

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**UMA ABORDAGEM MOLECULAR NA
ANÁLISE DA FILOGENIA E DA
FILOGEOGRAFIA DOS ROEDORES
AKODONTINOS DO NEOTRÓPICO**

Martin Alejandro Montes

Tese submetida ao programa
de Pós-graduação em Genética
e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências

Orientadora: Margarete Suñe Mattevi

Porto Alegre, Agosto de 2007

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. A Tribo Akodontini: mais de 200 anos de história.....	1
1.2. A tribo Akodontini.....	3
1.3. Classificação dentro da tribo Akodontini.....	4
1.4. Estudos filogenéticos na tribo Akodontini.....	6
1.4.1 Estudos cromossômicos.....	6
1.4.2 Estudos paleontológicos e distribucionais.....	13
1.4.3 Estudos morfológicos.....	17
1.4.4 Estudos de alozimas.....	21
1.4.5. Estudo de seqüências de genes mitocondriais e nucleares.....	22
OBJETIVOS.....	26

CAPÍTULO 2

Phylogeny and temporal diversification of the neotropical rodent genus <i>Akodon</i> : Inferences from mitochondrial and nuclear DNA sequences data.....	27
---	----

CAPÍTULO 3

DNA sequences analysis and the phylogeographical history of the rodents <i>Deltamys kemp</i> (Sigmodontinae) in the Atlantic Coastal Plain of South Brazil, Uruguay and Argentina.....	71
--	----

CAPÍTULO 4

Filogeografia, tempo de divergência e limites entre espécies de roedores akodontinos de ocorrência na Mata Atlântica.....	102
---	-----

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO.....	136
RESUMO.....	152
ABSTRACT.....	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Tribo Akodontini: mais de 200 anos de história

A história da tribo Akodontini começou a ser escrita por Felix de Azara em 1801 quando este pesquisador descreveu “RAT CINQUIÈME OU RAT ROUX”. Um ano mais tarde, Azara (1802), denominou esta espécie de Hociúdo e, posteriormente, Desmarest (1819) a identificou como *Mus rufus*. Em 1802, Azara iniciou o estudo do gênero *Akodon* com a descrição de Agreste, a qual, anos mais tarde, foi nomeada de *Mus azaræ* por Fischer (1829).

Em 1826, outro representante da tribo Akodontini foi descrito por Wied (1826), *Hypudæus dasytrichus*. Um ano depois, Lichtenstein (1827) descreveu *Mus (Thaptomys) nigrita*. Finalmente, ou melhor, dando início a uma longa história, Meyen (1832) descreveu *Akodon boliviensis*, estabelecendo o gênero *Akodon*.

Outros gêneros da tribo Akodontini foram sendo descritos. Waterhouse (1837) propôs o gênero *Oxymycterus*, incluindo *O. nasutus*. No mesmo ano, o autor descreveu *Mus tumidus*, a espécie tipo do gênero *Scapteromys*. Outro gênero, *Blarinomys*, foi estabelecido por Thomas (1896), a partir de espécimes coletados por Goeldi perto do Rio de Janeiro. Estes mesmos indivíduos haviam sido identificados como *Oxymycterus breviceps*, uma espécie descrita alguns anos antes por Winge (1887) a partir de material fóssil proveniente de Lagoa Santa (Minas Gerais, Brasil). Thomas (1909) estabeleceu o gênero *Lenoxus* com *Oxymycterus apicalis* descrito por Allen (1900) como espécie tipo. Lund (1841) descreveu *Mus lasiotis*, mais tarde reclassificada como *Thalpomys lasiotis* por Thomas (1916). O gênero *Bolomys* foi estabelecido por Thomas (1916), incluindo *Akodon amœnus* (Thomas 1900) como espécie tipo. Em 1909, Thomas descreveu o gênero *Microxus* com *Oxymycterus mimus* (Thomas 1901) como espécie tipo.

Thomas (1916), agrupou várias espécies dentro de sete gêneros (*Akodon*, *Thalpomys*, *Thaptomys*, *Bolomys*, *Chroeomys*, *Abrothrix* e *Zygodontomys*). Thomas (1917) descreveu o gênero *Deltamys*, com *D. kempi* como espécie tipo e, um ano depois, Thomas (1918), o gênero *Hypsimys*, com *H. budini* como espécie tipo.

Osgood (1925) realizou a primeira revisão dos agrupamentos de espécies em gêneros estabelecidos por Thomas (1916), adicionando *Notiomys* (composto por *Notiomys*, *Chelemys* e *Geoxus*). Thomas (1927) alterou os agrupamentos definidos por Osgood (1925), elevando *Chelemys* e *Geoxus* à categoria de gênero. Anthony (1929) descreveu o gênero *Podoxymys* com o tipo *P. roraimæ*.

Tate (1932) revisou toda a informação acerca dos akodontinos, introduzindo o termo roedores akodontinos. Este mesmo autor elevou à categoria de gênero todos os grupos supraespecíficos reconhecidos por Thomas (1927), incluindo *Notiomys* e retirando dos roedores akodontinos o gênero *Zygodontomys*.

Gyldenslope (1932) não reconheceu os roedores akodontinos como um grupo separado dos “sigmodont rodent” (atualmente eqüivalente à subfamília Sigmodontinae estabelecida por Reig 1987), mas validou e definiu todas as categorias genéricas de Thomas (1927).

Ellerman (1941) alterou para a categoria de subgênero todos os gêneros de Thomas (1927) e os agrupou dentro do gênero *Akodon*, mas manteve *Microxus*, *Oxymycterus*, *Lenoxus* e *Notiomys* (composto por *Notiomys*, *Chelemys* e *Geoxus*) como gêneros, excluindo *Zygodontomys*.

Vorontzov (1959) utilizou pela primeira vez o nome Akodontini para a tribo composta por *Akodon* (de acordo com Ellerman 1941), *Notiomys*, *Microxus*, *Podoxomys*, *Lenoxus*, *Oxymycterus*, *Blarinomys* e *Zygodontomys*. O gênero *Zygodontomys* voltou a ser retirado do grupo de roedores akodontinos por Hershkovitz (1962).

Hooper e Musser (1964), através de estudos comparativos da morfologia do falo entre os gêneros, observaram diferenças nesta estrutura em *Oxymycterus*, o que levou estes autores a propor que este gênero não pertenceria ao grupo dos *Akodon*, mas a um grupo muito relacionado com este

último. Sobre a correta posição taxonômica de *Oxymycterus*, estudos das especializações do estômago e intestino para uma dieta insetívora (Echeve Llanos e Vilchez 1964; Vorontzov 1967; Carleton 1973) têm ajudado a aceitar a separação proposta mas, de acordo com Reig (1987), as especializações estomacais de *Oxymycterus* poderiam representar uma autopomorfia exclusiva.

Moojen (1965) descreveu o gênero *Juscelinomys*, com *J. candango* como espécie tipo. Um ano mais tarde, Hershkovitz (1966) estabeleceu o gênero *Kunsia* com *Mus tomentosus* (Lichtenstein, 1830) como espécie tipo. Posteriormente, Massoia e Fornes (1967) descreveram o gênero *Cabreramys*. Anos mais tarde, Reig (1978) descreveu um gênero fóssil (*Dankomys*) dentro da tribo Akodontini, o qual estaria relacionado, de acordo com este autor, com *Bolomys*. Massoia (1979) descreveu *Bibimys* como um novo gênero, com *B. tonesi* como espécie tipo. Maia e Langguth (1981) demonstraram que *Cabreramys* é um sinônimo junior de *Bolomys*. No entanto, Massoia (1982), descreveu *Cabreramys (Bolomys) temchuki*. Massoia (1985) publicou a sinonímia entre o fóssil *Necromys conifer* (Ameghino, 1889) com as espécies atuais do gênero *Bolomys* e, dez anos mais tarde, Massoia e Pardiñas (1993) renomearam as espécies do gênero *Bolomys* como *Necromys*. Finalmente, Hershkovitz (1998) descreveu o gênero *Brucepattersonius*, com *B. soricinus* como espécie tipo.

Todas as espécies anteriores fazem ou fizeram parte da tribo Akodontini, tribo muito numerosa em quantidade de gêneros e espécies e talvez a que mais tem sofrido mudanças taxonômicas ao longo de sua história, principalmente com o avanço das técnicas de biologia molecular.

1.2. A tribo Akodontini

O primeiro a utilizar a organização em tribos para a família Sigmodontinae foi Vorontzov (1959), o qual cunhou pela primeira vez o nome Akodontini. Reig (1980, 1984, 1986, 1987) definiu os membros da tribo Akodontini como roedores cricetídeos sigmodontinos, de tamanho pequeno a médio, com um sistema digestivo omnívoro ou insetívoro (sem especializações para se alimentar de vegetais), estômago unilocular-hemiglandular

(excepcionalmente unilocular-discoglândular), intestino grosso curto, (normalmente menor que 15% do comprimento do intestino delgado), cecos (pilóricos) pequenos ou ausente (nunca compridos), dentes molares subhypsodontos ou mesodontos (raramente braquiodontos), crânio com placa zigomática pequena (ou com desenvolvimento moderado, nunca grandemente desenvolvida), palato largo, forâmem incisivo normalmente comprido, glândulas prepuciais comumente simples (a próstata ventral medial é reduzida ou ausente), apresentando um baculum complexo e cariótipo constituído por no máximo 54 cromossomos.

Reig (1984) concluiu que os Akodontini apresentam distribuição predominantemente andina, habitando principalmente regiões abertas; no entanto, algumas espécies são tipicamente de florestas tropicais e subtropicais e outras são encontradas também em ambientes temperados. Alguns gêneros têm hábitos subterrâneos (*Blarinomys*, *Chelemys*, *Geoxus* e *Notiomys*).

Quanto a alimentação, a maioria das espécies é omnívora (Meserve 1981, Meserve e Glanz 1978, Pearson 1983), mas *Oxymycterus* (Kravetz 1973), *Notiomys* e *Geoxus* (Pearson 1983, 1984) são mais especializadas para uma dieta insetívora. *Chelemys* se alimenta principalmente de cogumelos e *Bolomys* é vegetariano parcial (Reig 1987)

A tribo Akodontini pertence à ordem Rodentia, superfamília Muroidea, família Cricetidae e subfamília Sigmodontinae. Como expressado anteriormente, o primeiro autor a estabelecer a noção de tribos dentro da subfamília Sigmodontinae foi Vorontsov (1959), já Reig (1980, 1984, 1986) definiu as espécies incluídas em cada uma das tribos da subfamília Sigmodontinae. Atualmente, são reconhecidas oito tribos dentro da subfamília Sigmodontinae (Akodontini, Abhothricine ou Clado Andino, Thomasomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Ichthyomyini, Wiedomyini, Sigmodontini), além de cinco gêneros classificados como linhas únicas adicionais e outros cinco classificados como *incertae sedis* (Smith e Patton 1999).

1.3. Classificação dos Akodontini

A tribo Akodontini de acordo com Musser e Carleton (2005) estaria formada por 19 gêneros e 105 espécies, vale ressaltar que estes valores

incluem o “Clado Andino” ou tribo Abhothricine (Smith e Patton 1999), que por análises moleculares (Smith e Patton 1999; D’Elia et al. 2003) não faria parte desta tribo, nem teria uma relação filogenética próxima. A Tabela 1 apresenta a composição da tribo Akodontini utilizada por diferentes pesquisadores, demonstrando como a classificação desta tribo tem sofrido grandes mudanças, principalmente com o surgimento de novas tecnologias empregadas em seu estudo.

Tabela 1. Classificação da Tribo Akodontini por diferentes autores.

