidas através da análise pelo método de Máxima Verossimilhança de um fragmento de 544 pb do gene citocromo b do DNA mitocondrial (os números em cada ramo referem-se aos valores de *bootstrap* – 1000 réplicas) de indivíduos de *Proechimys*. Uma sequência *Trichromys apereoides* foi inserido como grupo externo..... 46

- Figura 3. Rede de haplótipos (median joining) gerada a partir de um fragmento de 544 pb do citocromo b do DNA mitocondrial de *Proechimys roberti*. Uma sequencia de *Proechimys longicaudatus* foi inserida como outgroup e está anotada pelo H_45, separado por 42 passos mutacionais..... 47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores médios obtidos para a morfometria dos indivíduos analisados no presente estudo e para os descritos por Bonvicino *et al.* (2008). O número de indivíduos amostrados é indicado entre parêntese e variação encontrada pode ser vista abaixo..... 32

CAPITULO 3

Tabela 1. Origem geográfica dos haplótipos definidos por um fragmento de 544pb do gene do citocromo b do DNA mitocondrial de *Proechimys*..... 42

Tabela 2. Índices de diversidade π e HD para as diferentes linhagens de *Proechimys* inferidas pela análise filogenética a partir de um fragmento de 544pb do citocromo b do DNA mitocondrial..... 44

Tabela 3. Tabela das distâncias genética (Kimura-2p) inferidas a partir de um fragmento de 544pb do citocromo b do DNA mitocondrial considerando as principais linhagens evolutivas amostradas no presente estudo..... 45

Tabela 4. Matriz de estruturação genética (Fst) no Grupo *P. roberti* entre seis regiões 1- Tapajós; 2- Maranhão; 3- Piauí; 4- Tocantins; 5- Mato Grosso e 6- Marabá. Os valores em negrito são significantes (P=0,05)..... 45

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
APRESENTAÇÃO.....	13
INTRODUÇÃO	14
1 ORDEM RODENTIA.....	14
1.2 GÊNERO <i>PROECHIMYS</i>	14
1.3 TAXONOMIA EM <i>PROECHIMYS</i>	16
1.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO <i>PROECHIMYS</i>	16
1.5 MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS POPULACIONAIS.....	18
REFERÊNCIA.....	20
CAPÍTULO 2 <i>Proechimys roberti</i>: novos dados para a caracterização da diversidade intraespecífica.....	24
CAPÍTULO 3. Diversidade genética em populações de <i>Proechimys</i> da região de transição entre a Amazônia o Cerrado e a Caatinga.....	36

Capítulo 1

Apresentação

APRESENTAÇÃO

Os roedores possuem uma ampla distribuição em todo o mundo e a maior parte das suas espécies é classificada taxonomicamente através de caracteres morfológicos. Como para este grupo é comum que as espécies de um mesmo gênero apresentem poucas variações fenotípicas, é importante o uso de outras técnicas, como por exemplo, análises citogenéticas e moleculares. Estas podem identificar espécies crípticas, bem como ajudar a compreender a diversidade intra-específica existente. Enquadram-se nessa problemática os ratos do gênero *Proechimys* que são abundantes na região Neotropical.

A região geográfica compreendida entre a bacia do Rio Tapajós e a do Rio Parnaíba sofre influências de três biomas diferentes: a Amazônia o Cerrado e a Caatinga. Para essa área é indicada a ocorrência de *P. goeldi*, *P. roberti* e *P. cuvieri* (BONVICINO *et al.*, 2008; PATTON & LEITE 2015). Esta região é banhada ainda pelos Rios Xingu, Araguaia, Tocantins, entre outros. Alguns desses cursos d'água tem sido indicados como barreiras geográficas entre as populações de *Proechimys* (LEITE & ROGERS 2013).

Neste estudo utilizamos dados citogenéticos e sequências do DNA mitocondrial do gene citocromo b de *Proechimys* do Maranhão, Pará, Tocantins e área de fronteira com o Piauí, buscando compreender a distribuição da diversidade genética para as espécies do gênero nesta região.

O trabalho organiza-se em três capítulos. No primeiro apresentamos uma introdução baseada na revisão dos trabalhos já desenvolvidos para o gênero *Proechimys*. O segundo capítulo é composto por uma nota científica onde investigamos a diversidade cariotípica na região leste da distribuição de *Proechimys roberti*. O terceiro capítulo é composto de um artigo sobre a diversidade do gene mitocondrial citocromo b em indivíduos de *Proechimys* coletados entre as bacias do Rio Tapajós e Paranaíba.

INTRODUÇÃO

1. ORDEM RODENTIA

Os roedores representam 42% da diversidade de mamíferos de todo mundo, sendo a maior ordem desta classe. Compreendem 2.277 espécies distribuídas em 481 gêneros e 33 famílias (CARLETON & MUSSER, 2005). Apresentam uma ampla distribuição sendo praticamente cosmopolitas, habitam muitos biomas, exceto a Antártida. Foram introduzidos nas ilhas oceânicas e na Nova Zelândia. Possuem um diversificado leque de adaptações para a locomoção: cursorial, natação, fossorial, saltar e deslizar (EISENBERG & REDFORD, 1999; MERRITT, 2010). No Brasil são encontrados 71 gêneros e 235 espécies da ordem (OLIVEIRA & BONVICINO, 2011).

A característica diagnóstica dos roedores é um único par de incisivos superiores e inferiores com um grande espaço chamado diastema e ausência de caninos. Padrões pré-molares e molares de cúspides são diversos e são indicadores de relações filogenéticas e adaptações para estratégias de alimentação (EISENBERG & REDFORD, 1999; FELDHAMER *et al.*, 2007). São geralmente herbívoros ou onívoros dependendo da época e disponibilidade de alimentos (FELDHAMER *et al.*, 2007).

Devido ao grande número de espécies de roedores, o grau de adaptabilidade, diversidade e as tendências evolutivas convergentes, não é surpreendente que relações sistemáticas de muitas famílias e subfamílias se tornam complexas, resultando em uma série de subordem, superfamília e subfamília. Apesar dessa ampla distribuição e diversidade, no entanto, apresentam algumas características morfológicas gerais uniformes (FELDHAMER *et al.*, 2007).

1.2 GÊNERO *PROECHIMYS*

O gênero *Proechimys* é composto por animais de tamanho médio a grande, com comprimento da cauda menor ou aproximadamente igual ao do corpo. A cauda é frequentemente ausente devido a facilidade com que se rompe (BONVICINO *et al.*, 2008). Sua coloração é castanha com o ventre branco e com pelos guarda escuros. Possuem também pelos aristiformes e a cauda tem pelos curtos é usualmente bicolors,

escura acima e clara abaixo. As orelhas são relativamente largas e longas. As patas são claras, com tufos ungueais claros (BOVICINO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2011). As fêmeas apresentam três pares de mamas (REIS *et al.*, 2011) com atividade reprodutiva durante todo o ano, mais intesamente de julho a novembro e de janeiro a março (PATTON *et al.*, 2000).

São encontrados em áreas florestais da Amazônia e mata de galeria, cerradão e floresta semidecídua no Cerrado (BONVICINO *et al.*, 2008). Conhecidos como ratos de espinhos, são os mais abundantes das florestas Neotropicais (PATTON *et al.*, 2000) onde são considerados excelentes dispersores de sementes (FORGET, 1991). Reis *et al.* (2011) cita pelo menos 16 espécies do gênero com ocorrência no Brasil, já Bonvicino *et al.* (2008) cita 15 espécies para a mesma região (Fig. 1) e recentemente em uma revisão Patton & Leite (2015) descreve 14 espécies com ocorrência no Brasil.

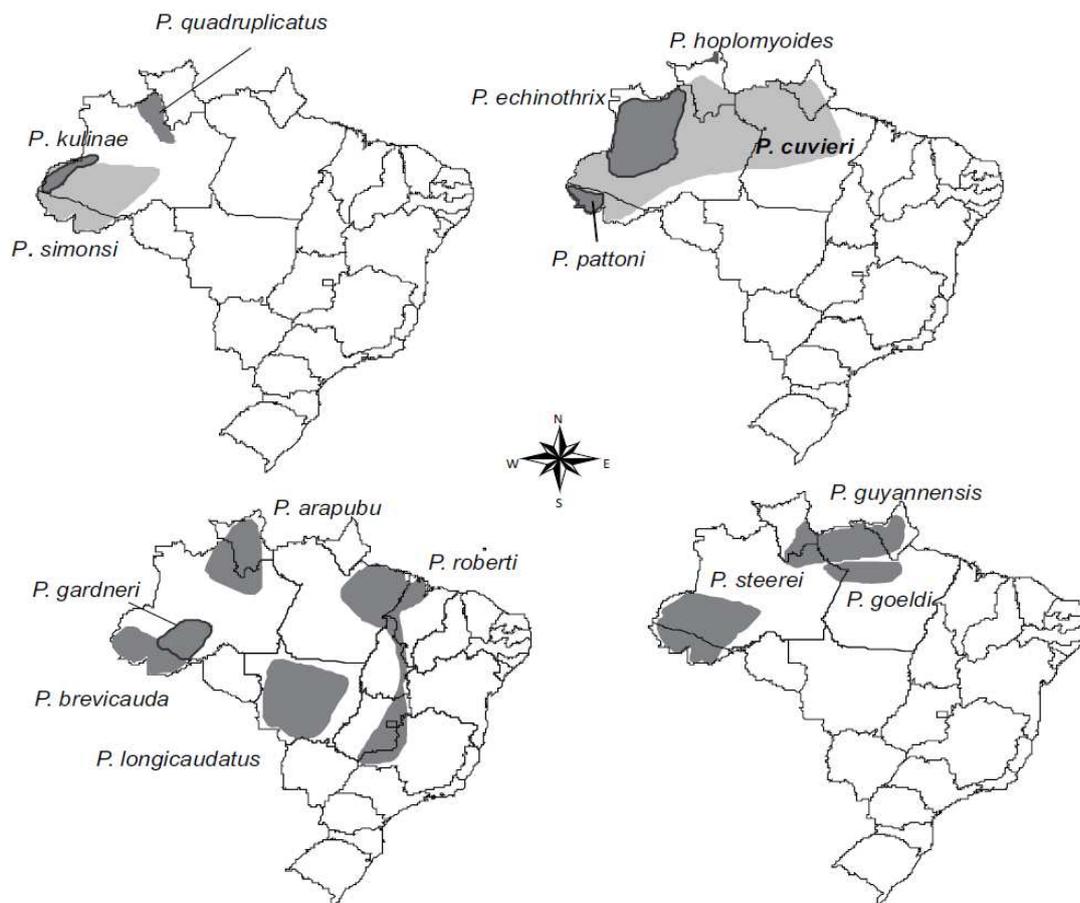


Figura1. Distribuição das espécies de *Proechimys* no Brasil. Fonte: Bonvicino *et al.*, 2008.

1.3 TAXONOMIA EM *PROECHIMYS*

As primeiras caracterizações taxonômicas se baseavam apenas em características morfológicas. Atualmente ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas, principalmente para a caracterização de espécies crípticas.