Reig 1981	Reig 1984, 1986	McKenna e Bell 1997	Smith e Patton 1999	Musser e Carleton 2005
Akodontini	Akodontini	Akodontini	Akodontini	Akodontini
<i>Akodon</i>	<i>Akodon</i>	<i>Abhothrix</i>	<i>Akodon</i>	<i>Abhothrix</i>
<i>Bolomys</i>	<i>Bolomys</i>	<i>Akodon</i>	<i>Bibimys</i>	<i>Akodon</i>
<i>Blarinomys</i>	<i>Blarinomys</i>	<i>Bolomys</i>	<i>Blarinomys</i>	<i>Bibimys</i>
<i>Chelemys</i>	<i>Chelemys</i>	<i>Blarinomys</i>	<i>Bolomys</i>	<i>Blarinomys</i>
<i>Lenoxus</i>	<i>Juscelinomys</i>	<i>Chelemys</i>	<i>Brucepattersonius</i>	<i>Brucepattersonius</i>
<i>Microxus</i>	<i>Lenoxus</i>	<i>Chroeomys</i>	<i>Juscelinomys</i>	<i>Chelemys</i>
<i>Notiomys</i>	<i>Microxus</i>	<i>Geoxus</i>	<i>Kunsia</i>	<i>Deltamys</i>
<i>Oxymycterus</i>	<i>Notiomys</i>	<i>Juscelinomys</i>	<i>Lenoxus</i>	<i>Geoxus</i>
<i>Podoxymys</i>	<i>Oxymycterus</i>	<i>Lenoxus</i>	<i>Oxymycterus</i>	<i>Juscelinomys</i>
	<i>Podoxymys</i>	<i>Microxus</i>	<i>Podoxymys</i>	<i>Kunsia</i>
		<i>Notiomys</i>	<i>Scapteromys</i>	<i>Lenoxus</i>
		<i>Oxymycterus</i>	<i>Thalpomys</i>	<i>Necromys</i>
		<i>Pearsonomys</i>	<i>Thaptomys</i>	<i>Notiomys</i>
		<i>Podoxymys</i>		<i>Oxymycterus</i>
		<i>Thalpomys</i>		<i>Pearsonomys</i>
				<i>Podoxymys</i>
				<i>Scapteromys</i>
				<i>Thalpomys</i>
				<i>Thaptomys</i>
Scapteromyini	Scapteromyini	Scapteromyini	Não reconhecida	Não reconhecida
<i>Bibimys</i>	<i>Bibimys</i>	<i>Bibimys</i>		
<i>Kunsia</i>	<i>Kunsia</i>	<i>Kunsia</i>		
<i>Scapteromys</i>	<i>Scapteromys</i>	<i>Scapteromys</i>		
Não reconhecida	Não reconhecida	Não reconhecida	“Abhothricine”	Não reconhecida
			<i>Abrothrix</i>	
			<i>Chelemys</i>	
			<i>Chroeomys</i>	
			<i>Geoxus</i>	
			<i>Notiomys</i>	
			<i>Pearsonomys</i>	

1.4. Estudos filogenéticos na tribo Akodontini

As relações filogenéticas dentro da tribo Akodontini e dentro de alguns dos gêneros que a constituem está baseada em cinco fontes de dados 1) cromossômicos, 2) paleontológicos e distribucionais, 3) morfológicos, 4) estudos de alozimas e 5) seqüências de genes mitocondriais e nucleares.

1.4.1 Estudos Cromossômicos

O primeiro trabalho de citogenética dentro da tribo Akodontini foi publicado por Bianchi e Contreras (1967). Estes autores estudaram *Akodon azarae* e descreveram um polimorfismo no par sexual ($2n=38$, XX, Xx e X0). Um ano mais tarde, Bianchi et al. (1968) descreveram a replicação dos cromossomos sexuais em *Akodon azarae*. Neste mesmo ano, Cestari e Imada (1968) publicaram o cariótipo de $2n=24$ para *A. arviculoides cursor*. Também neste ano, Reig e Kiblicky (1968) publicaram a primeira descrição do cariótipo de *A. uruchi*. Bianchi et al. (1969) estudaram o polimorfismo do par cromossômico 1 presente em *A. molinae* ($2n=42$, par 1 metacêntrico e $2n=43$ par 1 formado por um metacêntrico e dois subtelocêntricos, produtos de uma fusão cêntrica do par 1 e uma inversão pericêntrica).

O primeiro cariótipo para o gênero *Oxymycterus* foi descrito por Fronza (1970) para *O. rutilans platensis* ($2n=54$). Reig et al. (1971) identificaram o cariótipo de *A. uruchi venezuelensis* ($2n=18$) e descreveram um polimorfismo no cromossomo X em machos e fêmeas. A primeira menção ao provável compartilhamento do par cromossômico metacêntrico pequeno pelos *Akodon* foi referida neste mesmo estudo.

Bianchi et al. (1971) publicaram o cariótipo de várias espécies da tribo Akodontini: *A. azarae*, *A. (Necromys) obscurus*, *A. varius neocenus*, *A. varius simulator*, *Bolomys (Akodon) albiventer*, *Abrothrix xanthorhinus*, *Abrothrix longipilis*, *Akodon dolores*, *A. molinae*, *A. illuteus*, *A. boliviensis tucumanensis* e *A. boliviensis spegazzinii*. Este foi o primeiro trabalho a esboçar uma idéia filogenética para a tribo baseada em dados cromossômicos. Curiosamente, os

autores colocaram no título do manuscrito “Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). I. ...”, onde o símbolo “I” identificou o começo de uma série de trabalhos posteriores.

Um ano depois, Yonenaga (1972) publicou o cariótipo de *A. arviculoides* sp. ($2n=14$) e descreveu dois polimorfismos resultantes de duas inversões pericêntricas. Bianchi et al. (1973) publicaram o primeiro trabalho com roedores da tribo Akodontini empregando a técnica de bandamento G com a finalidade de identificar corretamente os pares cromossômicos. Neste mesmo estudo foi analisado o polimorfismo cromossômico do par 1 em *A. molinae* ($2n=42,43$ e 44), e também utilizada, pela primeira vez para a tribo, a técnica de bandamento C.

Yonenaga et al. (1976) publicaram cariótipos de *A. arviculoides* ($2n=14$) com polimorfismos nos pares 2 e 3. No mesmo estudo, apresentaram o cariótipo de *Akodon* sp. ($2n=24-25$), evidenciando cromossomos supernumerários e mosaicos de $2n=23/24$ (perda de um cromossomo Y) e $25/26$ (presença de dois cromossomos supernumerários). Os autores acima descreveram que *Oxymycterus* sp. apresenta $2n=54$ e polimorfismo de adição/deleção de regiões heterocromáticas. Ainda neste estudo, foi caracterizado *Zygodontomys (Necromys) lasiurus* com $2n=34$ e heteromorfismo do par sexual, provavelmente gerado pela deleção de um dos cromossomos X. É também neste trabalho que encontramos o primeiro registro sobre híbridos, obtidos em laboratório, entre *Akodon* sp. ($2n=24-25$) e *A. arviculoides* ($2n=14$). Os híbridos ($2n=19$) foram analisados com bandamento G, que revelou a falta de homologia dos cromossomos para formação dos pares do complemento diplóide, confirmando a veracidade dos híbridos. O estudo meiótico dos híbridos demonstrou unicamente a presença de univalentes e estudos histológicos dos testículos não detectou espermatozóides nos túbulos seminíferos.

Em 1976 foi publicado o segundo manuscrito da série dos trabalhos “Cytogenetics of the South American Akodont Rodents (Cricetidae) II” por Bianchi et al. (1976), no qual foram estudadas três espécies da tribo Akodontini (*A. molinae*, *A. azarae* e *A. (Necromys) obscurus*). Pela primeira vez em Akodontini foi utilizada a homologia de bandas G para definição de

cromossomos compartilhados (“shared chromosomes”) em espécies derivadas de um ancestral comum. Neste mesmo ano, foi publicado o terceiro (III) trabalho da série (Kiblicky et al. 1976), no qual foram descritos os polimorfismos intraespecíficos de *A. dolores* ($2n=34, 35$ e 37). No quarto trabalho da série, Merani et al. (1978) publicaram os cariótipos de híbridos obtidos em laboratório entre *A. dolores* e *A. molinae*. Os autores observaram que os híbridos entre essas espécies eram férteis, já que o retrocruzamento dos indivíduos da F1 com qualquer um de seus parentais resultava em uma F2. Estudos histológicos dos testículos dos híbridos não revelaram alterações na anatomia e na fisiologia. Ambas espécies seriam alopátricas na natureza. Bianchi et al. (1979) publicaram o quinto (V) trabalho da série sobre a segregação do par cromossômico 1 polimórfico em *A. molinae* e seu efeito na sobrevivência da prole.

Yonenaga-Yassuda (1979) descreveu em *A. arviculoides (cursor)*, além dos polimorfismos gerados pela inversão pericêntrica dos pares 2 e 3, outro polimorfismo causado por inversão pericêntrica no par 5 e um polimorfismo robertsoniano no par 1, originando $2n=15$. A correta identificação de todos os pares foi realizada pelas técnicas de bandamentos G e C. Pela primeira vez encontramos estudos meióticos numa espécie da tribo Akodontini, onde pode ser observado o trivalente formado nos indivíduos portadores de $2n=15$ (par cromossômico 1 formado por um metacêntrico grande e dois submetacêntricos). Neste mesmo estudo, os autores também buscaram estabelecer homologias de cromossomos ou segmentos cromossômicos entre *A. arviculoides* ($2n=15$) e *Akodon* sp. ($2n=24, 25$). Os autores apresentaram duas explicações para a origem do polimorfismo do par cromossômico 1: a) que o metacêntrico seria produto de uma fusão cêntrica de dois cromossomos ou b) que uma fissão de um cromossomo 1 metacêntrico teria originado dois cromossomos.

Barquez et al. (1980) caracterizaram cromossômicamente *A. caenosus* ($2n=34$), *A. boliviensis* ($2n=40$, com polimorfismo de braço curto no par 1 e polimorfismo no cromossomo X) e *A. varius* ($2n=41/42$, devido a presença de polimorfismo de fusão/fissão entre o par cromossômico 1 e o par 7).

Fronza et al. (1981) propuseram um sistema múltiplo de determinação do sexo para *Deltamys kemp* a partir do estudo de um macho e de uma fêmea coletados na Reserva Biológica de Punta Lara, Buenos Aires, Argentina.

Maia e Langguth (1981) descreveram o cariótipo de $2n=16$ para *A. arviculoides* coletado no nordeste do Brasil, além da existência de polimorfismo no par 4, gerado por uma inversão pericêntrica em estado heterozigoto. O cariótipo $2n=16$ representa uma das variantes homozigotas para o polimorfismo do par 1, as outras duas variantes são $2n=14$ e $2n=15$ encontradas no sudeste do Brasil por Yonenaga (1972), Yonenaga et al. (1976) e Yonenaga (1979). No mesmo estudo, também foi estudado o polimorfismo cromossômico de *Zygodontomys lasiurus* ($2n=34/33$, portador de uma fusão dos cromossomos 6 e 7). A partir de evidências morfológicas e cromossômicas, os autores concluíram que *lasiurus* pertence ao gênero *Bolomys*.

Em 1982 foram publicados o sétimo (VII, Lizarralde et al.1982), o oitavo (VIII, Lobato et al.1982) e o nono (IX, Semino et al.1982) trabalho da série "Cytogenetic of South American Akodont Rodents (Cricetidae)". No VII foi estudada a origem do polimorfismo dos cromossomos sexuais de *A. azarae*, no VIII foi descrito o cariótipo de *A. mollis*, tendo sido encontradas fêmeas XY e cromossomos supernumerários. E finalmente, no IX foram estudados os quiasmas nos bivalentes sexuais de *A. mollis*. Ainda neste ano, Kasahara e Yonenaga-Yassuda (1982) publicaram um estudo sobre a variabilidade cromossômica em *Akodon* sp. ($2n=24$).

Armada et al. (1983) publicaram o cariótipo de *Thalpomys lasiotis*, denominado de *A. reinhardt* por Langguth (1975). No ano de 1984 foi publicado o décimo ("X") trabalho da série por Bianchi e Merani (1984). Estes autores estudaram a homologia cromossômica através do padrão de bandamento G em *A. molinae*, *A. dolores*, *A. mollis*, *A. varius*, *A. azarae*, *A. urichi* e *Bolomys (Necromys) obscurus* com a finalidade de estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies. Neste mesmo ano, Sbalqueiro et al. (1984), baseados na análise de 14 indivíduos, estabeleceram o correto mecanismo de determinação do sexo em *D. kemp*. Neste trabalho os autores utilizaram bandamento G e C e estudaram o processo meiótico, procurando entender corretamente o mecanismo cromossômico múltiplo de determinação

do sexo em *Deltamys*. Também encontraram uma fusão cêntrica entre os cromossomos 1 e 13 e ampliaram a distribuição da espécie em 600 km em direção nordeste.