Para o gênero *Proechimys*, Moojen (1948) descreveu através de caracteres morfológicos dois subgêneros: *Proechimys* e *Trinomys*. O subgênero *Proechimys* incluiria *P. goeldii*, *P. semispinosus*, *P. longicaudatus* e *P. guyanensis* e o subgênero *Trinomys* *P. dimidiatus*, *P. inheringi*, *P. setosus*, *P. albispinus*. Todas as espécies seriam divididas em subespécies com exceção de *P. dimidiatus*, num total de 30 espécies para o Brasil.

Com base em caracteres morfológicos, Patton (1987) descreveu nove grupos de *Proechimys*: *P. conneli*, *P. decumanus*, *P. simonsi*, *P. goeldii*, *P. longicaudatus*, *P. trinitatus*, *P. curvieri*, *P. guyannensis* e *P. semispinosus*. Três dos grupos foram considerados monotípicos incluindo o grupo *decumanus* do sudoeste do Equador, o grupo *conneli* do noroeste da Colômbia e das áreas adjacentes na Venezuela e o grupo *simonsi* da Bacia Amazônica Ocidental desde a Colômbia até o Norte da Bolívia. Os outros grupos seriam politípicos, mas o número de espécies em cada grupo seria incerto.

Através de análises morfológicas, cromossômicas e moleculares Da Silva (1998) descreve novas espécies de *Proechimys* para a região do Rio Juruá oeste da Amazônia (*P. echinotrix*, *P. kulinae*, *P. pattoni*, *P. gardneri*) e encontrou espécies já registradas para a região (*P. simonsi*, *P. brevicauda*, *P. curvieri*, *P. steerei*).

1.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO *PROECHIMYS*

A citogenética é uma ferramenta útil para estudo taxonômico no gênero *Proechimys* e os dados de bandamento mostram-se indispensáveis, pois é possível identificar populações geneticamente distintas a partir dessas informações, iniciando assim estudos sistemáticos mais aprofundados (ELER, 2007).

Vários estudos realizados com o gênero tem demonstrado grande variabilidade cariotípica, porém quanto dessa diversidade cariotípica esta a associada à variabilidade

interespecífica ou intraespecífica permanece indeterminado (SILVA, 2008). Apesar disso, nota-se que ao menos uma característica vem mantendo-se estável: a presença de apenas um par cromossomo portador da NOR, característica da família Echimyidae (RIBEIRO, 2006).

A evolução cromossômica dentro do gênero *Proechimys* é discutida favorecendo a hipótese de um cariótipo ancestral com poucos cromossomos, um processo de aumento no número cromossômico por fissões cêntricas e conseqüentemente um aumento do número diploide ao longo da evolução (AGUILERA *et al.*, 1995).

Dentre os estudos que utilizaram a citogenética para avaliar as variações cariotípicas interespecíficas e intraespecíficas e para descrição de espécies em populações de *Proechimys* destacam-se alguns a seguir.

Através de análises citogenéticas e morfológicas, Amaral *et al.* (2013) propõe que os indivíduos do gênero *Proechimys* da região do Mato Grosso com cariótipo de $2n=17$ para machos e $2n=16$ para fêmeas pertencem a uma nova espécie ou a uma espécie conhecida que deve ser reavaliada.

Para a região da Amazônia foram encontrados dois cariótipos $2n=28$ e $NF=46$ e $2n=46$ e $NF=50$ associados respectivamente a *Proechimys cuvieri* e *P. guyannensis* (SILVA *et al.*, 2012).

Machado *et al.* (2005), analisando *Proechimys* coletados em 12 localidades da floresta tropical da Amazônia Brasileira e do Cerrado detectou nove entidades cariológicas: quatro cariomorfos diferentes com $2n = 30$, três com $2n = 28$, um com $2n = 15$ e um com $2n = 44$. Observou ainda uma variabilidade notável do número diplóide, morfologia cromossômica e padrões de bandas. Separou os cariomorfos observados da seguinte forma: *Proechimys gr goeldii* com $2n = 15$ e $NF = 16$ (Mato Grosso); *Proechimys longicaudatus* cariomorfo A com $2n = 28$ e $NF = 48$ (Rondônia e Mato Grosso); *Proechimys longicaudatus* cariomorfo B com $2n = 28$ e $NF = 50$ (Mato Grosso); *Proechimys longicaudatus* cariomorfo C com $2n = 28$ e $NF = 50$ (Goiás); *Proechimys roberti* cariomorfo D com $2n = 30$ e $NF = 56$ (Piauí e Tocantins), *Proechimys roberti* cariomorfo E com $2n = 30$ e $NF = 56$ (Mato Grosso); *Proechimys roberti* cariomorfo F com $2n = 30$ e $NF = 56$ (Mato Grosso). *Proechimys gr longicaudatus* cariomorfo G com $2n = 30$ e $NF = 52$ (Mato Grosso) e *Proechimys* sp. com $2n = 44$ e $NF = 52$ (Amazonas).

Eler *et al.* (2012) fez uma análise comparativa em espécies do gênero *Proechimys* coletados em vários locais da bacia do rio Madeira (Amazonas, Brasil) e

vale do rio Jari (Pará, Brasil). E dividiu os indivíduos em três grupos com base em números diplóides e fundamental: $2n = 28$, $NF = 46$ (*P. cuvieri* e *P. gr longicaudatus.*), $2n = 38$, $NF = 52$ (*Proechimys gr guyannensis.*) e $2n = 40$, $NF = 54$ (*P. gardneri*).

Na região do Tocantins foi encontrado *Proechimys roberti* com cariótipo $2n=30$ e $NF=54$ com o mesmo cariótipo dos exemplares do Para e Distrito Federal, indicando que essa espécie não tem uma distribuição restrita a Goiás e Minas Gerais, ocorrendo desde o leste do Amazonas, Pará, Tocantins até o Distrito Federal (LIMA, 2001).

1.5 MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS POPULACIONAIS

A partir do final da década de 70 surgiram metodologias capazes de decifrar as seqüências de DNA. Posteriormente, com a implantação da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) somando ao emprego dos métodos de eletroforese, os geneticistas passaram a dispor de um potente arsenal tecnológico para poder utilizar as variações das seqüências de DNA do núcleo ou de organelas como marcadores informativos do nível e distribuição da biodiversidade (MARQUES, 2003).

A maioria dos estudos de genética da conservação confiaram em DNA mitocondrial (DNAm_t), DNA de cloroplastos e *loci* de microssatélites por serem seletivamente neutros e altamente variáveis, constituindo assim marcadores genéticos satisfatório para análises a nível de população (MORITZ, 1994).

O DNA mitocondrial de mamíferos possui uma estrutura circular, fechada com 16.569 pares de bases e 37 genes. Sua herança é matrilinear, permitindo a identificação de linhagens maternas que contribuíram para a formação de diferentes grupos. É frequentemente utilizado em estudos evolutivos devido a sua alta variabilidade em seqüências nucleotídicas, resultado de alta taxa de mutação, maior em todo o DNAm_t do que em segmentos nucleares. Estes atributos fazem com que as análises de suas seqüências sejam utilizados na construção das árvores genealógicas de táxons (filogenias) e de biomas (filogeografias) (PEREIRA, 2000; AVISE, 2000; CARVALHO & RIBEIRO, 2002; MARQUES, 2003).

O DNA mitocondrial foi utilizado para caracterizar duas espécies morfológicamente semelhantes e simpátricas de roedores terrestres neotropicais do gênero *Proechimys* (Mammalia: Echimyidae). Um fragmento de 1140pb do citocromo b

e 445pb da região controle de quatro indivíduos de *P. cuvieri* e cinco de *P. cayennensis* da Guiana Francesa foram seqüenciados, o que permitiu descrever padrões intra e interespecífica de variação (STEINER *et al.*, 2000).

Weskler *et al.* (2001) realizou análise filogenética com citocromo b juntamente com análises kariótípicas e encontrou número diploide $2n=30$ e $NF=54-55$. Neste trabalho indicou que *P. roberti* é uma espécie válida do grupo *guyannensis* e que as espécies deste grupo ocorrem no leste da Amazônia, *P. oris*, é provavelmente um sinônimo júnior de *P. roberti*.

Bovicino *et al.* (2005), através da análise do citocromo b e kariotípica em *Proechimys quadruplicatus* e outras duas espécies de *Proechimys* da margem norte do Rio Negro, indicou a ocorrência de *Proechimys* sp. A, *Proechimys* sp. B e *P. guyannensis* que se agruparam pelos dados moleculares e/ou kariológicos indicando que eles são bastante similares e pertencem ao mesmo grupo de espécies, o grupo *guyannensis*.

Leite & Rogers (2013) encontrou estruturação populacional analisando o DNA mitocondrial em *Proechimys roberti* na região norte do Brasil com três clados associados as drenagens e os eventos tectônicos ocorridos nessa região durante o Pleistoceno.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, M.; REIG, O. A.; PEREZ-ZAPATA, A. G- and C-banding karyotypes of spiny rats (*Proechimys*) of Venezuela. **Revista Chinela de História Natural**, v. 68, n. 2, p. 185-196, 1995.

AMARAL, P. J. S.; NAGAMACHI, C. Y.; NORONHA, R. C. R.; COSTA, M. J. R. PEREIRA, A. L.; ROSSI, R. V.; MENDES, A. C.; PIECZARKA, J. C. *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae): characterization and taxonomic considerations of a form with a very low diploid number and a multiple sex chromosome system. **BMC Genetics**, v.14, n. 1, p.21, 2013.

AVISE J, C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. London: Harvard University Press, 2000. 447p.

BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B; VILELA, J. F. Karyologic and Molecular Analysis of *Proechimys* Allen, 1899 (Rodentia: Echimyidae) from the Amazonian Region. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v.63, n.1, p.191-200, 2005.

_____; OLIVEIRA, J. A.; D´ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil: Com chave para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. p. 102-103.

CARLETON, M. D.; MUSSER, G. G. **Order Rodentia**. WILSON, D. E.; Reeder, D. M. In: **Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference**. 3ed. Johns Hopkins University Press: Baltimore, 2005. p. 745–752.

CARVALHO P. F. M.; RIBEIRO Q. S. F. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Ortoninololaringal**, v. 68, n. 2, p. 268-75, 2002.

DA SILVA, M. N. F. Four new species of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) from the Western Amazon of Brasil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. v. 111, n.2, p. 436-471, 1998.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropical: The Central of Neotropics**. London: University of Chicago Press, 1999. 624p.

ELER, E. S. Citotaxonomia de roedores do gênero *Proechimys* (Echimyidae) da região amazônica, Brasil. 2007. 59f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

_____; DA SILVA, M. N. F.; SILVA, C. E. F.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p. 830-846, 2012.

FELDHAMER, G. A.; DRCKAMER, L. C.; VESSEY, S. H.; MERRIT, J. F.; KRAJEWSKI, C. **Mammalogy: Adaptation Diversity Ecology**. 3ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 643p.

FORGET, P. M. Scatterhoarding of *Astrocaryum paramaca* by *Proechimys* in French Guiana: Comparison with *Myoprocta exilis*. **Tropical Ecology**, v.32, n. 2, p. 155-167, 1991.

LEITE, R.I N.; ROGERS, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 13, n. 4, p. 639-664, 2013.

LIMA, J. F. S. Diversidade Cariológica de Roedores de pequeno porte do estado do Tocantins, Brasil. 2000. 183f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

MACHADO, T.; SILVA, M. J. J.; LEAL-MESQUITA, R. E.; CARMIGNOTTO, A. P.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Nine karyomorphs for spiny rats of the genus *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from North and Central Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 682-692, 2005.

MARQUES, E. K. **Diagnóstico Genético-Molecular**. 1ed. Canoas: Ulbra, 2003. 372p.

MERRITT, J. F. **The Biology of Small Mammals**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2010. 313p.

MOOJEN, J. Speciation in the Brazilian spiny rats (genus *Proechimys*, family Echimyidae). **University of Kansas Publications, Museum of Natural History**, p.301-406, 1948.

MORITZ, C. Defining “ Evolutionary Significant Units” for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, n.10, p. 373- 375, 1994.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In: REIS, N. R. PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2ed. Londrina: [s.n.], 2011. p.358-406.

PATTON, J. L. Species groups of spiny rats, genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). In: PATTERSON, B. D.; TIMM, R. M. Studies in Neotropical mammalogy. **Fieldiana Zoology**, v.39, 1987. p. 305-345.

_____; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and Ecological Diversification of Amazônia. **American Museum of Natural History**, n. 244, p.1-306, 2000.

_____; LEITE, R. N. . Genus *Proechimys*. In: Patton, J. L.; Pardiñas, U. F. J.; D'Elía, G.. (Org.). **Mammals of South America**, Volume 2: Rodents. 1ed. Chicago: University of Chicago Press, 2015, v. , p. 950-988.

PEREIRA, S. L. Mitochondrial Genome Organization and Vertebrate Phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 745-752, 2000.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2ed. Londrina: [s.n.], 2011. 439p.

RIBEIRO, N. A. B. Análises cromossômicas e Filogenia de Roedores do gênero *Proechimys* (ECHIMYIDAE, RODENTIA). 2006. 111f. **Tese** (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

SILVA, C. E. F. Citogenética de cinco espécies de pequenos mamíferos não voadores de três localidades na Amazônia Central. 2008. 61f. **Dissertação** (mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

SILVA, C. E. F.; ELER, E. S.; DA SILVA, M. N. F.; FELDBRG, E. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 88-94, 2012.

STEINER, C.; SOURROUILLE, P.; CATZEFLIS, F.; Molecular characterization and mitochondrial sequence variation in two sympatric species of *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) in French Guiana. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, n. 10, p. 963-973, 2000.

WEKLER, M.; BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; JÚNIOR, J. S. S. Status of *Proechimys robert* and *P. oris* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) from eastern Amazonia and Central Brasil. **Journal of Mammalogy**, v.82, n. 1, p.109–122, 2001.

Capítulo 2

***Proechimys roberti*: novos dados para a caracterização da
diversidade intraespecífica**

**(Nota científica que será submetida ao Boletim da Sociedade
Brasileira de Mastozoologia)**

***Proechimys roberti*: novos dados para a caracterização da diversidade
intraespecífica**

Ana Paula S. Amorim¹ Lílian L. S. Miranda² Tadeu G. Oliveira³ Lígia Tchaicka³ Alcina
V. Carvalho Neta³.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão
– Campus São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA
Cidade Operária - CEP 65055-310 São Luís, Maranhão,
Brasil. paulasampaio4@gmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas Licenciatura, Universidade Estadual do Maranhão –
Campus São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA Cidade
Operária - CEP 65055-310 São Luís, Maranhão, Brasil

³Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão – Campus
São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA Cidade Operária
- CEP 65055-310. São Luís, Maranhão, Brasil.

Título Breve: Diversidade intraespecífica de *Proechimys roberti*

Correspondência:

Ana Paula S. Amorim

Universidade Estadual do Maranhão

Cidade Universitária Paulo VI, s/n – Tirirical São Luis-Brasil

e-mail: paulasampaio4@gmail.com

RESUMO

Proechimys roberti é uma espécie de roedor que apresenta variação cariotípica dentro de sua ampla área de ocorrência. No presente estudo, medidas corporais e dados cariotípicos foram obtidos de *Proechimys roberti* coletados ao longo da região noroeste de sua ocorrência, buscando contribuir com a descrição da variação intraespecífica existente. Os dados citogenéticos possibilitaram o refinamento da descrição dos limites de ocorrência de cada cariomorfo e os animais analisados mostram padrão de tamanho diferente do relatado pela literatura.

Palavras chave: Echimyidae; Rodentia; Cariótipo; Citogenética; Biometria.

ABSTRACT

Proechimys roberti is a species of rodent that presents variation of karyotypes within its broad area of occurrence. In the present study measures of body and karyotypes were obtained from *Proechimys roberti* collected along the northeast region of its occurrence, in order to contribute to the description of intraspecific variation. Cytogenetic data allow to refine the description of the limits of occurrence of each karyotype and animals show a pattern of size different of the reported in the literature.

Key words: Echimyidae; Rodentia; Kariotype; Cytogenetics; Biometrics.

NOTA CIENTÍFICA

A família Echimyidae, dos ratos de espinho, é a mais diversificada dos roedores histricognatos da América do Sul (PATTON *et al.*, 2000; EMMONS, 2005; VAUGHAN *et al.*, 2011). Nesta família, o gênero *Proechimys* é o mais abundante nas florestas Neotropicais (PATTON *et al.*, 2000). Algumas informações quanto a delimitação dos limites geográficos de ocorrência das espécies de *Proechimys* bem a definição das espécies que compõem o gênero foram geradas nos últimos anos, no entanto, o conhecimento dessas questões permanecem ainda incompleto. O número atual de espécies descritas para o Brasil varia de 14 a 16 (BONVICINO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2011; PATTON & LEITE, 2015).

Devido as dificuldades de identificação baseada na morfologia dos animais, a análise citogenética tem sido validada como ferramenta apropriada para a identificação de populações distintas de *Proechimys* (MACHADO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012; ELER *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2013; WEKSLER *et al.* 2001).

O número diploide para esse gênero varia de $2n=15$ (MACHADO *et al.*, 2005) a $2n=62$ (BENADO *et al.*, 1979). Para algumas espécies, diferentes formas cromossômicas são encontradas, como exemplo: para, *P. cuvieri* $2n=28$ FN=46-50; *P. guyanensis* $2n=38-46$ e FN=50-54, *P. longicaudatus* $2n=28$ FN=48-50; *P. brevicauda* $2n=28-30$ FN=48-50; *P. guairae* $2n=46-62$ FN=72-74; *P. urichi* $2n=62$ FN=88; *P. semispinosus* $2n=30$ FN=50-56; *P. steerei* $2n=24$ FN=40-42; *P. quadruplicatus* $2n=28$ FN=42-44; *P. gularis* $2n=30$ FN=48; *P. simonsi* $2n=32$ FN=58; *P. mincae* $2n=48$ FN=68; *P. oconnelli* $2n=32$ FN=52; *P. canicollis* $2n=24$ FN=44; *P. decumanus* $2n=30$ FN=54; *P. echinothrix* $2n=32$ FN=60; *P. kulinae* $2n=34$ FN=52; *P. gardneri* $2n=40$ FN=56; *P. pattoni* $2n=40$ FN=56; *P. goeldii* $2n=24$ FN=42 (BENADO *et al.*, 1979; REIG *et al.*, 1979; GADNER & EMMONS, 1984; MAIA e LANGGUTH, 1993; BUENO & GÓMEZ-LAVERDE, 1993; DA SILVA, 1998; PATTON *et al.*, 2000; LIMA 2001; MACHADO *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2006; ELER *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

Proechimys roberti pertence ao grupo *guyannensis* (PATTON, 1987), e tem sua ocorrência e registrada desde a margem direita do Rio Amazonas, até os limites do

Cerrado, incluindo áreas de transição com o bioma Caatinga (Estados do Maranhão, Pará, Piauí, Tocantins, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal (PATTON, 1987; PATTON & LEITE 2015). *Proechimys roberti* possui $2n=30$ e $FN=54-56$ com três cariomorfos descritos para a espécie (LEAL-MESQUITA, 1991; LIMA, 2001; WESKLER et al., 2001; GARDNER & EMMONS 1984; MACHADO et al., 2005; RIBEIRO, 2011).

No presente estudo as medidas corporais e os cariótipos foram obtidos de *Proechimys roberti* coletados ao longo da região noroeste de sua ocorrência, buscando contribuir com a descrição da variação intraespecífica existente.

Os animais analisados foram coletados com auxílio de armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman (Autorização IBAMA nº14345-2 e Registro 543545). O material citogenético e os vouchers são mantidos na Coleção de DNA e Tecidos da Fauna Maranhense– CoFauMa / UEMA (LICENÇA - CEEA/CMV/UEMA nº 14/09) (Tabela1). Ao todo foram analisados 10 indivíduos. Os cariótipos de 9 indivíduos foram investigados para *Proechimys* provenientes do Estado do Maranhão e Tocantins Fig. 1 (um macho de Capinzal do Norte – MA, três machos e uma fêmea de Bacabal – MA, um macho de São Luís – MA, uma fêmea e dois macho de Araguatins – TO). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir da medula óssea do fêmur o material foi preparado conforme Ford e Hamerton (1956). Para a obtenção da região organizadora do nucléolo (NOR) foi empregada a técnica de Howell e Black (1980) para banda G utilizou-se o protocolo descrito por Seabright (1971) e para banda C o descrito por Sumner (1990). As metáfases foram analisadas e capturas através do fotomicroscópio (Fotos Microscopes Axio Scope.A1). Para a morfometria, foram realizadas medições para 10 animais, com auxílio do paquímetro e balança, considerando o comprimento total (CT), comprimento cabeça-corpo (CC), comprimento da cauda (CA), pata posterior com unha (PÉ), e massa corporal em gramas (MC).

Através das análises com coloração convencional com giemsa obtivemos o número diploide de $2n= 30$ e o número fundamental igual a 54 para os espécimes sem variação dos autossomos entre os indivíduos. Este cariótipo inclui 13 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 1 par subtlocêntrico (par de número 13), sendo o par de número 14 composto de cromossomos bastante pequenos. O cromossomo X é um metacêntrico e o Y é um submetacentrico pequeno (Fig 2). A

banda G mostrou grandes blocos heterocromáticos na maioria dos cromossomos, incluindo o par sexual (Fig 3). No bandeamento C observou-se a região heterocromatina em regiões teloméricas nos braços 2,3,4, 6 e 7 o cromossomo X e Y mostraram-se heterocromáticos.