Patton (1986) descreveu o cariótipo de *A. torques*, *A. aerosus* e *A. mimus*; e estudou as relações filogenéticas entre estas espécies com a técnica de eletroforese de isozimas. Neste ano, Vitulo et al. (1986) estudaram cromossômicamente *A. puer* (2n=34), *A. azarae bibianae* (2n=38), *A. arenicola* (2n=38), *A. (Hypsimys) budini* (2n=38), *B. (Necromys) temchuki elioi* (2n=34), *B. (Necromys) temchuki liciae* (2n=34), *Oxymycterus rufus rufus* (2n=54), *O. r. platensis* (2n=54) e *O. paramensis* (2n=54); concluindo que *A. arenicola* é um sinônimo junior de *A. azarae*. Estes autores verificaram que *A. azarae bibianae* se diferencia de *A. a. azarae* quanto a morfologia do par cromossômico 2 (subtelocêntrico no primeiro taxon e telocêntrico no último) e no cromossomo Y (metacêntrico no primeiro e telocêntrico no último). Foi verificada a ausência do par metacêntrico pequeno no cariótipo de *A. (Hypsimys) budini*. Ainda neste estudo, *B. (Necromys) temchuki elioi* e *B. (Necromys) temchuki liciae* mostraram-se idênticos cromossômicamente e diferiram de *B. (Necromys) obscurus* na morfologia do cromossomo Y, que é metacêntrico em *B. (Necromys) temchuki* e telocêntrico em *B. (Necromys) obscurus*. Na comparação dos padrões de bandamento G e C, *B. (Necromys) temchuki* e *B. (Necromys) obscurus* foram muito diferentes, mas *B. (Necromys) temchuki* e *B. (Necromys) lasiurus* (Maia e Langguth, 1981) foram muito similares. As espécies *O. r. rufus* e *O. r. platensis* foram idênticas cromossômicamente, assim como *O. rufus*, *O. nasutus* e *O. paramensis*. Comparações feitas por estes autores com os dados publicados por Yonenaga (1975) para *Oxymycterus* sp. demonstraram que estas quatro espécies não são diferenciáveis cariotípicamente.

Solari et al. (1989) estudaram a meiose em fêmeas de *A. azarae* com a finalidade de verificar os efeitos do polimorfismo cromossômico do X. Neste mesmo ano, Myers e Patton (1989a) descreveram a espécie, e também o cariótipo, *A. kofordi* (2n=40). Liascovich e Reig (1989), caracterizaram o cariótipo de 2n=24 para *A. cursor montensis*, a comparação deste cariótipo com o descrito por Kasahara e Yonenaga-Yassuda (1982) para *Akodon* sp. e

Cestari e Imada (1968) para *A. arviculoides* não revelou diferenças. No mesmo trabalho, Liascovich e Reig (1989), também estudaram citogeneticamente *A. serrensis* em Misiones (Argentina) e identificaram o cariótipo de $2n=44$ para esta espécie. O cariótipo de *A. toba* ($2n=42-43$) foi corretamente determinado por Myers (1989).

Patton et al. (1990) apresentaram o cariótipo de *A. subfuscus* ($2n=40$). Neste ano, Barros et al. (1990) descreveram o cariótipo de *A. iniscatus* ($2n=33-34$) e, através da análise dos padrões de bandamento G, discutiram sua semelhança com o cariótipo de *A. puer*. Cerqueira et al. (1990) discutiram o cariótipo de *Akodon* $2n=14$ e $2n=24$ coletados no Rio de Janeiro (Brasil). Myers et al. (1990) determinaram os cariótipos de *A. juninensis* ($2n=40$), *A. boliviensis* ($2n=40$), *A. puer puer* ($2n=40$), *A. p. lutescens* ($2n=40$), *A. p. caenosus* ($2n=40$), *A. subfuscus* ($2n=40$).

Castro et al. (1991) registraram duas novas fusões (2;3 e 9;15) em estado homozigoto e heterozigoto em *D. kempi*. Blaustein et al. (1992) descreveram e compararam os cariótipos de *A. alterus* ($2n=40$) e *A. tucumanensis* ($2n=40$). Não foi verificada diferença entre os cariótipos das duas espécies, já que ambas apresentaram o mesmo número e idêntica morfologia cromossômica, mesmo padrão de bandamento G e ausência de variação quanto ao polimorfismo de deleção para o cromossomo X. Yonenaga-Yassuda et al. (1992) identificaram a atividade de genes ribossomais nos dois cromossomos X de fêmeas de *A. arviculoides* ($2n=14$). Svartman e Almeida (1993), descreveram uma fusão robertsoniana entre os cromossomos 6 e 7 e um polimorfismo no cromossomo X (acrocêntrico médio, subtelocêntrico médio e subtelocêntrico grande) em *Zygodontomys* (= *Bolomys*) *lasiurus* do centro do Brasil (Brasília, DF).

Svartman e Cardoso de Almeida (1994) definiram o cariótipo de *A. lindberghi* ($2n=42$), espécie descrita por Hershkovitz (1990) em Brasília/ DF. Geise et al. (1996) caracterizaram cariotipicamente (bandamentos G e C) populações de *A. lindberghi* de Minas Gerais, Brasil.

Sbalqueiro e Nascimento (1996), registraram a ocorrência de *A. cursor* com $2n=14$, 15 e 16, simpátricos, em Guaraqueçaba (Paraná, Brasil), a variação no $2n$ foi devida ao polimorfismo do par 1. Os autores também

registraram polimorfismo cromossômico nos pares 2 e 3 causados por inversões pericêntricas.

Em 1997 foi realizado o primeiro trabalho utilizando hibridação *in situ* fluorescente em uma espécie da tribo Akodontini (Fagundes et al. 1997a). Neste trabalho foram estudadas as localizações de seqüências teloméricas em *A. cursor* com $2n=14$, 15 e 16. Os resultados obtidos pelos autores foram utilizados para avaliar as duas alternativas propostas por Yonenaga-Yassuda (1979), levando a conclusão de que o par metacêntrico 1 em *A. cursor* $2n=14$ foi originado pela fusão dos submetacêntricos 1 e 2 de *A. cursor* $2n=16$. Primeiramente, teria ocorrido uma inversão pericêntrica entre os pares cromossômicos 1 e 2, a qual teria sido seguida de fusão, gerando o metacêntrico. Neste mesmo ano, Fagundes et al. (1997b) estudaram as homologias no padrão de bandamento G e Zoo-Fish entre *A. cursor* e *A. montensis*, encontrando uma correspondência total entre estas espécies.

Fagundes e Yonenaga-Yassuda (1998) utilizando a técnica de bandamento G, pesquisaram a homologia de braços cromossômicos entre *B. lasiurus* e *A. montensis*, analisando seus resultados conjuntamente com os obtidos nos estudos cromossômicos comparativos entre *A. montensis* e *A. cursor*. Neste estudo foi observada a presença de bandas teloméricas intersticiais na região pericentromérica do metacêntrico produzido pela fusão dos cromossomos 6 e 7 em *B. lasiurus*. Fagundes et al. (1998) estudaram o grande polimorfismo cromossômico em *A. cursor*, registrando 28 cariótipos diferentes, produtos do polimorfismo dos pares 1 (fusão cêntrica associada a inversões pericêntricas do par 1 e 3); 2, 4 e 6 (inversões pericêntricas); além de trisomias no par 7 e presença de fêmeas X0.

Geise et al. (1998) estabeleceram homologias cromossômicas, baseadas no padrão de bandamento G, entre *B. lasiurus*, *Akodon* sp. ($2n=46$), *A. lindberghi*, *A. montensis*, *A. aff. cursor* ($2n=16$) e *A. cursor* ($2n=14$). Neste mesmo ano, González et al. (1998) descreveram uma nova espécie de *Akodon*, *A. reigi*, a partir de indivíduos coletados no Uruguai e no sul do Brasil (Taim, Rio Grande do Sul), com $2n=44$, registrando a alta similaridade com o cariótipo descrito por Liascovich e Reig (1989) para *A. serrensis* coletado em Misiones (Argentina), mas duvidando da correta identificação dos indivíduos de Misiones

como *A. serrensis*. Um outro estudo realizado neste mesmo ano revelou outra novidade taxonômica, um *Akodon* com $2n=10$ na região central do Brasil (Silva e Yonenaga-Yassuda 1998).

Viera et al. (2004) estudaram a localização de seqüências teloméricas em três espécies do gênero *Akodon*: *A. dolores* (na qual foram encontrados sinais intersticiais de seqüências teloméricas), *A. azarae* e *A. boliviensis* (ambos apresentando sinais teloméricos fora do centrômero do par 1). *Akodon azarae* também apresentou sinais teloméricos no cromossomo X.

Pardiñas et al. (2005) descreveram o cariótipo de uma nova espécie de *Akodon* (*A. philipmyersi*, $2n=36$)

1.4.2 Estudos paleontológicos e distribucionais

Na atualidade, dos 73 gêneros reconhecidos por Musser e Carleton (2005) para a tribo Akodontini, ao menos 39 dispõem de registro fóssil entre o Mioceno e o Holoceno, sendo aproximadamente 10 conhecidos apenas por fósseis. O registro fóssil dos Sigmodontinae não se restringe à América do Sul, estando presente também na América do Norte e nas Antilhas. O material fóssil da América do Norte seria mais antigo que o encontrado na América do Sul, mas há dúvidas se o primeiro material realmente pertence à subfamília Sigmodontinae (Pardiñas et al. 2002).

Em geral, o registro fóssil dos roedores sigmodontinos na América do Sul é escasso e restrito a um número limitado de depósitos paleontológicos (Pardiñas et al. 2002)

Os primeiros fósseis de roedores sigmodontinos da América do Sul foram obtidos na localidade de Lagoa Santa, Minas Gérias (Brasil) a partir de 1835 por Lund (1839, 1840a, 1840b, 1842a, 1842b). Bravard (1857) descreveu o primeiro sigmodontino fóssil da Argentina. Alguns anos depois, Gervais e Ameghino (1880), reconheceram em seu catálogo de mamíferos fósseis da América do sul, 12 espécies de murídeos de localidades brasileiras e dois provenientes da Argentina. Winge (1887) estudou o material fóssil obtido por Lund na localidade de Lagoa Santa, publicando um trabalho descritivo e ilustrado de 27 espécies de murídeos encontradas no Brasil.

O estudo descritivo dos primeiros fósseis pré-quaternários de *Proreithrodon* do Plioceno argentino foi realizado por Ameghino (1908) e Rovereto (1914). Em seu estudo o primeiro autor mencionou um dos mais antigos representantes dos sigmodontinos conhecido o "*Cricetodon*". Duas novas espécies de roedores encontradas no início do Ensenadense (intervalo entre 2,2 milhões de anos atrás=Ma e 1,5 Ma) em Buenos Aires foram descritas por Rusconi (1931). Este mesmo autor, Rusconi (1936), estudou a distribuição dos vertebrados fósseis do Ensenadense e Castellanos (1944), mencionou a presença de alguns roedores fósseis nos sedimentos neógenos em Córdoba (Argentina). Hoffstetter (1963) foi o primeiro a se referir a existência de sigmodontinos fósseis no quaternário da Bolívia. Com a finalidade de organizar a informação disponível a fim de entender as sinonímias geradas por diversos estudos, Paula Couto (1950, 1953) revisou grande parte do material coletado por Lund em Lagoa Santa (Brasil), do mesmo modo que Hershkovitz (1955, 1962, 1966) e Avila-Pires (1960).

Os sigmodontinos mais antigos da América do Sul são *Auliscomys formosus* (Phyllotoni) do Montehermosense com idade de 5 a 4 Ma e *Necromys bonapartei* (Akodontini) do Chapadmalalense inferior com antigüidade de 4 a 3,5 Ma (Reig 1978). No Chapadmalalense superior (Plioceno tardio, aproximadamente 3,6 a 3,1 Ma) foi registrado um gênero e uma espécie da tribo Akodontini já extintas, *Dankomys simpsoni* (Reig 1978). O registro mais antigo do gênero *Scapteromys* pertence a *S. hershkovitzi* do Barrancalobense e Vorohuense (Plioceno tardio, aproximadamente 3,1 a 2,8 Ma). Os primeiros fósseis do gênero *Akodon*, *A. lorenzini* e *Akodon* cf. *iniscatus*, foram documentados por Reig (1987) e pertencem ao Vorohuense superior (com idade aproximada de 2,8 a 2,6 Ma). No Sanandresense Reig (1994) descreveu duas espécies de *Necromys* (*Necromys* sp. A e *Necromys* sp. B). No Ensenadense foram encontrados restos dos Akodontini, *A. azarae* e *N. benefactus* registrados por Pardiñas (1993, 1999), *A. cf. montensis* descrito por Reig (1987) e *Oxymycterus* cf. *O. rufus* (Reig 1987).

Vos e Myers (1991) revisaram o material de Lagoa Santa (Minas Gerais) e registraram os seguintes Akodontini: *A. angustidens*, *A. clivigenis*, *A. cursor*, *Bibimys labiosus*, *Blarinomys breviceps*, *Kunsia froto*, *K. tomentosus*, *N*

lasiurus, *O. cosmodus*, *O. roberti*, *Thalpomys sp.* e *Thaptomys nigrita*, para o Lujanense (idade entre 0,5 e 0,2 Ma) e Platense (idade entre 0,2 Ma até a atualidade). Para a Bolívia, Marshall e Sempere (1991) registram os akodontinos *K. froto* no Ensenadense e *Necromys sp.* no Platense, enquanto Fejfar et al. (1993) registraram *Akodon sp.* no Lujanense e no Platense. No Uruguai, *Akodon cf. A. azarae* foi encontrado no Lujanense (Ubilla, 1996)

A história evolutiva dos roedores sigmodontinos apresenta muitas interrogações algumas das quais ainda hoje sem resposta. O único ponto que parece estar claro é que o ancestral dos sigmodontinos se originou fora da América do Sul. De acordo com esta idéia o ancestral teria invadido uma ou várias vezes este subcontinente antes e/ou depois de sua diferenciação. Pardiñas et al. (2002) resumiram em três os pontos de controvérsia entre os diferentes autores: 1) qual seria a origem geográfica dos sigmodontinos ou de seu antepassado imediato: a América Central, a América do Norte ou o Velho Mundo?; 2) qual seria o grau de diferenciação do(as) linhagem(s) invasora(s)? e 3) qual a datação da(s) invasão(ões)? Como o foco central desta tese não são se ocupa em responder estas questões, mas sim tentar entender a história evolutiva da tribo Akodontini, prosseguiremos discutindo sobre este grupo.

Reig (1980) estudou comparativamente a estrutura molar e cranial da tribo Oryzomyini em relação aos cricetodontines generalistas da América do Norte. Neste estudo o autor concluiu que esta tribo seria a mais primitiva dentro da subfamília Sigmodontinae, sugerindo que deste grupo poderiam ter derivado os demais membros da subfamília. De acordo com este autor, as três principais tribos do Sigmodontinae (Oryzomyini, Akodontini e Phyllotini) representariam diferentes graus evolutivos, variando desde formas selváticas e insetívoras até formas adaptadas a campos abertos e vegetarianas. Os Oryzomyini se caracterizam por apresentarem alta diversidade no norte dos Andes e os Akodontini e Phyllotini na região central dos Andes.

Reig (1984), a partir de dados de número de espécies e gêneros de cada tribo sugeriu que a diferenciação dos Sigmodontinae teria ocorrido na América do Sul através de três episódios cladogenéticos correspondentes a origem de cada tribo principal. Levando em consideração a freqüência de registros andinos para os Sigmodontinos, o autor concluiu que as principais

regiões de diferenciação estão localizadas nos Andes. Os dados deste estudo também sugeriram que a cordilheira dos Andes teria sido o eixo principal de dispersão, de norte a sul, das tribos da subfamília. Reig (1984) interpretou neste estudo, valendo-se de dados morfológicos, craniais, dentários e cromossômicos (Vorontzov 1967, Gardner e Patton 1976, Reig 1977) que os Akodontini seriam intermediários evolutivamente entre os Oryzomyini e os Phyllotini. Embora contasse com mais registros extra-andinos o autor considerou os Andes como o território central de diversificação da tribo Akodontini e localizou o sul dos Andes centrais e o norte dos Andes do sul como a região de sua diversificação (entre 20º e 30º de latitude). Desta região a diferenciação teria seguido três rotas: uma ao norte e outra ao sul, seguindo o eixo dos Andes, e a última ao leste, em direção às terras baixas. Ainda neste estudo, o autor reforçou a afinidade entre os Akodontini e os Scapteromyini em relação ao padrão molar, sugerindo que esta última tribo teria surgido a partir da diferenciação de uma linhagem akodontina a qual teria invadido as terras baixas do Chaco e se expandido para o leste.

Reig (1986), utilizando dados de distribuição das espécies e gêneros em diferentes regiões dos Andes e extra-andinas, desenvolveu totalmente sua idéia de ADO (área de diferenciação original), na qual sustenta a evolução da tribo Akodontini como explicada anteriormente. As mudanças ambientais dos Andes teriam promovido a diferenciação dentro de Akodontini. Neste estudo o autor lança a idéia de que, depois da chegada de um "protoakodon" na área de diferenciação original no Mioceno superior ou Plioceno inferior, um *Akodon* não especializado com cariótipo $2n=52$, similar a *A. (Abrothrix) andinus* teria se estabelecido nos Andes, representando a linha de diferenciação para o sul com *Chelemys* e *Notiomys* que, de acordo com Reig (1978), teriam se originado no Plioceno. *Akodon orophilus*, *A. mollis*, *A. tolimae* e *A. uruchi*, juntamente com *Microxus* e *Podoxymys* representariam a diferenciação para o norte, seguindo o eixo dos Andes. Estas espécies se caracterizam por apresentar uma redução no número cromossômico. A terceira direção teria sido para as terras baixas do leste, representadas por *Necromys* (o qual teria sido um dos primeiros gêneros a se diferenciar, como indicado por seu cariótipo derivado e seu registro fóssil Montehermosense), *Oxymycterus* (adaptado para uma dieta animal) e os

gêneros ou subgêneros exclusivos das terras baixas: *Lenoxus*, *Juscelinomys* e *Deltamys*. Reig (1986) também observou que *A. boliviensis* apresenta $2n=40$ (da mesma forma que muitas das espécies de baixa altitude, como *A. varius* $2n=40$) ou cariótipos similares (como apresentado por *A. molinae* $2n=42-43$, *A. dolores* $2n=38$, *A. azarae* $2n=38$). Esta observação poderia sugerir que as formas argentinas teriam se originado na Puna a partir dos ancestrais de *A. boliviensis*.

1.4.3 Estudos morfológicos

Mares et al. (1981) estudaram craniometricamente várias espécies da tribo Akodontini (*A. boliviensis*, *A. varius*, *A. albiventer* e *Oxymycterus paramensis*) procedentes de Salta (Argentina).

Macedo e Mares (1987) estudaram 1.007 indivíduos de *Necromys lasiurus* através de 24 medidas craniais, descrevendo a variação intrapopulacional e geográfica.

A partir do ano 1989, começou a surgir um grande número de trabalhos enfocando características morfológicas e morfométricas nos roedores da tribo Akodontini. Myers e Patton (1989b) descreveram uma nova espécie pertencente a esta tribo nas florestas da Bolívia, *A. siberiae*. Este autores realizaram quatro medidas externas e 20 medidas do crânio numa amostra de mais de 7 exemplares de *A. siberiae*, *A. budini*, *A. puer*, *A. fumeus*, *A. varius*, *A. dayi*, *A. aerosus*, e *Microxus mimus*. Foi feita uma descrição detalhada da nova espécie em relação a características da pele, pêlos, crânio, dentes, aparelho reprodutor masculino, pregas palatais, estômago, superfície plantar das patas, cariótipo e uma comparação morfológica desta nova espécie com as demais utilizadas na análise morfométrica.

Myers e Patton (1989a) publicaram uma revisão dos *Akodon* coletados no Peru e na Bolívia, estabelecendo um grupo denominado *A. fumeus*, o qual reúne as espécies *A. kofordi* (nova espécie descrita neste trabalho) e *A. fumeus*. Estes autores utilizaram o mesmo conjunto de medidas externas e craniais empregadas em seu estudo anterior (Myers e Patton 1989b), desta vez para as espécies *A. kofordi*, *A. subfuscus*, *A. fumeus*, *A. puer*, *A. aerosus*, *A.*

mollis, *A. dayi* e *Microxus mimus*. O número amostral mínimo também foi maior em relação ao estudo prévio, n=16. Este novo grupo foi descrito valendo-se de características da pelagem, crânio, dentes e caracteres anatômicos de tecidos moles. Os autores realizaram comparações com um grande número de espécies do gênero e de gêneros relacionados.

Myers (1989) reuniu um conjunto de espécies no grupo *A. varius* (*A. dayi*, *A. dolores*, *A. molinae*, *A. neocenus*, *A. simulator*, *A. toba* e *A. varius*) as quais compartilham um tamanho corporal grande e habitam as elevações médias e baixas do lado leste dos Andes, as planícies adjacentes da Bolívia e a parte sul do Paraguai e média da Argentina. O autor utilizou as mesmas quatro medidas externas empregadas nos trabalhos anteriores e 17 medidas craniais. O grupo *varius* foi caracterizado externamente, cranialmente e cromossômicamente. A existência de dimorfismo sexual também foi estudada, sendo demonstrado que as diferenças entre machos e fêmeas de uma mesma população é menor que as diferenças relativas ao crescimento e a origem geográfica. Neste estudo, Myers (1989), investigou o crescimento e desgaste dos dentes e as características dos órgãos sexuais. Muitas espécies classificadas como não pertencendo a este grupo foram comparadas com o mesmo a fim de verificar as diferenças. Cada espécie do grupo *varius* recebeu uma descrição. O cariótipo de *A. toba* foi caracterizado pela primeira vez.

Liascovich e Reig (1989) descreveram o cariótipo de *A. serrensis* (2n=44) e, para a correta identificação desta espécie, compararam as medidas morfológicas de *A. serrensis* capturado em Misiones (Argentina) com as do holótipo.

Herskovitz (1990) estudou morfologicamente o gênero *Akodon*, dividindo as espécies em dois grupos a partir do comprimento médio do crânio. Um grupo caracterizou-se por apresentar crânio menor que 26 mm (grupo denominado de *A. boliviensis*) e o outro por apresentar comprimento do crânio maior que 26 mm (grupo denominado de *A. mollis*). O grupo de *A. boliviensis* reuniu 13 espécies e o grupo *A. mollis* incluiu 20 nomes representando 8 espécies de acordo com a classificação de Herskovitz. Neste trabalho foram utilizadas quatro medidas externas e 14 medidas do crânio, sendo descritas duas novas espécies dentro do gênero: *A. lindberghi* e *A. sanctipaulensis*.

Myers et al. (1990) estudaram morfologicamente o grupo *A. boliviensis* de *Akodon* no Peru e Bolívia. Foram utilizadas quatro medidas externas e 20 medidas craniométricas, sendo o grupo caracterizado em relação aos órgãos do sistema digestivo e do sistema reprodutivo e sob o ponto de vista cromossômico. O grupo *A. boliviensis* foi definido por uma combinação de características morfológicas, craniométricas, distribucionais e ambientais. Neste estudo foram analisadas as espécies *A. boliviensis*, *A. spegazzinii*, *A. puer puer*, *A. p. caenosus*, *A. p. lutescens*, *A. subfuscus subfuscus*, *A. s. arequipae* e *A. juninensis*. Ainda neste estudo os autores avaliaram o efeito da idade e do sexo em relação às mudanças das medidas craniais, verificando um pequeno efeito do dimorfismo sexual, menos importante que o efeito da idade e da variação geográfica. Uma extensa comparação entre as espécies do grupo com outras espécies de *Akodon* simpátricas foi também realizada. Os autores descreveram neste mesmo trabalho uma nova espécie (*A. juninensis*) e uma nova subespécie (*A. subfuscus arequipae*).

Hershkovitz (1990) identificou uma nova espécie no gênero *Thalpomys* (*T. cerradensis*). O autor utilizou quatro medidas externas e 22 medidas craniais para comparar esta nova espécie com *T. lasiotis*, além de realizar uma detalhada descrição cranial, dentária e da genitália.

Blaustein et al. (1992) estudaram morfologicamente *A. alterus* e *A. tucumanensis*, utilizando 45 caracteres descontínuos. González et al. (1998), realizando quatro medidas externas e 14 medidas craniais, descreveram uma nova espécie (*A. reigi*) para Uruguai e sul do Brasil (Taim, RS). Nesse mesmo ano, Hershkovitz (1998) estudou várias espécies da tribo Akodontini no parque Iporanga (SP) e no Parque Nacional Caparaó (MG-ES): *A. cursor*, *A. serrensis*, *A. mystax* (nova espécie), *T. nigrita*, *Brucepatterssonius* (novo gênero) *soricinus* (nova espécie), *B. igniventris* (nova espécie), *B. griserufescens* (nova espécie) e *B. albinasus* (nova espécie), *Oxymycterus rufus* e *O. caparae* (nova espécie). Neste estudo o autor utilizou 3 ou 4 medidas externas e 14 medidas craniais.

González e Massoia (1995) estudaram, através de 13 medidas craniais e quatro externas, *Deltamys kempi* e descreveram 2 subespécies, assim como revalidaram *Deltamys* como gênero.

Capllonch et al. (1997) estudaram craniometricamente várias espécies da tribo Akodontini de Tucumán (Argentina): *A. caenosus*, *A. simulator*, *A. spegazzinii*, *A. tucumanensis* e *N. orbus*,

Diaz et al. (1999), utilizando cinco medidas externas e 19 medidas craniais, descreveram *A. aliquantulus*. Esta nova espécie foi comparada utilizando caracteres contínuos e descontínuos com *A. puer* e *A. spegazzinii*.