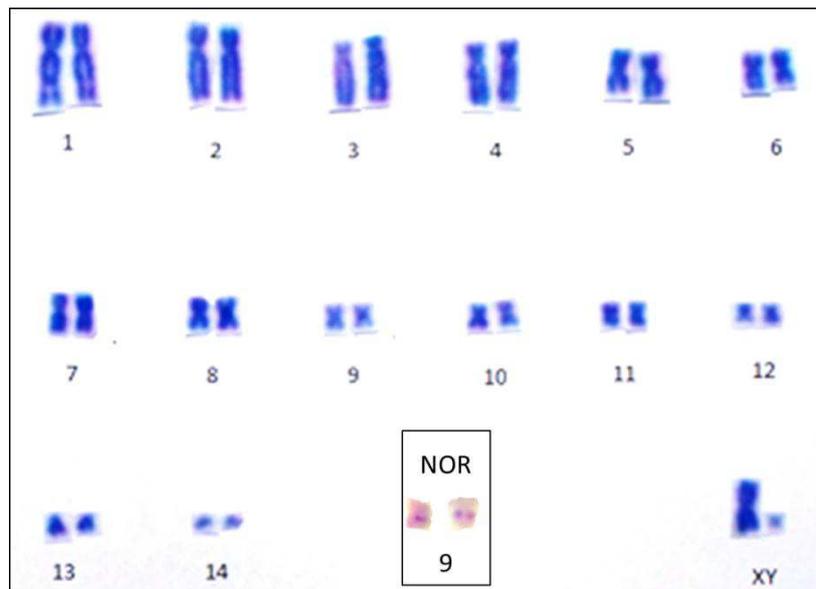


Figura 2. Cariótipo com coloração convencional por Giemsa de *Proechimys roberti* (macho) coletado na região de São Luís-MA. Par cromossômico de número nove mostrando a marcação para NOR.

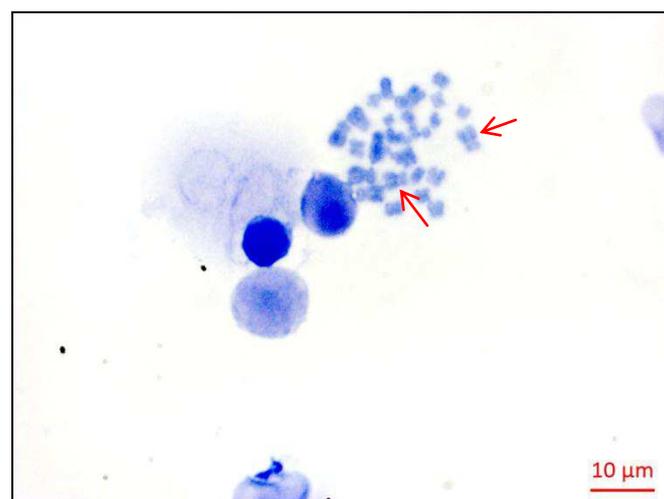


Figura 3. Banda G fêmea da região de Bacabal-Ma setas indicam o par sexual.

Os primeiros registros citogenéticos de *Proechimys roberti* foram feitos por Gardner e Emmons (1984) e Leal – Mesquita (1991) que descreveram um cariótipo de $2n=30$ e $NF=56$. Posteriormente Weskler *et al.*, (2001) analisou animais de uma abrangente área de distribuição da espécie no Pará, Tocantins, Maranhão e Goiás, registrando uma pequena variação no número fundamental de 54-55 entre os indivíduos amostrados. As diferenças ocorreram no par 14 que é composto por cromossomos acrocêntricos ou submetacêntricos. Comparando com os cariótipos anteriormente descritos, este autor conclui não haver diferenciação cariotípica considerável ou relacionada a diferentes populações, atribuindo uma única coleção cromossômica para a espécie. Mais recentemente, porém, Machado *et al.*, (2005) analisaram animais provenientes de outros pontos de coleta e delimitaram três blocos cromossômicos com pequenas variações, apresentando diferentes citótipos. Para a região do Piauí e Tocantins descreveram o cariomorfo D com o par 13 sendo um submetlocêntrico e o 14 um pequeno metacêntrico. Para o estado do Mato Grosso relataram dois cariomorfos E e F: no cariomorfo E os pares 13 e 14 são submetlocêntricos, já no cariomorfo F o par 13 é um submetacêntrico e o 14 um submetlocêntrico (Fig.1).

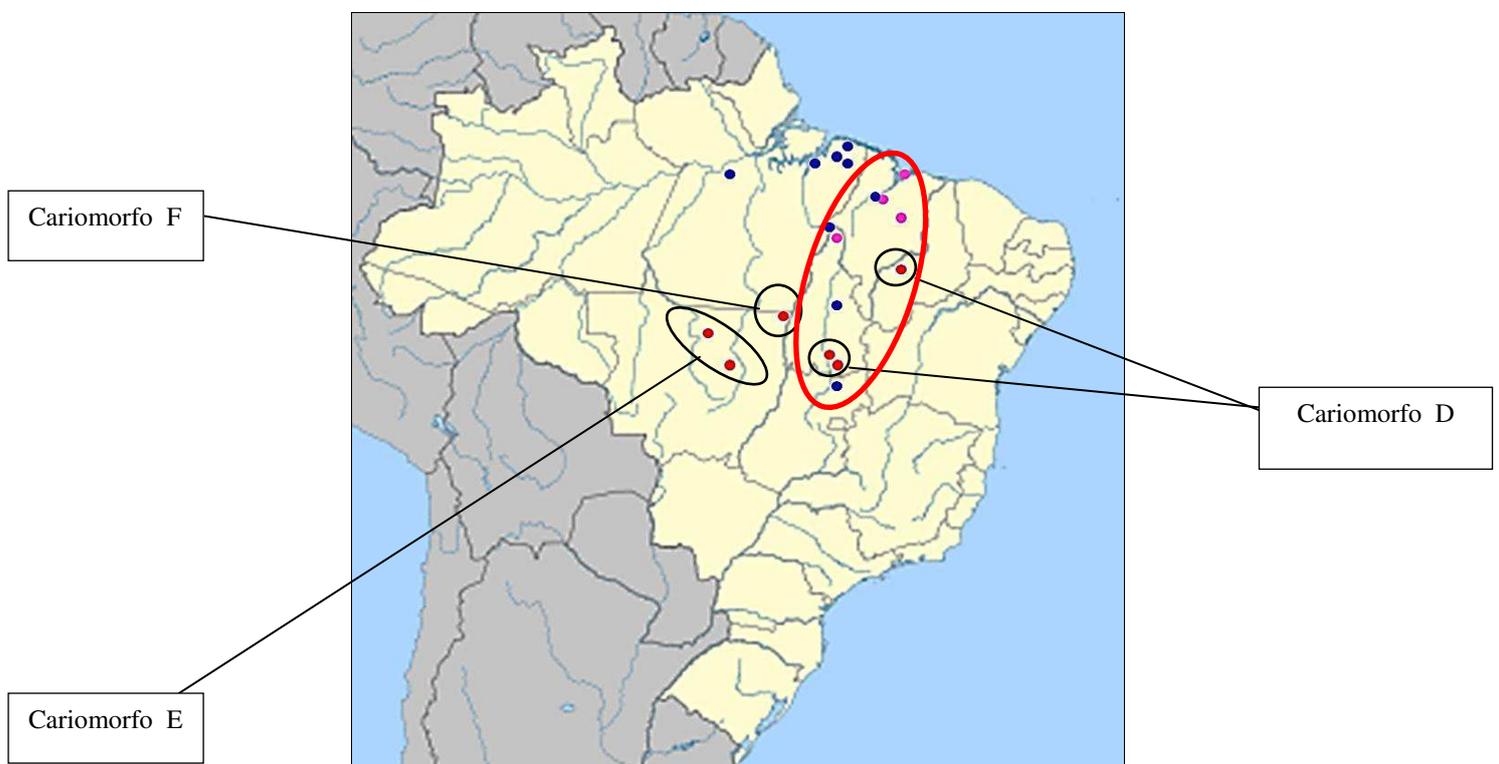


Figura 1. Mapa mostrando a origem dos *Proechimys roberti* cariotipados no presente estudo (círculos rosa), por Weskler (2001) (círculos azuis) e por Machado (2005) (círculos vermelhos). Os blocos cromossomos propostos por Machado (2005) são indicados pelas linhas negras e sua expansão pela linha vermelha

O cariótipo descrito no presente estudo é equivalente ao cariomorfo D descrito por Machado *et al.* (2005) indicando que esse não é restrito a região sul do Tocantins e oeste do Piauí ocorrendo também na região norte do Tocantins até os limites do Estado do Maranhão. Nossos dados, assim, complementam a descrição da diversidade cariotípica para *Proechimys roberti*, expandindo para Norte a descrição da área de ocorrência do cariomorfo D descrito por Machado *et al.* (2005).

A existência dos diferentes blocos cromossômicos é atribuída por Machado *et al.* (2005) a um efeito vicariante dos Rios Tocantins (Bloco D X Bloco F) e Xingu (Bloco F X Bloco E). Nesse sentido, os dados aqui apresentados discordam do efeito do Rio Tocantins como possível barreira, uma vez que registramos o cariomorfo D em sua margem esquerda (Fig. 1).

Segundo Yonenaga-Yassuda (1985) é característico da família Echimyidae a existência de um único par portador da região organizadora do nucléolo, contudo variações são encontradas no par cromossômico portador da NOR (MACHADO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012; ELER *et al.*, 2012). Para os espécimes estudados observamos a NOR no nono par cromossômico autossômico (Fig. 2), concordando com o relato de Machado *et al.* (2005) e Ribeiro (2006). O padrão de bandamento G foi semelhante ao encontrado por Lima (2001) com os pequenos cromossomos apresentando pouca diferenciação para essas bandas. Já para o bandamento C nossos dados discordam dos obtidos por Machado *et al.* (2005) e por Lima (2001). Apenas há consenso na marcação do cromossomo Y, indicado por nosso estudo e por Lima (2001) e para os cromossomos 9,10,11,13 entre Lima (2001) e Machado (2005). Tal observação indica a existência de variação heterocromática para os indivíduos de diferentes regiões geográficas, mesmo dentro do cariomorfo D.

Algumas medidas corporais observadas diferem das descritas por Bonvicino *et al.* (2008) que revisaram dados disponíveis para animais depositados em coleções (Tabela 1). Apesar desses autores não especificarem a origem geográfica dos animais estudados, pode-se acreditar que as diferenças apresentadas se devem a diferenciação morfológica geográfica, uma vez que os dados biométricos são bastante influenciados por fatores ecológicos locais. Dessa forma, para a região abordada no presente estudo, os animais apresentaram-se menores, porém mais pesados, que os anteriormente descritos.

Tabela 1. Valores médios obtidos para as medidas corporais dos indivíduos analisados no presente estudo e para os descritos por Bonvicino *et al.* (2008). O número de indivíduos amostrados é indicado entre parêntese e variação encontrada pode ser vista abaixo.