Mares e Braun (2000), descreveram três novas espécies do gênero *Brucepattersonius* (*B. paradisus*, *B. misionensis* e *B. guarani*) a partir de cinco medidas externas, 17 caracteres craniais contínuos e 19 descontínuos. Neste mesmo ano, Christoff et al. (2000), descreveram uma nova espécie, *A. paranaensis* (2n=44) e propuseram o cariótipo de 2n=46 para *A. serrensis*. Neste estudo foram utilizadas quatro medidas externas e 18 medidas craniais. Hoffmann et al. (2002), utilizando 29 medidas craniais, revisam a sistemática do gênero *Oxymycterus*. Pardiñas et al. (2003) estudaram os roedores do gênero *Akodon* de Misiones Argentina a partir de quatro medidas externas e 15 medidas craniais.

Gonçalves e Oliveira (2004) estudaram a variação morfológica entre duas formas simpátricas de *Oxymycterus*, neste trabalho foram utilizadas 20 medidas craniais e dentais.

Pardiñas et al. (2005), estudando cinco medidas externas e 19 medidas craniais e dentárias, descreveram uma nova espécie de *Akodon* (*A. philipmyersi*, 2n=36). Ainda em 2005, Geise et al. (2005) estudaram 20 medidas craniais e dentárias, além de duas medidas externas, em exemplares cariotipados de *A. cursor*, *A. aff. cursor* e *A. montensis*, procurando diferenciar estas espécies crípticas. Neste estudo os autores concluíram que sete medidas craniais e dentárias e uma externa seriam capazes de diferenciar *A. cursor* de *A. aff. cursor*, 19 medidas craniais e dentárias e duas externas diferenciariam *A. aff. cursor* de *A. montensis* e, finalmente, 17 medidas craniais e dentárias e uma externa seriam possíveis de separar *A. cursor* de *A. montensis*. Pereira et al. (2005) estudaram morfológicamente e craniométricamente *A. serrensis*, *Brucepattersonius* sp. e *O. misionalis*, de Misiones (Argentina).

1.4.4 Estudos de alozimas

Os estudos de alozimas dentro da tribo Akodontini iniciaram-se com o trabalho de Apfelbaum e Blanco (1984), no qual foi estudada, a partir de 23 loci, a similaridade genética entre *A. dolores* (n=32 indivíduos), *A. molinae* (n=76), *A. azarae* (n=30) e 53 indivíduos híbridos de *A. dolores* e *A. molinae*. Neste estudo os autores concluíram que *A. dolores* e *A. molinae* representariam raças geográficas da mesma espécie. Este mesmos autores, Apfelbaum e Blanco (1985), publicaram um segundo estudo com *A. dolores*, investigando as variações temporais das freqüências alélicas. Este trabalho consistiu de 6 coletas, em diferentes datas (uma a cada seis meses), no mesmo local. Dos 18 loci analisados, somente dois apresentaram variação estatisticamente significativa seguindo um padrão estacional. Não houve correlação entre as freqüências alélicas e a densidade populacional, sendo as mudanças na estrutura etária das populações as responsáveis pelo padrão cíclico das flutuações das freqüências alélicas.

Apfelbaum e Reig (1989) avaliaram as relações evolutivas a partir de 26 loci entre nove espécies de *Akodon* (distribuídas, principalmente, pelo norte e centro da Argentina), uma espécie de *Necromys* e uma de *Oxymycterus*, utilizando, pelo menos, 6 indivíduos de cada espécie. A partir da distância genética foram analisadas as variações intraespecíficas e construídas árvores filogenéticas. Neste mesmo ano, Patton et al. (1989) estudaram as relações filogenéticas entre oito espécies do gênero *Akodon*, duas de *Oxymycterus*, uma de *Necromys*, uma de *Microxus* e uma de *Lenoxus*, com um número mínimo de 2 indivíduos por espécie. Para este estudo foram utilizados 26 loci para os quais foram analisadas as variações intraespecíficas e construídas árvores filogenéticas de distância genética. Myers e Patton (1989b) examinaram 26 loci da única população conhecida de *A. siberiae* e a compararam com *A. aerosus*, *A. fumeus*, *A. mollis*, *A. puer*, *A. subfuscus*, *A. torques*, *M. mimus* e *N. amoenus*. O resultado obtido por estes autores demonstrou que *A. siberiae* é muito diferente em relação às outras espécies, pois dos 32 alelos presentes nesta espécie, seis foram exclusivos e três deles fixados. Este fato, juntamente com estudos em que outras espécies simpátricas foram avaliadas em conjunto

com *A. siberiae*, confirmou que esta seria uma nova espécie, uma vez que não compartilha todos os alelos com nenhuma outra espécie simpátrica.

Myers et al. (1990) utilizaram a técnica de eletroforese de isozimas para estudar o grupo *A. boliviensis*. Até então, vários pesquisadores (Pearson 1982 no Peru, Anderson 1985 na Bolívia) reconheciam apenas uma espécie de *Akodon* pequena e marrom, habitando as pradarias do Altiplano (*A. boliviensis*). Myers et al. (1990) consideravam que se dois taxa eram simpátricas ou alopátricas contíguos sem evidência de fluxo gênico, isto confirmaria que se trataria realmente de duas espécies. Assim, observaram, por exemplo, que *A. boliviensis* e *A. puer* são simpátricas e mantêm alelos diferentes fixados, o que sugeriria que são espécies verdadeiras. Esta suposição levou os autores a reconhecer quatro espécies no sul do Peru e na Bolívia e não apenas uma única espécie pequena e marrom.

Blaustein et al. (1992) estudaram 28 loci em duas populações alopátricas mas muito similares morfologicamente e iguais cromossômicamente, denominadas de *A. alterus* e *A. tucumanensis*. O estudo revelou que 20 loci eram monomórficos e fixados em ambas populações, enquanto os outros oito eram polimórficos em uma ou nos dois taxa.

Em 1995 dois trabalhos de isozimas foram publicados por Rieger et al. (1995a, 1995b). No primeiro foi estudada a variação temporal da frequência alélica para 22 loci dentro de quatro populações de *A. montensis*, incluindo mais de 200 indivíduos. No segundo estudo foi realizada uma comparação entre *A. cursor* (2n=14/15), *A. aff. cursor* (2n=16) e *A. montensis* (2n=24/25/26). Devido a pequena diferenciação encontrada entre estas espécies, foi proposto que estas formariam um grupo que teria se diferenciado recentemente.

1.4.5. Estudo de seqüências de genes mitocondriais e nucleares

O primeiro trabalho utilizando dados de seqüências gênicas dentro da tribo Akodontini foi publicado por Patton et al. (1990), neste trabalho foram analisados os primeiros 401 pares de bases do gene mitocondrial citocromo *b* de seis populações de *A. subfuscus*, *A. torques*, e *A. aerosus* a fim de testar a hipótese do modelo de gradiente como mecanismo de diversificação em

Akodon do lado leste dos Andes. Um ano depois, Smith e Patton (1991) estudaram as relações filogenéticas a partir dos primeiros 401 pares de bases do gene citocromo *b* em 20 populações e 12 espécies da tribo Akodontini (principalmente andinas), verificando também a variação intraespecífica de várias espécies com no mínimo 2 e no máximo 4 indivíduos por espécie (*A. subfuscus*, *A. torques*, *A. aerosus*, *A. (Chroeomys) jelskii*, e *Microxus mimus*).

Em 1992, os mesmos autores (Patton e Smith 1992a) estudaram 31 populações de 13 das 15 espécies de *Akodon* existentes no Peru, a partir dos primeiros 396 pares de bases do gene citocromo *b*. Para acessar a variação intrapopulacional foram incluídas na análise as populações com no mínimo dois e no máximo oito indivíduos por espécie. Também foram estudadas as relações intraespecíficas e interespecíficas. Neste mesmo ano, os mesmo autores (Patton e Smith 1992b) publicaram outro trabalho utilizando os primeiros 401 pares de bases do gene citocromo *b*, testando o modelo de especiação alopátrica *versus* o modelo de especiação em gradiente em três espécies que habitam o lado leste dos Andes: *A. aerosus* (que ocorre entre 2.000 e 1.000 m), *A. torques* e *A. mimus* (ambas ocorrendo entre 3.500 e 2.000 m) e outras três espécies (*A. subfuscus*, *Bolomys amoenus*, e *Chroeomys jelskii*) que habitam a 3.500 m, estas últimas utilizadas como grupos externos.

Smith e Patton (1993) estudaram os primeiros 801 pares de bases do citocromo *b* em oito gêneros e 28 espécies da tribo Akodontini. A maioria da amostra deste trabalho foi da região dos Andes, somente três espécies das terras baixas foram utilizadas: *A. azarae*, *O. hiska* e *A. cursor* (todas do Paraguai, onde a última é, na verdade, *A. montensis*).

Engel et al. (1998) estudaram uma grande amostra de gêneros e espécies da subfamília Sigmodontinae, utilizando vários genes mitocondriais (tRNA arginina, ND3 e ND4L, totalizando 1340 pares de bases e 624 pares de bases de ND4). Da tribo Akodontini foram incluídas duas espécies (*N. lactens* e *O. rufus*). Este trabalho objetivou, principalmente, calibrar o relógio molecular a fim de utilizá-lo como teste das hipóteses de entrada cedo ou tardia dos Sigmodontinae na América do Sul.

Smith e Patton (1999) estudam a seqüência completa do gene citocromo *b* em 66 espécies da subfamília Sigmodontinae. Neste estudo os autores

discutiram as relações filogenéticas entre as tribos da subfamília e entre os gêneros da tribo Akodontini.

A evolução do sistema sexual XY em fêmeas de *Akodon* (14 espécies) foi avaliada por Hoekstra e Edwards (2000) num estudo que utilizou pela primeira vez seqüências da região controladora das mitocôndrias (1085 pares de bases).

O primeiro estudo filogeográfico dentro da tribo Akodontini foi publicado por Geise et al. (2001). Os autores analisaram os primeiros 801 pares de bases do gene citocromo *b* em 6 espécies do gênero *Akodon* da região leste da América do Sul. Destas espécies, duas foram amplamente amostradas: *A. cursor* (com n=23) e *A. montensis* (n=15). Para as outras quatro espécies o tamanho amostral foi menor: *A. aff cursor* (n=3), *A. lindberghi* (n=2), *A. mystax* (n=1) e *A. serrensis* (n=2).

Hoffmann et al. (2002) publicaram o primeiro trabalho de filogenia molecular do gênero *Oxymycterus* com uma ampla amostragem de espécies, utilizando o gene citocromo *b*.

D'Elia et al. (2003) estudaram a posição filogenética de *Deltamys kempi* a partir da seqüência completa do citocromo *b* e da análise de parcimônia. Neste ano D'Elia (2003) publicou o primeiro trabalho filogenético dentro da tribo Akodontini utilizando um gene nuclear (IRBP). Neste estudo o autor combinou o uso de seqüências nucleares (IRBP, 759 pares de bases) e mitocondriais (citocromo *b*, 1134 pares de bases) para analisar as relações entre os gêneros da tribo Akodontini, utilizando unicamente a análise de máxima parcimônia.

Hoekstra (2003) estudou os desvios da herança dos haplótipos mitocondriais XX e XY em duas espécies que possuem fêmeas XY (*Akodon azarae* e *A. boliviensis*). Levando em consideração que as fêmeas XX só geram fêmeas XX e que as fêmeas XY geram fêmeas XX e XY, esta autora hipotetizou neste estudo que o haplótipo XY deveria permanecer isolado, mas que o haplótipo XX não, sendo, conseqüentemente, esperado uma expansão dos haplótipos XY nas populações.

Gonçalves e Oliveira (2004) estudaram a variação genética em duas populações simpátricas de *Oxymycterus* (*O. rufus* e *O. dasytrichus*), analisando os primeiros 801 pares de bases do citocromo *b*.

Steppan et al. (2004) estudaram genes nucleares (GHR, RAG1, BRCA1, c-myc, ao todo 6400 pares de bases) a fim estabelecer as relações evolutivas dentro da família Muridae e os tempos de divergência dos diferentes clados. Neste estudo foram incluídas seqüências dos genes RAG1 e c-myc de *A. boliviensis*.

Pardiñas et al. (2005) analisaram, por parcimônia, as relações filogenéticas de *A. philipmyersi* (nova espécie descrita por estes autores), utilizando 801 pares de bases do gene citocromo *b*.

Silva et al. (2006) descreveram as relações filogenéticas de um novo taxon (*Akodon* sp. $2n=10$) analisando, por parcimônia, 750 pares de bases do citocromo *b*.

OBJETIVOS

Nesta tese objetivamos investigar algumas questões evolutivas ainda não respondidas sobre os roedores akodontinos, a seguir:

- Os agrupamentos estabelecidos em *Akodon* por diferente autores, valendo-se de aspectos cromossômicos (Bianchi et al. 1971) e craniomorfométricos (Hershkovitz 1990) não foram ainda testados, além disso não há registro de estudos que visem comprovar a monofilia dos grupos de espécies *A. boliviensis*, *A. varius*, *A. fumeus* e *A. cursor* propostos respectivamente por Hershkovitz (1990), Myers (1989), Myers e Patton (1989a) e Rieger et al. (1995b). Este cenário motivou a elaboração de um dos objetivos da presente Tese no qual nos propomos a verificar estas questões e determinar as datações dos diferentes agrupamentos a partir do estudo de seqüências mitocondriais (citocromo *b*) e nucleares (IRBP), **Capítulo 2.**

- Representantes de *Deltamys kemp* de localidades brasileiras ainda não foram estudadas sob o ponto de vista molecular e nem morfológico, levando a proposta do segundo objetivo desta Tese que visa estudar, a partir de seqüências mitocondriais (citocromo *b*), bem como nucleares (RAG2), diferentes populações desta espécie, utilizando prioritariamente várias localidades brasileiras, a fim de caracterizar a espécie e estudar seu padrão filogeográfico, **Capítulo 3.**

- Uma vez que a Mata Atlântica encontra-se entre os biomas mais ameaçados do planeta e valendo-se do fato dos representantes da tribo Akodontini terem várias espécies de distribuição ampla abrangendo grande parte deste bioma, além de espécies de distribuição restrita que apresentam alguns problemas a nível taxonômico, nosso último objetivo foi investigar os níveis e os padrões da variação genética destes roedores neste habitat fragilizado, a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo *b*. **Capítulo 4.**

CAPÍTULO 2

Phylogeny and temporal diversification of the Neotropical rodent genus *Akodon*: Inferences from mitochondrial and nuclear DNA sequences data

Martín A. Montes ^a, Luiz F. B. Oliveira ^b, Alfredo Langguth ^c, Margarete S. Mattevi ^{a,d*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (martinmontes76@yahoo.com.ar)*

^b *Setor de Mastozoologia, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20940-040, Rio de Janeiro, Brazil (melfo@terra.com.br)*

^c *Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5010, 58059-900, João Pessoa, Brazil (alfredodse@ufpb.br)*

^d *Curso de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, 92420-280, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil (mattevi@terra.com.br)*

*Corresponding author. Fax: 55 51 33113386

E-mail address: mattevi@terra.com.br (M.S. Mattevi).

Abstract

The genus *Akodon* distributes across a large territory of the South American continent and is the second genus in number of species within the Sigmodontinae subfamily. This study investigates the phylogenetic relationships between 29 species in the genus *Akodon* and estimates the divergence times for the different species-groups generated by the analysis of the complete cytochrome *b* sequence and the partial sequence of the nuclear gene interphotoreceptor retinoid binding protein. Emphasis was placed on those species from eastern South America, an area previously undersampled in other molecular phylogenetic investigations. The Maximum Likelihood and Bayesian Inference algorithms and the analysis of divergence times revealed two major species-groups that probably split up in an environment with temperate climate ca. 2.6 million years ago. Each of these major species-groups divided into two subgroups, the Andean Forests and South Lowlands subgroups, which diverged ca. 2.3 million years ago, and the Atlantic Forests and Andean Grasslands subgroups, separated ca. 2 million years ago. The results indicate that these last differentiations may have occurred in a period of temperate climate, and were accompanied by alterations in the karyotypes.

Keywords: *Akodon*; Sigmodontinae; Akodontini; Molecular phylogeny; Cytochrome *b*; IRBP; Molecular clock; South America

1. Introduction

The genus *Akodon* Meyen, 1833 belongs to the tribe Akodontini, subfamily Sigmodontinae of Neotropical rodents. Within that subfamily, *Akodon* is one of the genera that includes the highest number of species, being one of the most complex at taxonomic level (Reig, 1987; Myers, 1989; Hershkovitz, 1990; Smith and Patton, 1991, 1993). Since its first description, up to 90 species have been included in *Akodon* (Tate, 1932), although nowadays the number of species proposed is 41 according to Musser and Carleton, 2005.

The members of the genus are characterized by a complex baculum, short hind legs, small ears, and a tail length usually shorter than the sum of head and body length. The molars are tetralophodon, tending to simplification. The majority of genus *Akodon* members is omnivorous (Eisenberg and Redford, 1999). Diploid numbers exhibit a considerable variation between species, from $2n=9-10$ in *Akodon* sp. (Silva et al., 2006) to up to a maximum of $2n=44$ in several species.

Akodon distributes across South America, from 10° N to 50° S, covering Ecuador, Peru, Venezuela, Colombia, Bolivia, Chile, Uruguay, Brazil and Argentina (Musser and Carleton, 2005).

The paleontological record of Sigmodontinae in South America is scarce (Pardiñas et al., 2002). The most ancient fossils are *Auliscomys formosus* (Phyllotini tribe) from the Montehermosan deposit, early Pliocene (5-4 million years ago, hereafter Ma) (Reig, 1978) and *Necromys bonapartei* (Akodontini tribe) from the early Chapadmalalan deposit, Pliocene (4-3.5 Ma; Pardiñas and Tonni, 1998). The first *Akodon* fossils, *A. lorenzinii* (Reig, 1987) and *A. cf*

iniscatus (Reig, 1987), appeared in the Vorohuensan deposit, late Pliocene (2.6-2.8 Ma).

The first attempts to interpret the phylogenetic relationships between the *Akodon* species resorted to cytogenetic analyses. Using size and form differences observed in the chromosome pair no. 1, Bianchi et al. (1971) were able to group the species of the genus as three karyological assemblages. Subsequently, the concatenated analysis of cytogenetic and morphological data revealed other groups within *Akodon*, such as the species-group *A. boliviensis* (Myers et al., 1990), *A. varius* (Myers, 1989), *A. fumeus* (Myers and Patton, 1989a), as well as the group formed by *A. siberiae* plus *A. budini* (Myers and Patton, 1989b).

Also, in a study that analyzed cranium length, Hershkovitz (1990) identified 21 species in *Akodon* that were assembled as two groups. The first, the *A. boliviensis* group, comprised 10 Andean species, two species from the Cerrado and one from the Pampas, and included the species with a mean cranium length of 22 mm. The second, the *A. mollis* group, assembled individuals with larger cranium, mean=29 mm, and was formed by species of very different geographic origins, which include the Andes, the Pampas and the Atlantic Forest.

Apfelbaum and Reig (1989), analyzing isoenzymes, studied the evolutionary relationships between seven species of *Akodon* from the Andes and the Pampas, while Rieger et al. (1995) carried out similar analyses for three species of the genus that inhabit the Atlantic Forest.

The first study of *Akodon* DNA sequences (Smith and Patton, 1991), used a 401-bp fragment of the mitochondrial gene cytochrome *b* (*cyt b*) to

establish the phylogenetic relationships in the genus, more specifically between the species that inhabit the Andes. The lack of resolution in the topologies obtained led the authors to propose that the evolution experienced by the genus may be recent. Subsequently, the same authors (Smith and Patton, 1993) sequenced 801 bp of the same gene in a considerable number of *Akodon* species from western South America. Based on the analyses of distance algorithms, the authors found two groups in the genus *Akodon*. The first group was formed by the species inhabiting the forested Andean slopes, from northern Bolivia to Ecuador; the second group (without high bootstrap support values) included the species living in the higher Andes and that distributed down to the Bolivian and Paraguayan lowlands as well as the Argentinean Pampas — the same *A. boliviensis* species-group as previously proposed by Hershkovitz in 1990.

The analysis conducted by Geise et al. (2001) was the only one to obtain molecular data of Brazilian *Akodon* species that inhabit the Atlantic Forest.

In a series of subsequent studies that used molecular data to analyze Sigmodontinae phylogeny (Smith and Patton, 1999; D'Elia, 2003; D'Elia et al., 2003), the relationships between species of *Akodon* were not discussed.

The present study focuses on the phylogenetic relationships between 29 species of the genus *Akodon* using the complete sequence of the mitochondrial gene *cyt b* and the partial sequence of the nuclear gene interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP). The study also considered if the results agree with previous morphological and/or karyological analyses. In addition, divergence times for the different groupings formed by the *Akodon* species were estimated. Besides, an attempt was made to shed new light on the patterns

through which these species-groups have come to inhabit their current geographic distribution areas. In this sense, an effort was made towards including representatives of the eastern South American continent in the sample, a region that has been undersampled in other phylogenetic studies on the *Akodon* genus.

2. Materials and Methods

2.1. Specimens

Complete *cyt b* gene sequences (1,140 bp) and one 759-bp fragment of the first exon of the nuclear gene IRBP from representatives of the 29 species included in the *Akodon* genus according to Musser and Carleton (2005) were analyzed (Table 1). Two other species, *A. philipmyersi* and *Akodon* sp. ($2n=9-10$), for which the complete *cyt b* gene was not completely sequenced, were included in an additional analysis, which totaled 31 ingroups with 750 bp.

Species of the Akodontini tribe (*Oxymycterus nasutus*, *Necromys lasiurus*, and *Thaptomys nigrita*), as well as species from other tribes that belong to the Sigmodontinae subfamily (*Sigmodon hispidus*, *Abrothrix andinus*, *Calomys callosus*, and *Oryzomys megacephalus*) were used as outgroups. This choice is explained by the fact that this species set, when used as outgroups, afforded the best minimum nodes as needed to the appropriate calculation of divergence times.

2.2. Sequence data

DNA was extracted from kidneys, heart, liver and muscles (conserved at

–20 °C or in 70% ethanol), using the standard protocol described by Medrano et al. (1990). The *cyt b* sequences were isolated by polymerase chain reaction (PCR), using two sets of primers. For the first part of the *cyt b* amplification, primers MVZ 05 (light-strand) and MVZ 16 (heavy-strand) were used, while for the second part we used primers MVZ 26 (light-strand) and MVZ 14 (heavy-strand), as suggested in Smith and Patton (1993). For the IRBP amplification, the primers were A1 (light-strand) and F1 (heavy-strand), both as suggested in Jansa and Voss (2000).

The PCR products were purified with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase. All the specimens were sequenced directly from the purified PCR products using the primers mentioned above and the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, according to the manufacturer's instructions. Both DNA strands were sequenced with an ABI Prism 3100 Genetic Analyser. The sequences obtained are available in GenBank (Table 1).

2.3. Data analysis

The sequences obtained were read with the Chromas 1.45 software and aligned with the Clustal X 1.81 program (Thompson et al., 1997), using the default setting costs and manually corrected with the BIOEDIT program (Hall, 1999).

Two kinds of analysis were conducted, the first included only the *cyt b* gene, while the second used combined genes *cyt b* and IRBP. To detect the presence of character conflict between both gene partitions, in order to ascertain whether they could be used together, we used the incongruence length difference test (ILD) as described by Farris et al. (1994, 1995) using the WINCLADA version 0.9.9+ (BETA) software (Nixon, 1999).

The phylogenetic analysis was carried out using the Maximum-likelihood method (ML) obtained with the software PHYML v2.4 (Guindon and Gascuel, 2003), while the Bayesian inference (BI) was conducted with the MrBayes 3.0b4 program (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) to generate the distribution of posterior probabilities, according to the Markov chain Monte Carlo method (MCMC). No *a priori* assumptions about tree topology were made, and all searches were provided with a uniform prior.

The MCMC process was adjusted so that four chains ran simultaneously for three million generations, displaying trees every 100 generations, for a total of 10,000 trees. The first 100,000 generations were considered a burn-in and thus discarded.

The nucleotide substitution model appropriate for the ML and BI analyses was determined using the MODELTEST 3.06 program (Posada and Crandall, 1998). The ML and BI trees generated as well as the trees obtained in other studies published were compared by the Templeton (1983) and Shimodaira-Hasegawa (1999) tests.

2.4. Estimation of Divergence Times

The molecular clock hypothesis was tested for the complete *cyt b* gene using the likelihood ratio test (LRT) (Huelsenbeck and Rannala, 1997) with the PAUP* v.4.0b10 program (Swofford, 2001). For the LRT, the likelihoods of the trees with and without a molecular clock enforced were compared. Since the clock hypothesis is the simplest model, the likelihood statistics is estimated as $2(\ln L_{\text{clock}} - \ln L_{\text{no clock}})$. This statistics follows a chi-square distribution with $n - 2$ degrees of freedom, where n is the number of sequences.