Estudo	CT	CC	CA	PE	MC
Bonvicino <i>et al.</i> , (2008)	-	198 (17) 166-238	145 (17) 125-168	43 (17) 39-48	191 (13) 104-320
Presente estudo	298,83(6) 265-345	158,33(6) 150-185	145,5 (6) 129-180	43,33(6) 38-54	254,41(10) 164-440,1

O esclarecimento de padrões de diversidade intraespecífica gera subsídios importantes para os estudos de roedores, contribuindo significativamente para o conhecimento da biodiversidade. Os resultados relatados sustentam o uso da citogenética para identificação da origem geográfica em *Proechimys roberti* e indicam a necessidade de ampliar a amostragem de animais com vistas a uma melhor caracterização morfométrica para a espécie.

REFERÊNCIAS

AMARAL, P. J. S.; NAGAMACHI, C. Y.; NORONHA, R. C. R.; COSTA, M. J. R. PEREIRA, A. L.; ROSSI, R. V.; MENDES, A. C.; PIECZARKA, J. C. *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae): characterization and taxonomic considerations of a form with a very low diploid number and a multiple sex chromosome system. **BMC Genetics**, v.14, n. 1, p.21, 2013.

BENADO, M. et al. Biochemical genetics of chromosome forms of venezuelan spiny rats of the *Proechimys guairae* and *Proechimys trinitatis* superspecies. **Genetica**, v. 50, n. 2, p. 89-97, 1979.

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J. A.; D´ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil: Com chave para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. p. 102-103.

BUENO, M.L., GOMEZ-LAVERDE, M. Variacion Heterocromática em *Proechimys semispinosus* (Rodentia: Echimyidae) de la Region Pacifica Colombiana. **Caldasia**, 17: 333-340, 1993.

DA SILVA, M. N. F. Four new species of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia:Echimyidae) from the Western Amazon of Brasil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. v. 111, n.2, p. 436-471, 1998.

ELER, E. S.; DA SILVA, M. N. F.; SILVA, C. E. F.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p. 830-846, 2012.

EMMONS, L. H. A revision of the genera of arboreal Echimyidae (Rodentia: Echimyidae, Echimyinae), with descriptions of two new genera. **Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography (A Celebration of the Career of James L. Patton)**. University of California Publications in **Zoology series**, 133, 247-31. 2005.

FORD, C.E.; HAMERTON, J.L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 31, n. 6, p. 247-251, 1956.

- GARDNER, A. L.; EMMONS, L. H. Species groups in *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) as indicated by karyology and bullar morphology. **Journal of Mammalogy**, p. 10-25, 1984
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.
- LEAL-MESQUITA, E.R.R.B.P. Estudos Citogenéticos em dez espécies de roedores brasileiros da família Echimyidae. **PhD thesis**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1991.
- LIMA, J. F. S. Diversidade Cariológica de Roedores de pequeno porte do estado do Tocantins, Brasil. 2000. 183f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- MACHADO, T.; SILVA, M. J. J.; LEAL-MESQUITA, R. E.; CARMIGNOTTO, A. P.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Nine karyomorphs for spiny rats of the genus *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from North and Central Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 682-692, 2005.
- MAIA, V.; LANGGUTH, A. Constitutive Heterochromatin Polymorphism And Nors In *Proechimys-Cuvieri* Petter, 1978 (Rodentia, Echimyidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, n. 1, p. 145-154, 1993.
- PATTON, J. L. Species groups of spiny rats, genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). In: PATTERSON, B. D.; TIMM, R. M. Studies in Neotropical mammalogy. **Fieldiana Zoology**, v.39, 1987. p. 305-345.
- _____.; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and Ecological Diversification of Amazônia. **American Museum of Natural History**, n. 244, p.1-306, 2000.
- _____.; LEITE, R. N. . Genus *Proechimys*. In: Patton, J. L.; Pardiñas, U. F. J.; D'Elía, G.. (Org.). **Mammals of South America**, Volume 2: Rodents. 1ed. Chicago: University of Chicago Press, 2015, v. , p. 950-988

REIG, O. A.; TRANIER, M.; BARROS, M. A. Sur l'identification chromosomique de *Proechimys guyannensis* (E. Geoffroy, 1803) et de *Proechimys cuvieri* Petter, 1978 (Rodentia, Echimyidae). **Mammalia**, v. 43, n. 4, p. 501-506, 1979.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2ed. Londrina: [s.n.], 2011. 439p.

RIBEIRO, N. A. B. Análises cromossômicas e Filogenia de Roedores do gênero *Proechimys* (ECHIMYIDAE, RODENTIA). 2006. 111f. **Tese** (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

RIBEIRO, N. A. B.; PIECZARKA, J. C. SOARES, M. C. P.; NAGAMACHI, C. Y. Identificación de una colonia de largo plazo de *Proechimys* en el Instituto Evandro Chagas, Pará, Brasil, con base en informaciones citogenéticas. **Revista Pan-Amazônica Saude**, v.2, n.1, p.59-66, 2011.

SEABRIGHT, M. "The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements of man". **Chromosoma**, 36: 204-210, 1971.

SILVA, C. E. F.; ELER, E. S.; DA SILVA, M. N. F.; FELDBRG, E. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 88-94, 2012.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. **Unwin Hyman**, Londres. 1990.

VAUGHAN, T. A.; RYAN, J. M.; CZAPLEWSKI, N. J.; **Mammalogy**. 5 ed. Sudbury, Massachusetts: Jones e Bartlett learning, 2011.

WEKLER, M.; BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; JÚNIOR, J. S. S. Status of *Proechimys robert* and *P. oris* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) from eastern Amazonia and Central Brasil. **Journal of Mammalogy**, v.82, n. 1, p.109–122, 2001.

YONENAGA Y. Karyotypes and chromosome polymorphisms in Brazilian rodents. **Caryologia** 28:269– 286 (1975).

Capítulo 3

Diversidade genética em populações de *Proechimys* da região de transição entre a Amazônia o Cerrado e a Caatinga.

(ARTÍGO QUE SERÁ SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
MASTOZOLOGIA NEOTROPICAL)

Diversidade genética em populações de *Proechimys* da região de transição entre a Amazônia o Cerrado e a Caatinga.

Ana Paula S. Amorim¹ Lílian L. S. Miranda² Tadeu G. Oliveira³ Alcina V. Carvalho
Neta³. Lígia Tchaicka³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão – Campus São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA
Cidade Operária - CEP 65055-310 São Luís, Maranhão,
Brasil. paulasampaio4@gmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas Licenciatura, Universidade Estadual do Maranhão – Campus São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA Cidade Operária - CEP 65055-310 São Luís, Maranhão, Brasil

³Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão – Campus São Luís. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA Cidade Operária - CEP 65055-310. São Luís, Maranhão, Brasil.

Correspondência:

Ana Paula S. Amorim

Universidade Estadual do Maranhão

Cidade Universitária Paulo VI, s/n – Tirirical São Luis-Brasil

e-mail: paulasampaio4@gmail.com

RESUMO

Proechimys é considerado um gênero muito complexo em sua diversidade, relações interespecíficas e seus limites de distribuição são pouco conhecidos. Neste estudo utilizamos o gene citocromo b do DNA mitocondrial para descrição da distribuição da variabilidade genética de *Proechimys* coletados entre as Bacias do Rio Tapajós e Parnaíba. A espécie *P. roberti* mostrou alta divergência entre as diferentes áreas de sua ocorrência com um clado restrito a região do Tapajós e um padrão de isolamento pela distância. Para a região de estudo encontramos cinco diferentes linhagens evolutivas do gênero, indicando a alta diversidade da área.

Palavras chave: Echimyidae; Rodentia; Citocromo b; DNA mitocondrial.

ABSTRACT

Proechimys is considered a very complex and little-known genus diversity, interspecific relationships and their distribution limits. In this study we used the cytochrome b gene of mitochondrial DNA to describe the distribution of the genetic variability of the *Proechimys* collected between the Tapajós and Parnaíba Basins. The species *P. roberti* showed high divergence between areas of their occurrence with a clade restricted to the region of the Tapajós and a pattern and isolation by distance. We found five different evolutionary lineage of the genus indicating the high diversity of this area.

Key words: Echimyidae; Rodentia; Cytochrome b; Mitochondrial DNA

Introdução

Os roedores do gênero *Proechimys* divergiram dos outros equimídeos no Mioceno Inferior, tendo como provável centro de origem a margem leste do rio Xingu (VILELA, 2010), e a partir daí atingiram uma ampla distribuição em florestas neotropicais (BONVICINO *et al.*, 2008; PATTON *et al.*, 2000).

Os animais desse gênero possuem pelagem espinhosa com a presença de pelos aristiformes. A coloração dorsal varia de castanho-avermelhada a amarelada, tracejada de preto por pelos-guarda escuros. A coloração das laterais do corpo é bem delimitada com a superfície ventral totalmente branca, a cauda tem pelos curtos é usualmente bicolors, escura acima e clara abaixo. As orelhas são relativamente largas e longas. As patas são claras, com tufos ungueais claros (BOVICINO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2011). São encontrados nas áreas florestais da Amazônia e mata de galeria, cerradão e floresta semidecídua no Cerrado (BONVICINO *et al.*, 2008) onde são considerados excelentes dispersores de sementes (FORGET, 1991).

A classificação taxonomica deste grupo mostra-se bastante complexa, e as relações evolutivas entre as espécies não foram ainda elucidadas, mas tem se buscado esse esclarecimento pela análise de sua variação morfológica e cariotípicas (WESKLER *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2005; ELER *et al.*, 2012). Nesse sentido, Gardner e Emmons (1984) organizaram as espécies do gênero em quatro grupos *Trinomys*, *brevicauda*, *guirae* e *semispinosus* baseados em dados citogenéticos e da morfologia do crânio. Patton (1987), baseado em dados morfológicos do crânio, dividiu esses roedores em nove grupos *decumanus*, *canicollis*, *simonsi*, *semispinosus*, *longicaudatus*, *goeldii*, *guyannensis*, *cuvieri*, *trinitatus* e, mais recentemente Patton & Leite (2015) descreveram dez grupos (compilação de dados da literatura) *semispinosus*, *simonsi*, *trinitatus*, *goeldii*, *guyannensis*, *longicaudatus*, *canicollis*, *decumanus*, *echinothrix*, *gardneri*.

A região geográfica brasileira compreendida entre os Rios Tapajós e Parnaíba abriga grande diversidade de fitofisionomias. O bioma Amazônico domina a área oeste dessa região, sendo substituído pelo Cerrado a partir de Bacia do Tocantins – Araguaia, sofrendo influência da Caatinga em seu limite leste, na Bacia do Parnaíba. Para essa região é indicada a ocorrência de *P. roberti* e *P. cuvieri* e *P. goeldi* (ABSABER, 1977; BONVICINO *et al.*, 2008). Estudos recentes indicaram que alguns desses rios podem

ter servido como importantes barreiras que promoveram a diferenciação de linhagens dentro da espécie *P. roberti* (LEITE & ROGERS, 2013).