Divergence times between clades were estimated using the software r8s (Sanderson, 2003), by three different methods: 1) constant DNA substitution ratio across the whole phylogeny (LF method); 2) non-parametric rate

smoothing method, which allows different substitution ratios in each branch (NPRS method); and 3) penalized likelihood (PL method), which is an intermediary method between the first two. Fossil and molecular records were used for calibration. Since fossil records of the Sigmodontinae subfamily are deficient, a time interval defined between 13 Ma (the divergence between *Sigmodon* and *Oryzomyia*, calculated by Steppan et al., 2004) and 5 Ma (for the *Prosigmodon oroscoi* fossil, obtained by Jacobs and Lindsay, 1981) was adopted for the three calculation methods above. The approach afforded the adoption of time periods for basal nodes, instead of fixed, specific date points, which allows to cover all possible cladogenesis scenarios. The split between *Akodon* and *Necromys*, dated from 3.55 Ma (Pardiñas and Tonni, 1998), was also used in the calculation of divergence time estimates.

2.5. Paleoclimatic conditions

The estimated paleoclimatic conditions and environmental changes occurred in the last 3.5 million years (Table 2) were based on palynological data published by Hooghiemstra (1984) for the Bogotá savannas, and on the studies by Mercer (1976) and Clapperton (1979) on the geological records for glaciers in South America.

3. Results

3.1. Phylogenetic analyses

As the ILD test did not reveal significant incongruence between the mitochondrial and nuclear genes ($p=0.5$), both were pooled in a combined analysis, resulting in a 1,899-bp fragment. However, as the majority of the taxa

was studied using only the *cyt b* gene to obtain information about the majority of species of *Akodon*, we performed an analysis of this gene separately.

3.2. *Cytochrome b* gene

The evolution model TVM+I+G was selected for analysis of complete *cyt b* sequence, according to the MODELTEST results (Posada and Crandall, 1998) and the values obtained were $-\ln L=11102.6562$, $AIC=22223.3125$. Base frequencies were $A=0.3334$, $C=0.3399$, $G=0.0735$, and $T=0.2533$. The rate matrix was $R(a) [A-C]=0.9454$, $R(b) [A-G]=20.4953$, $R(c) [A-T]=1.6287$, $R(d) [C-G]=0.8242$, $R(e) [C-T]=20.4953$, and $R(f) [G-T]=1.0000$. The proportion of invariable sites (I) was 0.5091. The gamma distribution parameter (G) was 1.1061. This model was employed for the Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Analysis (BI), and generated trees with very similar topologies, since neither the Templeton test ($p=0.2207$) nor the Shimodaira-Hasegawa test ($p=0.1360$) detected significant differences. Nevertheless, both tests indicated the ML tree to be the best (Templeton: length 2457ML vs. 2468BI; SH: $-\ln L13010.828$ ML vs. 13026943 BI).

Figure 1 shows one ML tree (1a) and one BI tree (1b) that included the complete *cyt b* gene sequences of 29 species of the genus *Akodon*, and of seven species used as outgroups. In both trees, *Akodon* species clustered as two major groups (Group 1 and Group 2), though with bootstrap and posterior probability (PP) values that were not very high. These two groups included the same species, but species assemblages were not exactly the same and were supported by variable bootstrap and PP values.

Group 1 was formed by two subgroups with low bootstrap and PP values

in both the ML (Figure 1a) and in the BI (Figure 1b) analyses. The subgroup named 1A presented different ML and BI results, in spite of the fact that it included the same species in both analyses. In both ML and BI analyses, *A. mimus* was a sister-group of the other species in Subgroup 1A, which pulled together *A. siberiae* + *A. budini*, and *A. albiventer*. *Akodon albiventer* is the sister-group of an assemblage formed by *A. mollis*, *A. affinis*, *A. aerosus*, *A. torques* and *A. orophilus*, which present variable relationship patterns (depending on the analysis method) and low bootstrap and PP values. The other species subgroup, called B1, comprised [*A. iniscatus* + {*A. dayi* + (*A. toba* + (*A. dolores* + *A. molinae*))}]. This subgroup's structure was thoroughly resolved and supported by high bootstrap and PP values in both ML and BI analyses.

As for Group 2, the ML analysis (Figure 1a) revealed *A. lindberghi* as sister-group (with high bootstrap values), followed by *A. azarae* (with a low bootstrap value). Next, two subgroups were formed. The first, named Subgroup 2A, included [*A. cursor* + (*A. montensis* + (*A. reigi* + (*A. paranaensis* + (*A. mystax* + *A. paranaensis*))))]. When the ML results (Figure 1a) are compared to the BI results (Figure 1b) for this subgroup, the only difference observed concerns the position of *A. azarae*, a species that was found in Subgroup 2A in the BI analysis, and outside the two sister-subgroups in the ML analysis. Subgroup 2B (Figure 1a and Figure 1b) subdivided into two sister-groups, with high bootstrap and PP values. The first sister-group assembled (*A. spegazzinii* + *A. boliviensis*) and (*A. lutescens* + *A. subfuscus*), while the second sister-group pulled together *A. juninensis* and *A. kofordi* + *A. fumeus*. In both ML and BI analyses, *A. serrensis* placed itself as a sister-group of the genus *Akodon*

(bootstrap=58%; PP=0.87, respectively). It is interesting to note that *A. serrensis* joined *T. nigrita* in the BI analysis, though with a low PP value (0.52). This relationship had previously been observed by D'Elia (2003) and by D'Elia et al. (2003) in parsimony analyses. In the light of the fact that the results obtained in these analyses were not concordant, the use of a larger number of genes may lead to a better clarification of the phylogenetic position taken by *A. serrensis*.

Two other ML and MI analyses were carried out (data not shown), using a 750-bp fragment of the *cyt b* gene and including 31 taxa of the genus *Akodon*. In these analyses, the taxa *Akodon* sp. (2n=9,10) and *A. philipmyersi* were grouped together with those taxa considered in the analysis represented in Figure 1, and joined, respectively, *A. cursor* and the species *A. azarae* and *A. lindberghi*.

3.3. Concatenated *cyt b* and *IRBP* gene analysis

Since Groups 1 and 2 did not show high bootstrap and PP values separately, the inter-relationships of species and groupings were investigated in a concatenated analysis of the *cyt b* plus *IRBP* genes. This concatenated analysis was conducted with a smaller sample size, in which care was taken to have all groups and subgroups that appeared in Figure 1 properly represented.

In the *cyt b* and *IRBP* concatenated analysis, the model selected using the MODELTEST (Posada and Crandall, 1998) was GTR+I+G, and the values were $-\ln L = 10365.4971$, $AIC = 20750.9941$. Base frequencies were $A = 0.2780$, $C = 0.3033$, $G = 0.1763$, and $T = 0.2424$. The rate matrix was $R(a) \text{ } [A-C] = 3.5772$, $R(b) \text{ } [A-G] = 11.4690$, $R(c) \text{ } [A-T] = 4.4354$, $R(d) \text{ } [C-G] = 0.5939$, $R(e) \text{ } [C-$

T]=42.9729, and R(f) [G-T]=1.0000. The proportion of invariable sites (I) was 0.5494. The gamma distribution parameter (G) was 0.7137. The concatenated *cyt b* and IRBP genes were analyzed by ML and BI, generating a tree with high similarity topologies, since both the Templeton (1983) and the Shimodaira-Hasegawa (1999) tests detected no statistically significant differences between any of the methods ($p=0.6025$; $p=0.3560$, respectively).

Figure 2 illustrates an ML tree (2a) and a BI tree (2b) generated by the concatenated analysis of the complete *cyt b* gene sequences and of a 759-bp fragment of the IRBP gene. These analyses included 12 species of the genus *Akodon*, plus seven species as outgroups. In both trees, the *Akodon* species analyzed formed two sister-groups, called Group 1 and Group 2, which were supported by high bootstrap and PP values. The species set and relationship was the same for both groups, both in the ML and in the BI analyses, and were supported by variable bootstrap and PP values.

Figure 2 also shows that in Group 1, similarly to what was observed for the complete sequence for the *cyt b* gene, Subgroup 1A assembled *A. mimus* plus *A. siberiae* and *A. torques*, while Subgroup 1B was formed by *A. iniscatus* and *A. dolores*. Group 2 presented two subgroups, with Subgroup 2A comprising [*A. cursor* {*A. montensis* (*A. mystax* + *A. paranaensis*)}]. This relationship was the same as verified in the individual analysis of the *cyt b* gene (Figure 1), but now with higher bootstrap and PP values. Subgroup 2B related *A. spegazzinii* to *A. azarae*, a species that has been shown to have variable phylogenetic relationships, depending on the method of analysis used. Once again, the species set and the group structure coincided with what was observed for the isolated *cyt b* gene analysis (Figure 1). Yet, species set and

group structure were now supported by high bootstrap and PP values.

3.4. Divergence times

The hypotheses that the sequences analyzed (cyt *b* and cyt *b* + IRBP) have evolved presenting a molecular clock was rejected by the likelihood ratio test for individual analysis of the cyt *b* gene (D=54,501, df=35, p=0.019), but not for the concatenated cyt *b* + IRBP analysis (D=23.970, df=17, p=0.120). As the cyt *b* gene did not evolve by means of a molecular clock — the opposite of what was observed for the concatenated gene analysis — we present the values obtained by the methods that do not assume a molecular clock (NPRS and PL), as well as by the method that takes this possibility into consideration (LF), for both fragments (cyt *b* and cyt *b* + IRBP).

In the three analyses conducted with the cyt *b* gene, the methods LF and PL produced similar results, while the NPRS method always presented higher values. This observation has been reported in the literature, especially when the tree has short branches (Sanderson, 2003; Almeida et al., 2007), and therefore NPRS results will not be presented here. In the concatenated gene analysis, the trees showed greater branch lengths, without considerable differences.

Based on the data obtained in the phylogenetic analyses in Figures 1 and 2, the following divergences were observed regarding the nodes in both figures (Table 2): (a) between *Akodon* and *Necromys* in node I; (b) between Group 1 and Group 2 in node II; (c) between Subgroups 1A and 1B in node III; (d) between *A. lindberghi* and Subgroups 2A and 2B in node IV; (e) between Subgroups 2A and 2B in node V; (f) between the species that inhabit the mountain forest at average altitudes in the Andes cordillera in node VI; (g)

between the species that inhabit the Bolivian, Paraguayan and Argentinean lowlands in node VII; (h) between the species of the eastern Brazilian coast in node VIII; and finally (i) between the species that inhabit the higher slopes of the Andes cordillera in node IX. The charts in Figure 3 show the lines that represent the Pleistocene-Pliocene transition and the climate intervals as described by Hooghiemstra (1984). Figure 3 and Table 2 show that the differences between the means calculated for each node and compared between the five models were low between nodes II to VI (under 200 thousand years), both in the individual *cyt b* gene and in the concatenated gene analysis. Even lower were the differences between the means observed for nodes VII to IX (100 thousand years). Moreover, the differences between interquartiles show that these means do not vary very much (approximately 1 million years between nodes II to IV, and under between nodes V to IX).

3.5. Measurements

Of the 29 species analyzed in the present study, some have been included in samples of previous investigations, in which cranial morphometric measurements were conducted for a sample size of more than 5 adult individuals. Table 1 shows two of these measurements, condyloincisive length (CIL) and total length (TL), which were used in the present study to correlate molecular and geographical results for the specimens investigated here and obtained from the same species as used in those investigations. These comparisons are summarized in Figure 4. As regards CIL, no differences were observed in the distribution of this measurement across any of the molecular groupings formed. However, when geographic origin of specimens is compared,

two groups are formed: one that assembled the Andean species (with CIL values between 20.06 and 25.62 mm), and one that assembled the non-Andean species (with CIL values between 26.20 and 27.73 mm). As for TL, the difference is not so remarkable, with values overlapping for groups. The species inhabiting the Andes had TL values that varied from 149.40 to 195.30 mm, while the non-Andean species had TL ranging from 192.90 to 211.10 mm. The exception was *A. mystax*, which showed CIL and TL values similar to the Andean species measurements, though it is not an Andean species.

4. Discussion

The Akodontini tribe suffered major taxonomic rearrangements since the first molecular investigations on members of this tribe were done. Nevertheless, few molecular studies have been carried out to establish the relationships between most *Akodon* species. The few molecular studies published analyzed the relationships between some species-groups (Smith and Patton, 1991; Geise et al., 2001), or utilized some species of the genus in an attempt to understand the evolution of the Akodontini tribe (Smith and Patton, 1993; D'Elia, 2003; D'Elia et al., 2003) or of the Sigmodontinae subfamily (Smith and Patton, 1999).