No presente trabalho, utilizamos sequencias do gene Citocromo b do DNA mitocondrial de espécimes de *Proechimys* coletados entre as Bacias dos Rios Tapajós e Parnaíba, buscando compreender os padrões de distribuição da diversidade genética na área de estudo.

Material e Métodos

As amostras foram obtidas com auxílio de armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, em campo um fragmento de tecido da cauda foi retirado para análises moleculares (Autorização IBAMA nº14345-2 e Registro 543545). As amostras foram coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Tocantins e Piauí (Fig 1). Obtivemos também amostras da Coleção de Tecidos Animais do Departamento de Ciências Biológicas da UFES (CTA 1824/CTA1652/CTA1461/CTA - Haplótipos 36, 37 e 38 ver Tabela 1). A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo de Medrano *et al.* (1990) que utiliza precipitação com sal. Para a amplificação de um segmento do gene Citocromo b do DNA mitocondrial, foram utilizados os primers MVZ05 e MVZ16 (SMITH & PATTON, 1993). As Reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tiveram um volume final de 20 µl contendo de 30-60 ng/ µl de DNA. 125 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x, 0,2 µM de cada primer, 2,0 µM de MgCl₂ e 1,5 U da enzima Taq polimerase. As amplificações foram realizadas em um termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos (min), seguido de 1 minuto a 94°C, 45s à 48°C temperatura de hibridização dos primers, 1 minuto de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos em um total de 36 ciclos. O resultado da PCR foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e posteriormente visualizado em transiluminador ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit de Purificação Wizard/Promega seguindo o protocolo e recomendações do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o

sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

As seqüências de DNA mitocondrial foram visualmente verificadas e corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013), posteriormente alinhadas através do CLUSTAW/MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). O índice de saturação das seqüências foi investigado através do Programa Dambe 5 (XIA, 2013), e de acordo com os resultados obtidos, a terceira posição dos códons foi excluída das análises subsequentes. Ainda utilizando esse programa e escolhendo o método de Máxima Verossimilhança, foi avaliado o melhor modelo evolutivo (TN93) e construída de uma árvore filogenética. Para essas análises, utilizamos as sequencias geradas no presente estudo inserindo também oito seqüências do Genbank e uma seqüência de *Trichomys apereoides* como outgroup.

Índices de diversidade foram calculados através do Programa DNA sp v.5 (LIBRADO & ROZAS, 2009) e distância genéticas (Kimura-2p) foram obtidas pelo programa MEGA 6.0. Para essas últimas análises consideramos tanto o total das amostras obtidas quanto os grupamentos inferidos a partir da árvore filogenética. Para as sequencias indicadas como pertencentes a *Proechimys roberti*, uma rede de haplótipos foi construídas no programa Network 4.6.1.0(<http://fluxus-engineering.com>). Para essa espécie foi calculado o índices de estruturação populacional F_{st} utilizando o programa Arlequin ver 3.5 (EXCOFFIER & HELL, 2010) reunindo os pontos de amostragem em grupos regionais para o Maranhão (São Luis, Parnarama, Capinzal do Norte, Tasso Fragoso, Bacabal, São Pedro da Água Branca e Mirador) para o Tocantins (Peixe, Araguatins, Sampaio, Caseara) para o Mato Grosso (Cristalino) para o Pará com dois grupamentos (Marabá) e (Tapajós) também utilizado para realizar o Teste de Mantel.

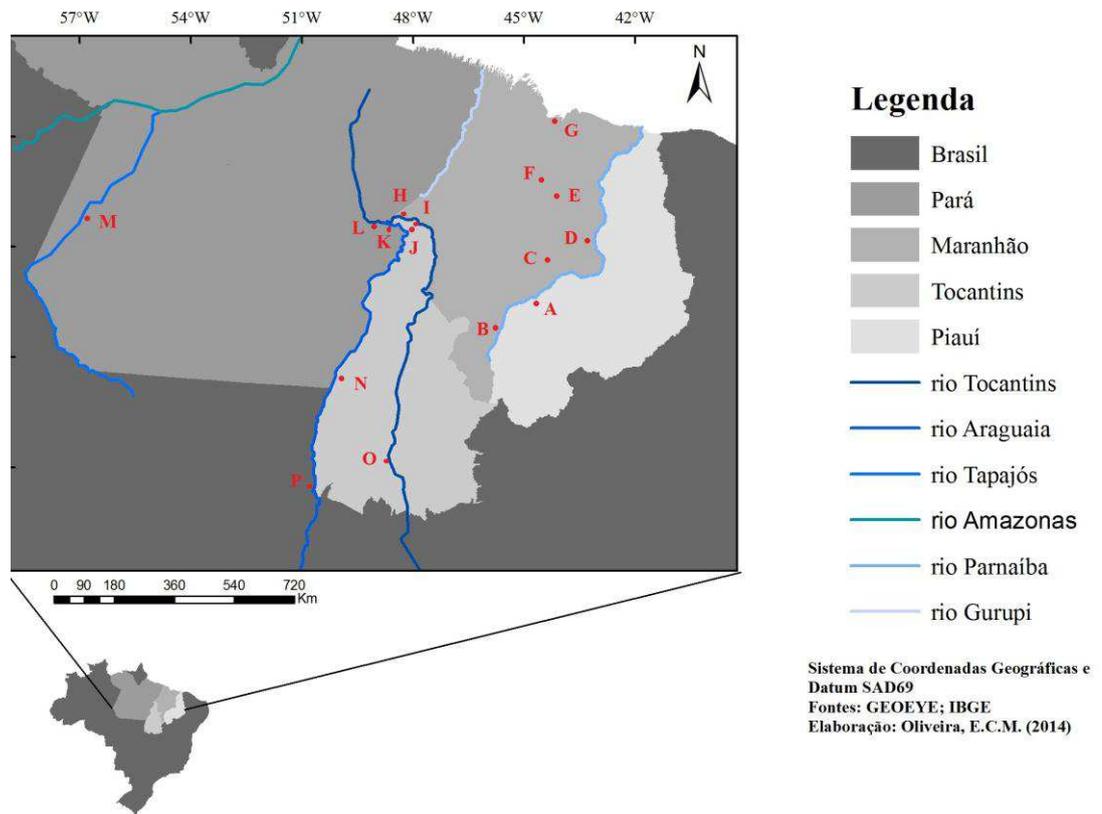


Figura1. Mapa indicando os pontos de coleta dos animais utilizados no presente estudo.

Tabela 1. Origem geográfica dos haplótipos definidos por um fragmento de 544pb do gene do citocromo b do DNA mitocondrial de *Proechimys* e número de espécime por haplótipo (N)

Haplotipo	Origem	N
Hap_1	Uruçuí –PI (A)	1
Hap_2	Uruçuí (A) São Pedro da Água Branca-MA (H)	2
Hap_3	Capinzal do Norte-MA(E) Marabá-PA(L)	2
Hap_4	São João do Araguaia-PA(K)	2
Hap_5	Marabá-PA(L)	1
Hap_6	Araguatins-TO(J)	1
Hap_7	Sampaio-TO(I)	3
Hap_8	Capinzal do Norte-MA(E) Marabá-PA(M)	2
Hap_9	Araguatins-TO(J) Marabá-PA(L)	4
Hap_10	Tapajós(M)	5

Hap_11	Marabá-PA(L)	1
Hap_12	Marabá-PA(L)	1
Hap_13	São Luis –MA(G)	1
Hap_14	São Luis –MA(G)	1
Hap_15	Tapajós(M)	1
Hap_16	Tapajós(M)	1
Hap_17	Tapajós(M)	3
Hap_18	Tapajós(M)	1
Hap_19	Tapajós(M)	2
Hap_20	Tapajós(M)	1
Hap_21	Tapajós(M)	4
Hap_22	Tapajós(M)	1
Hap_23	Tapajós(M)	1
Hap_24	Tapajós(M)	1
Hap_25	Tapajós(M)	1
Hap_26	Tapajós(M)	1
Hap_27	Tapajós(M)	1
Hap_28	Bacabal-MA(F)	1
Hap_29	Tasso Fragoso-MA(B)	1
Hap_30	Bacabal-MA(F)	1
Hap_31	Bacabal-MA(F)	1
Hap_32	Bacabal-MA(F)	1
Hap_33	Parnarama-MA(D)	1
Hap_34	Capinzal do Norte-MA(E)	1
Hap_35	Mirador-MA(C)	1
Hap_36	Reserva Ecológica Cristalino-MT(P)	1
Hap_37	Peixe-TO(O)	1
Hap_38	Caseara-TO(N)	1
<i>Proechimys simonsi</i>	Nouragues-Guiana Francesa (EU313250.1)	1
<i>Proechimys cuvieri</i>	Genbank (AJ251402.1)	1
<i>Proechimys roberti</i> (H_41)	Vila Rica MT Genbank (EU544666.1)	1
<i>Thrichomys apereoides</i>	Genbank (AY083338.1)	1
<i>Proechimys guyannensis</i> (H_45)	Macouria-Guiana Francesa (AJ251399.1)	1
<i>Proechimys quadruplicatus</i>	Venezuela Genbank (AF308435.1)	1
<i>Proechimys longicaudatus</i>	Genbank (HM544128.1)	1
<i>Proechimys cayennensis</i>	Genbank (AJ251396.1)	1
<i>Proechimys cuvieri</i>	Genbank (AJ251400)	1

Resultados

Obtivemos 57 amostras de tecido de diferentes indivíduos de *Proechimys* (Tabela 1). O fragmento amplificado resultou em uma sequência com 544pb, apresentando 157 sítios variáveis e 147 sítios informativos para a para parcimônia.

Essas sequencias foram agrupadas em 38 haplótipos diferentes, apresentando diversidade nucleotídica π de 0,08261 e diversidade haplotípica Hd de 0,979. A árvore filogenética construída não foi capaz de elucidar as relações evolutivas entre as espécies, porém, observou-se a formação de cinco linhagens bem apoiadas que são mostradas na Figura 2. A partir da árvore gerada as seguintes observações são possíveis: i) um dos cladogramas apresenta forte apoio no agrupamento com uma das sequências incluídas a partir do Genbank, correspondendo a *P. roberti*; ii) Os haplótipos do grupo II e III foram agrupados próximos a *P. cuvieri* e *P. guyanenses* respectivamente, embora não haja forte apoio para esse agrupamento; iii) Entre as sequencias incluídas do Genbank nenhuma mostrou agrupamento com os cladogramas IV e V. Considerando os cladogramas apontados pela filogenia, análises de diversidade genética e distâncias foram realizadas, mostrando valores de diversidade de π 0,00401 a 0,03787 e Hd de 0,524 a 1,000 para as linhagens e são mostradas na Tabelas 2. As distâncias genéticas obtidas quando considerados as linhagens principais da árvore filogenética variou de 12,4% a 15,9% (Tabela 3). Já quando considerados os ramos terminais os valores de distância foram estimados em 3,3% a 6,5% para a comparação [Grupo *P. roberti* a] [*P. roberti* b] [Grupo *P. roberti* c]; em 10% para [Grupo II] [*P. cuvieri*]; e em 12% para [Grupo III] [*P. guyannensis*].

A rede de haplotipos construída para as sequencias de *Proechimys roberti* indicou uma forte estruturação genética entre os haplótipos da região da Bacia do Rio Tapajós e o restante da área amostrada, havendo para as demais regiões indícios de um padrão de isolamento pela distância (Fig 3). Tais observações foram confirmadas pelos altos valores de F_{st} observados para a população do Tapajós (Tabela 4) em relação às demais, bem como pela significância do Teste de Mantel que apresentou coeficiente de correlação de 0.17 e $p = 0,14$.

Tabela 2. Índices de diversidade π e HD para as diferentes linhagens de *Proechimys* inferidas pela análise filogenética a partir de um fragmento de 544pb do citocromo b do DNA mitocondrial.

Linhagem	π	HD
Grupo roberti	0,02657	0,975
Grupo II	0,00401	0,524
Grupo III	0,01413	0,750
Grupo IV	0,00490	1,000
Grupo V	0,03787	0,900

Tabela 3. Tabela das distâncias genética (Kimura-2p) inferidas a partir de um fragmento de 544pb do citocromo b do DNA mitocondrial considerando as principais linhagens evolutivas amostradas no presente estudo.

	<i>P. roberti</i>	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Grupo II	0,134			
Grupo III	0,146	0,145		
Grupo IV	0,136	0,141	0,139	
Grupo V	0,124	0,130	0,159	0,127

Tabela 4. Matriz de estruturação genética (Fst) no Grupo *P. roberti* entre seis regiões 1- Tapajos; 2- Maranhão; 3- Piauí; 4- Tocantins; 5- Mato Grosso e 6- Marabá. Os valores em negritosão significantes (P=0,05).

	1	2	3	4	5	6
1	-					
2	0.81165*	-				
3	0.93684*	0.19968	-			
4	0.95407*	0.31071	0.85047	-		
5	0.91781	0.75820	0.92593*	0.95354*	-	
6	0.79310*	0.09165	0.37275	0.07703	0.69783	-

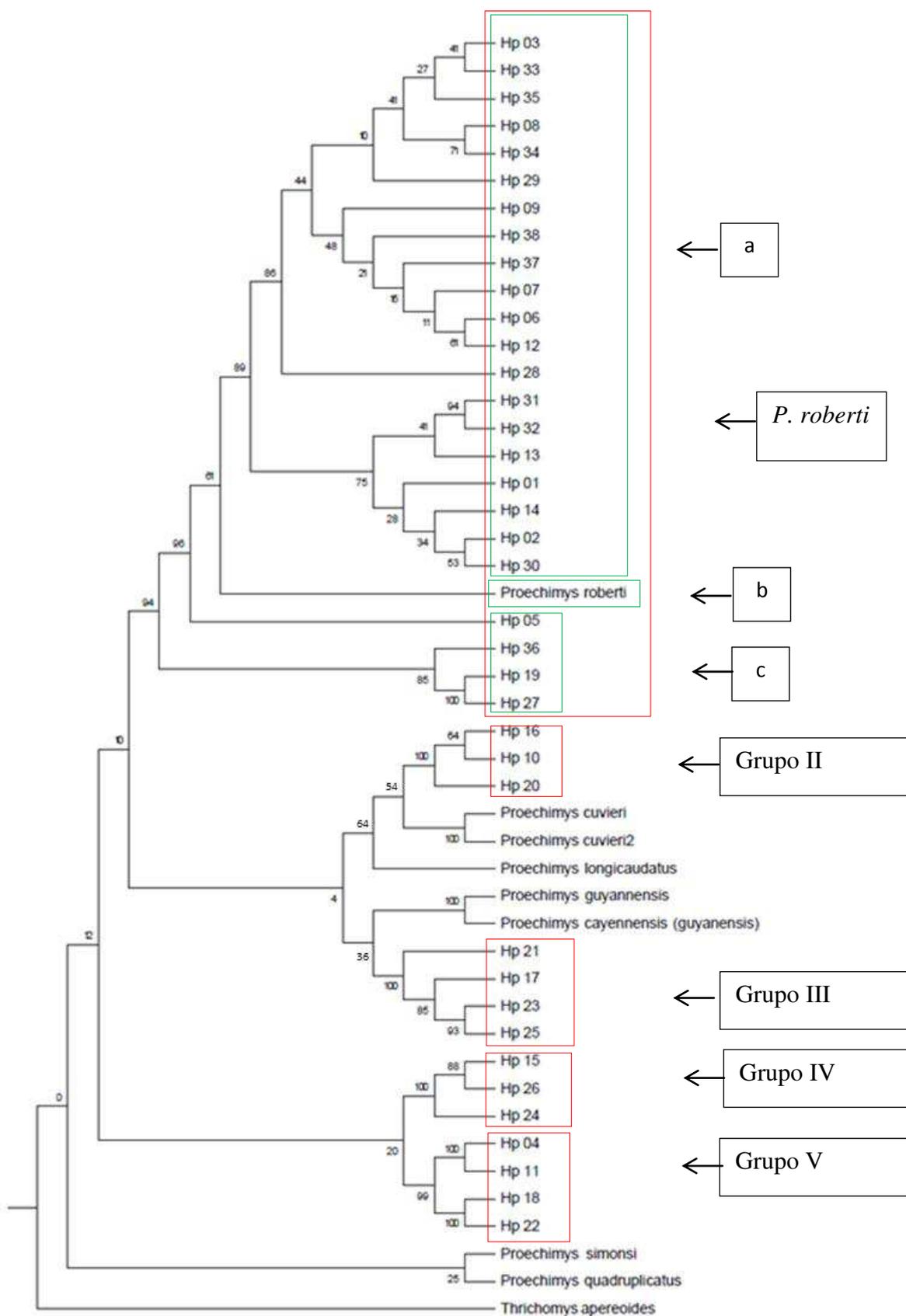


Fig 2. Árvore filogenética obtidas através da análise pelo método de Máxima Verossimilhança de um fragmento de 544 pb do gene citocromo b do DNA mitocondrial (os números em cada ramo referem-se aos valores de *bootstrap* – 1000 réplicas) de indivíduos de *Proechimys*. Uma sequência *Trichomys apereoides* foi inserido como grupo externo.

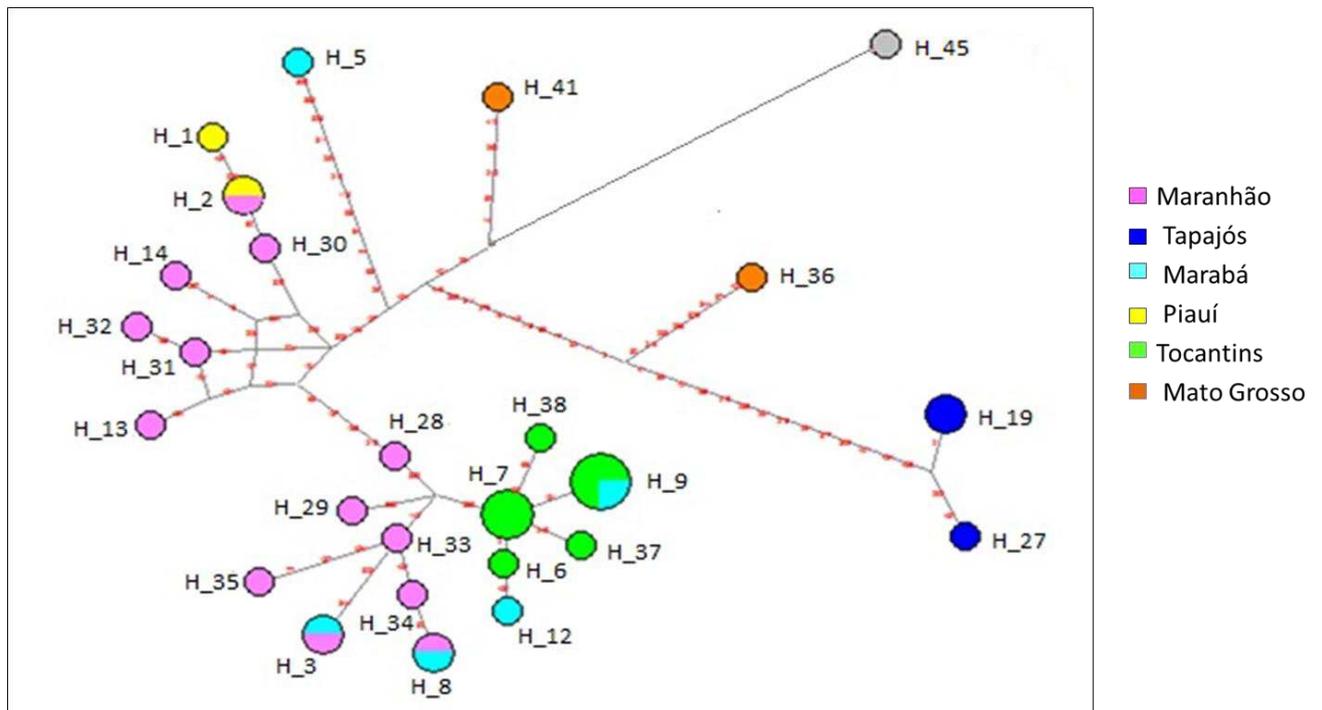


Figura 3. Rede de haplótipos (median joining) gerada a partir de um fragmento de 544 pb do citocromo b do DNA mitocondrial de *Proechimys roberti*. Uma sequência de *Proechimys longicaudatus* foi inserida como outgroup e está anotada pelo H_45, separado por 42 passos mutacionais.

Discussão

Proechimys é um dos mais especiosos gêneros de mamíferos e a origem de suas espécies bem como as suas relações carecem ainda de esclarecimento. A ausência de informação quanto ao posicionamento dos ramos basais na filogenia do gênero, mostrada pela árvore filogenética gerada no presente estudo, foi também encontrada nos trabalhos de da Silva (1998) e Schetino (2008), tanto para o gene citocromo b como para o gene Citocromo Oxidases C subunidade I (COI). Os dois trabalhos, porém indicam que o citocromo b mostra fortes apoios para os ramos mais recentes, descrevendo muito bem a relação intraespecífica, como obtido em nosso estudo.

Neste mesmo sentido, analisando sequências de 7 espécies de *Proechimys*, Leite (2013) obteve uma filogenia baseada em 5672 pares de bases, incluindo sequências de DNA mitocondrial e nuclear. A análise mostrou-se consistente, e indicou que alguns

dos grupos propostos por Patton (1987) não encontram apoio filogenético, como por exemplo a inclusão de *P. roberti* no grupo *guyanensis*. Neste último estudo o pequeno número de espécies incluídas não possibilitou inferências completas para o gênero.

Um número maior de espécies, quinze, foi abordado no trabalho de Schetino (2008) que obteve uma linhagem genética não agrupada à sequências de nenhuma espécie com ocorrência já descrita para sua área de estudo. Essa foi considerada a indicação de uma nova espécie relacionada a *P. goeldi* na Bacia do Rio Madeira. Para essa afirmação, o autor considerou as distâncias genéticas que descreveu entre as espécies estudadas, da ordem de 9-12%, valores também descritos por da Silva (1998), Weksler (2001) e Leite (2013) para o DNAm.

Adotando esses valores de distância genética como diagnóstico para espécies de *Proechimys*, podemos considerar que as linhagens amostradas correspondem a 5 diferentes espécies, e observar: i) a primeira espécie é *P. roberti* (distância de 12,4%-14,6% para as demais) que apresentou duas linhagens intraespecíficas, uma restrita a área do Tapajós (distância de 6,5% entre as linhagens); ii) o pertencimento do Grupo II (que tem os menores índices de diversidades entre os grupos) a espécie *P. cuvieri* não pode ser afirmado, visto que não há sustentação filogenética (baixos valores de bootstrap) e os valores de distâncias entre eles (9%) estão no limite inferior da distância interespecífica considerada; iii) o grupo III aparece como um ramo consistente, porém sem relação apoiada com as espécies inseridas a partir do Genbank, sua relação com *P. guyanensis* não se confirma, uma vez que esta espécie é restrita ao Norte da Bacia Amazônica e distou em 12% do Grupo III; iv) também não foram identificadas as espécies correspondentes ao grupo VI e V, que indicam pertencer a duas espécies diferentes, distantes em 12% entre si; v) no caso do Grupo III um dos haplótipos (H21) é compartilhado por todos os animais coletados em uma ilha do Rio Tapajós (ver Figura 1) indicando um possível efeito fundador.

De acordo com a distribuição dos haplótipos, é preciso observar que *P. roberti* foi amostrado desde o Tapajós até o Parnaíba, área condizente com seu registro de ocorrência (LEITE & ROGERS, 2013). O Grupo V ocorreu desde a margem leste do Tapajós até à margem esquerda do Araguaia-Tocantins. As demais espécies só foram coletadas na área do Rio Tapajós, para a qual a literatura registra, além de *P. roberti*, também *P. cuvieri* e *P. goeldi*. Sequências de vouchers dessas últimas espécies não estão disponíveis, e sua inclusão poderia resolver a classificação de um dos clados encontrados em nossa análise filogenética, mas mesmo nesse cenário as demais

linhagens indicariam o registro de novas espécies ou a extensão do registro de distribuição para espécies conhecidas.

Estudos futuros poderão adicionar mais informações e esclarecer melhor essas relações, porém fica evidenciada a alta diversidade do Médio Tapajós, que tem sido indicada por trabalhos como de Moraes-Barros *et al.* (2007) para *Bradypus variegatus* (Mammalia) observando uma linhagem exclusiva dessa região; Fernandes *et al.* (2013) para *Glyphorynchus spirurus* (Aves) que relatou também linhagens evolutivas independentes na área em questão. Ainda Da Silva (2005) descreve oito regiões de endemismo na Amazônia para vertebrados, sendo a região do Tapajós uma dessas áreas.

Quanto a simpatria entre as espécies, esta é comum para o gênero *Proechimys*, para o qual já foi descrita a ocorrência de até quatro espécies simpátricas, como o caso de *P. goeldii*, *P. cuvieri*, *P. simonsi* e *P. longicaudatus*. Dessa forma torna-se complicada a identificação específica somente com dados morfológicos, pois espécies crípticas com ocorrência em uma mesma região podem ser desconsideradas, subestimando a diversidade existente (GARDNER & EMMONS , 1984; PATTON, 1987; DA SILVA & PATTON, 1998; PATTON, 2000).

A elevada diversidade intraespecífica apontada para *Proechimys roberti* em trabalhos baseados em dados morfométricos, cariotípicos e moleculares foi confirmada pela nossa amostragem. Weskler *et al.*, (2001) encontrou alta diferenciação morfométrica para espécimes coletados na Amazônia e no Cerrado. Grupos cariotípicos divergentes relacionados as áreas geográficas são relatados por Machado *et al.*, (2005), com a descrição de três citótipos (dois para a região do Mato Grosso e um para o Tocantins), indicando o Rio Xingu como barreira histórica na diferenciação desses dois citótipos.

Leite e Rogers (2013) através do DNAm (Cit b) indicam a formação de três clados para *P. roberti*, que diferenciaram-se no Plioceno Tardio, quando os Rios Tapajós, Xingu, Araguaia-Tocantins tomaram seu curso atual. Estes teriam servido como barreira para as populações e diferenciações posteriores teriam também acontecido, segundo o autor, devido a eventos de erosão que formaram áreas de plateau e depressão em algumas bacias. A efetividade dos rios como barreiras seria assim mostrada para *P. roberti*, como já indicada para outros táxons (HAYERS & SEWLAL 2004, EIZIRIK *et al.*, 2001; FERNANDES, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

No presente estudo a grande divergência entre a Bacia do Tapajós e as demais regiões foi também evidenciada, porém não se confirma a efetividade dos Rios

Araguaia – Tocantins e Parnaíba como barreiras entre populações, uma vez que se apresentam haplótipos compartilhados entre suas margens. A distribuição geográfica dos haplótipos, no entanto, reproduz o padrão de isolamento pela distância, amplamente descrito para roedores (ex. ROCHA *et al.*, 2014; VISSER *et al.*, 2014).

Conclusão

A variação genética observada para *Proechimys* da região de transição entre os domínios sudeste da Amazônia e norte do Cerrado confirma a alta diversidade do grupo e chama atenção para a necessidade de considerar a diversidade críptica existente nos mais diversos grupos, especialmente na área de estudo, que apresenta altos índices de diversidade biológica.

REFERENCIAS

AB'SABER, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia**, v.53, p.1-23.

BONVICINO, C. R ;OLIVEIRA, J. A.; D´ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil: Com chave para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. p. 102-103.

DA SILVA, M. N. F. Four new species of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia:Echimyidae) from the Western Amazon of Brasil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. v. 111, n.2, p. 436-471, 1998.

DA SILVA, M. N. F.; PATTON, J. L. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals.**Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 475-486, 1998

DA SILVA, J. O. S. É. et al. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 689-694, 2005.

ELER, E. S ;DA SILVA, M. N. F.; SILVA, C. E. F.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p. 830-846, 2012.

EIZERIK, E.; KIM, J. H.; MENOTTI-RAYMOND, M.; CRAWSHAW JR., P. G.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v. 10, n. 1, p. 65-79, 2001.

EXCOFFIER, L. & HEL L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: Uma nova série de programas para executar analisa a genética da população em Linux e Windows. **Moleculares Recursos ecologia**. 10: 564-567.

FERNADES, F. A. Filogeografia de *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae). 2008. 185f. **Tese** (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

- FERNANDES, A. M. et al. Multilocus phylogeography of the Wedge-billed Woodcreeper *Glyphorhynchus spirurus* (Aves, Furnariidae) in lowland Amazonia: Widespread cryptic diversity and paraphyly reveal a complex diversification pattern. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 66, n. 1, p. 270-282, 2013.
- FORGET, P. M. Scatterhoarding of *Astrocaryum paramaca* by *Proechimys* in French Guiana: Comparison with *Myoprocta exilis*. **Tropical Ecology**, v.32, n. 2, p. 155-167, 1991.
- GARDNER, A. L.; EMMONS, L. H. Species groups in *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) as indicated by karyology and bullar morphology. **Journal of Mammalogy**, p. 10-25, 1984
- HAYES, F.E.; SEWLAL, J. N. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. **Journal of Biogeography**, v.31, n.11, p. 1809–1818, 2004.
- LEITE, R. do N.. Biogeography and Evolution of Neotropical Small Mammals, with Emphasis on Hystricognath Spiny Rats of the Genus *Proechimys* (Family Echimyidae). 2013.
- LEITE, R. N.; ROGERS, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 13, n. 4, p. 639-664, 2013.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p.1451-1452, 2009.
- MACHADO, T.; SILVA, M. J. J.; LEAL-MESQUITA, R. E.; CARMIGNOTTO, A. P.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Nine karyomorphs for spiny rats of the genus *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from North and Central Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 682-692, 2005.
- MEDRANO, J. F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA Extraction from Nucleated Red Blood Cells. **Biotechniques**, v.8, n.1, p. 43, 1990.

MORAES-BARROS, N.; MIYAKI, C. Y.; MORGANTE, J. S. Identifying management units in non-endangered species: the example of the sloth *Bradypus variegatus* Schinz, 1825. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 829-837, 2007.

NASCIMENTO, F.F.; PEREIRA, L. G.; BEZERRA, L. G. A. M. R.; D'ANDREA, P. S.; BONVICINO, C.R. Colonization Process of the Brazilian Common Vesper Mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): A Biogeographic Hypothesis. **Journal of Heredity**, v. 102, n. 3, p.260–268, 2011.

PATTON, J. L. Species groups of spiny rats, genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). In: PATTERSON, B. D.; TIMM, R. M. Studies in Neotropical mammalogy. **Fieldiana Zoology**, v.39, 1987. p. 305-345.

_____; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and Ecological Diversification of Amazônia. **American Museum of Natural History**, n. 244, p.1-306, 2000.

_____; LEITE, R. N. . Genus *Proechimys*. In: Patton, J. L.; Pardiñas, U. F. J.; D'Elía, G.. (Org.). **Mammals of South America**, Volume 2: Rodents. 1ed.Chicago: University of Chicago Press, 2015, v. , p. 950-988.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2ed. Londrina: [s.n.], 2011. 439p.

ROCHA, R. G. et al. Seasonal flooding regime and ecological traits influence genetic structure of two small rodents. **Ecology and evolution**, v. 4, n. 24, p. 4598-4608, 2014.

SHETINO, M. A. A. Código de barras de DNA em espécies de *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) da Amazônia. 2008. 82 f. **Dissertação** (mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2008.

SMITH, M. F. E J. L. PATTON. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.50, n. 3, p.149–177, 1993.

TAMURA K, S. G, PETERSON D, F.. A, and KUMAR S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729.

VILELA, R. do V. Roedores e biomas neotropicais: estudos evolutivos e comparativos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.2010.

VISSER, J. H.; BENNETT, N. C.; VAN VUUREN, B. J. Local and regional scale genetic variation in the Cape dune mole-rat, *Bathyergus suillus*. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107226, 2014.

WEKLER, M.; BONVICINO, C. R.; OTAZU, I. B.; JÚNIOR, J. S. S. Status of *Proechimys robert* and *P. oris* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) from eastern Amazonia and Central Brasil. **Journal of Mammalogy**, v.82, n. 1, p.109–122, 2001.

XIA, X.. DAMBE5: Um pacote de software abrangente para análise de dados em biologia molecular e evolução. **Biologia Molecular e Evolução** 30: 1720-1728. 2013.