4.1. Morphological and biogeographic patterns in Akodon

All the analyses carried out in the present study — both with the *cyt b* gene isolated and with the concatenated *cyt b* + IRBP genes — have shown that the *Akodon* species are organized as two monophyletic groups with bootstrap and PP values that were low in the *cyt b* analysis, but that were high in the concatenated *cyt b* + IRBP gene analyses. In this two-group

arrangement, it can be observed that each of the two Andean groups (Subgroups 1A and 2B) are more closely related to one of the lowland clades (Subgroups 1B and 2A), as compared to the other Andean group. The fact that the *Akodon* species that inhabit the Andes did not form, according to the gene sequences, a monophyletic clade has also been reported by Smith and Patton (1993), though the groupings found by these authors did not present high bootstrap values. In the analysis of some morphologic characters in the present study (CIL and TL), *Akodon* species were found to form two groups, one comprising the Andean species, and one the non-Andean species. Hershkovitz (1990) also tried to differentiate the *Akodon* species into two groups by evaluating cranium size. Again, two groups were formed, one with a small cranium (*A. boliviensis*) and one with a large cranium (*A. mollis*). In our study we evaluated the data previously obtained by Hershkovitz (1990) using the Templeton and the Shimodaira-Hasegawa tests, and both procedures showed significant differences ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$, respectively), suggesting that the molecular phylogeny of genes does not correspond to the groups proposed by Hershkovitz (1990).

Some of the species groupings formed in the present molecular analysis are in accordance with the groupings assembled by means of other tools that have been reported in the literature. Therefore, just like established by Myers (1989) using morphologic measurements and ecological data, the *A. varius* group is formed by species whose bodily size is large and that inhabit the mid- and lowlands on the eastern Andes, the Bolivian plains and the southern Paraguayan and north-central Argentinean territories.

The sample analyzed in the present study included several species of the *A. varius* group, which were recovered as a monophyletic subgroup with high bootstrap and PP values. *Akodon iniscatus* was the sister-group of the species of the *A. varius* group in Subgroup 1B. Such relationship between the *A. varius* and the *A. iniscatus* group was not observed by Myers (1989). The species *A. cursor* and *A. montensis* of the Atlantic Forest came together in a group called *cursor*, as proposed by Rieger et al. (1995), who suggested that this group is composed by species of significant morphologic similarities. The *cyt b* analysis of the *A. cursor* group presented low bootstrap and PP values, though the concatenated gene analysis *cyt b* + IRBP afforded to recover the group at high bootstrap and PP values. Two other partial correspondences found relate to the most recent group that inhabits the highlands, i.e., Subgroup 2B, in which the *A. fumeus* (Myers and Patton, 1989a) and the *A. boliviensis* (Myers et al., 1990) were grouped. The existing differences between groupings, described in the literature and in our data, lie in the position occupied by *A. juninensis*. The species, according to our analyses, would be more closely related to the taxa forming the *A. fumeus* group — an observation previously made by Smith and Patton (1993).

4.2. Karyological patterns

Using chromosomal data, Bianchi et al. (1971) proposed the occurrence of a reduction in chromosome numbers — as a result of centric fusions — as a probable mechanism to explain the chromosomal evolution in *Akodon*. Therefore, based on the differences in morphology, telocentric and metacentric chromosomes, and on the size of chromosome pair no. 1, the authors were able

to group the *Akodon* species as three karyological assemblages (one of which was later proved to be a group of species of a tribe called Abrothricine, based on molecular data, by Smith and Patton, 1993). The Templeton and Shimodaira-Hasegawa tests were used to discover whether these two chromosomal groups would somehow correspond to the molecular Groups 1 and/or 2 as revealed in the present study. Both tests unveiled significant differences ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$, for each test, respectively), which indicated that no correspondence exists between the pair no. 1 chromosomal phylogeny and the molecular phylogeny.

Figure 5 illustrates a maximum likelihood phylogram for the *Akodon* molecular phylogeny (cyt *b* gene), including the karyotypes (diploid numbers and fundamental numbers are indicated in each branch), the representation of the cranium size in subclades, and the geographic location of species, when possible. As a whole, each of the four subclades (1A, 1B, 2A and 2B) exhibited a unique karyological pattern, but a trend towards few changes in the number of chromosomal arms was observed as a pattern in common. In the four subclades, the greatest chromosomal variations between species occurs in the diploid numbers. All species within Subgroup 1A have FN=40, and some also have diploid numbers of 40, such as *A. mimus* and *A. albiventer*. Three of these species, *A. siberiae*, *A. budini*, and *A. aerosus*, had $2n$ reduced to 38, probably due to centric fusion. Three other species in that subclade underwent drastic reduction in diploid number, namely to $2n=22-26$ (*A. mollis*, *A. torques*, and *A. orophilus*). The species in Subgroup 1B exhibited a karyotypic variation of $2n=33$ up to $2n=44$, but all those species that were karyotyped shared a high FN (42-44).

Akodon lindberghi is the sister-group of Group 2, with $2n=42$, $FN=42$. This species joins *A. azarae*, with $2n=38$, $FN=38$. After, the group splits into two subclades, each exhibiting a different chromosomal pattern. Subclade 2A, characterized by a large karyotypic variation, has species with high chromosomal numbers ($2n/FN=44$, *A. reigi* and *A. paranaensis*) as well as two cryptic species that inhabit the Atlantic Forest, namely, *A. montensis*, with $2n=24-26$, $FN=44$, and *A. cursor*, with $2n=14-16$ $FN=18-26$. One single karyotype was observed for all species in Subgroup 2B, with $2n=40$ $FN=40$.

4.3. Temporal and biogeographic patterns

It is difficult, even today, to locate the area at which *Akodon* diversified. The proposal in Figure 6a illustrates the current distribution of the subgroups as obtained by the molecular analysis. It is possible that a first cladogenic event occurred approximately 2.6 Ma. Roughly 2.3 Ma, Subgroups 1A and 1B may have split up (Figure 6b), with the former nowadays occurring in the Andean forests and the latter in the South American lowlands (Figure 6b). Subgroup 1A may have started a differentiation process into the extant species 2 Ma, and Subgroup 1B 1.6 Ma. Group 2 presented its first differentiation ca. 1.9 Ma, when *A. lindberghi* diverged from the group. In turn, Subgroups 2A and 2B split up 1.6 Ma, with the former currently found in the Atlantic Forest, after undergoing a diversification process into its extant species 1.5 Ma. It is also hypothesized that Subgroup 2B, in turn, which inhabits the Andes, has colonized the highlands of the region, in bunchgrass and shrub areas, when it started its diversification process into its extant species 1.4 Ma (Figure 6c). It is interesting to note that the separation into groups and into subgroups occurred within a very short time

length (Table 2), which may explain the lack of resolution observed in the analysis of the *cyt b* gene alone. Such lack of resolution was solved when the *cyt b* and IRBP genes were analyzed conjointly, as high bootstrap values were obtained both for the groups and subgroups analyzed.

The last 3.5 million years have been divided into four time intervals, based on the palynologic data (Hooghiemstra, 1984) and in studies about glaciers (Mercer, 1976; Clapperton, 1979). The first interval, (3.5-3.21 Ma) is characterized by the presence of sub-páramo and páramo vegetations (palynologic data) and by and expansion of glaciers. In a second time period (3.21-2.5 Ma), the higher plains were covered by Andean forests, and there is no record of glaciers expansions. Klammer (1984) proved that more than 2.5 Ma the sea level raised 180 meters above the present level, which, according to Marroig and Cerqueira (1997), may have led to the origination of a large lake in the Amazonian river basin and to a marine transgression in the La Plata-Paraguay depression that reached the feet of the Andean cordillera, stretching beyond Assunción in Paraguay. According to Cerqueira (1982), this scenario affords to hypothesize that elements of the Andes (in Peru, Bolívia and other countries) are more closely related to the southern lineages than to the elements of the eastern Brazilian lowlands. The phylogenetic trees obtained in the present study agree with this scenario, in which one Andean group of species relates more closely to a group of South American taxa than to the group of Brazilian lowland species. Our calculations for divergence times confirm that this cladogenesis coincides with the great Fouaratian transgression, roughly 2.5 Ma (Stearns, 1978). In a third period, between 2.5 and 0.96 Ma, the high plains were covered by open Sub-páramo vegetation. At

several instances, these plains showed Páramo grass vegetation, with intermittent forest vegetation at short intervals, in a period in which glaciers were also observed. The separation into subgroups and the diversification as the extant species may have occurred in a time when the cold climate altered the vegetation and, in consequence, favored the differentiation of subgroups and species.

In summary, the likely picture is that a “Proakodon” lineage with diploid numbers and chromosomal arms above 40 (42-44) emerged ca. 3.6 Ma, which split up as two large assemblages, which, in turn, split as four subclades. In this differentiation process, a crucial role was played by the orogenic, glacial and vegetation alterations occurred in the South American continent. Some of these speciation processes were accompanied by extraordinary genomic or karyological rearrangements as described by Fagundes et al. (1998) and Ventura et al. (2006).

Acknowledgments

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Organization of the American States (OAS) have supported this study. The authors are grateful to Luciano S. Silva for technical help, to Dr. Mara H. Hutz by several facilities provided, to Dr. Jorge A. Villwock by discussion of the geology of the Coastal Plain, to Dr. Ana L. Garcia by help in the preparation of the figures and Felix Nonnenmacher for reviewing the English of the manuscript.

Table 1: Species analyzed in this study listed according to the groups formed and shown in Fig. 1, GenBank access numbers of the cytochrome *b* and IRBP genes, cranial and external measurements (CIL= condyloincisive length; TL= total length) from literature series, and habitat characterization of the four subclades. *A. philipmyersi* and *Akodon* sp (2n=9-10) included in the 750-bp fragment of the *cyt b* gene.

Species	Cyt b Access No.	IRBP Access No.	Measurements*		Habitat
			CIL	TL	
<i>A. serrensis</i>	EF622508	EF626799	25.7 ⁽¹⁾	189.7 ⁽¹⁾	Atlantic forest ^(2,3,4)
Subgroup 1A = Andean Forests Group					
<i>A. mimus</i>	M35710	AY277425	24.51 ⁽⁵⁾	194.4 ⁽⁵⁾	Forested slopes of the
<i>A. siberiae</i>	AY273909	AY277430	24.88 ⁽⁵⁾	191 ⁽⁵⁾	Andes extending from
<i>A. budini</i>	AY605060		25.09 ⁽⁷⁾	176.9 ⁽⁷⁾	Argentina through
<i>A. albiventer</i>	AY494838		23.67 ⁽⁵⁾	171.8 ⁽⁵⁾	Peru to Ecuador ⁽⁶⁾
<i>A. affinis</i>	AY196164				
<i>A. aerosus</i>	M35704		25.62 ⁽⁵⁾	190.2 ⁽⁵⁾	
<i>A. mollis</i>	U03546		23.14 ⁽⁵⁾	169.8 ⁽⁵⁾	
<i>A. orophilus</i>	U03547				
<i>A. torques</i>	M35700	AY277432	24.4 ⁽⁵⁾	195.3 ⁽⁵⁾	
Subgroup 1B = South Lowlands Group					
<i>A. iniscatus</i>	AY273917	AY277424			Eastern slopes of the
<i>A. dayi</i>	AY605059		27.7 ⁽⁸⁾	197.1 ⁽⁸⁾	Andes and adjacent
<i>A. toba</i>	AY273910	AY277433	27.3 ⁽⁸⁾	203.7 ⁽⁸⁾	lowlands ⁽⁸⁾
<i>A. dolores</i>	AY273904	AY277423			
<i>A. molinae</i>	AY494839				
Grupo 2					
<i>A. lindberghi</i>	AF184057		22.5 ⁽⁹⁾	155 ⁽⁹⁾	Atlantic forest ^(2,3,10)
<i>A. azarae</i>	EF622507	EF626798	22.5 ⁽¹⁾	199 ⁽¹⁾	Pampas
Subgroup 2A = Atlantic Forest Group					
<i>A. cursor</i>	EF206814	EF626797	27.73 ⁽¹¹⁾	211.4 ⁽¹¹⁾	Atlantic forest <i>sensu</i>
<i>A. montensis</i>	EF206813	EF626796	26.53 ⁽¹¹⁾	202.7 ⁽¹¹⁾	<i>lato</i> ⁽¹²⁾
<i>A. reigi</i>	AY195865		26.2 ⁽¹³⁾	198.9 ⁽¹³⁾	
<i>A. mystax</i>	AY273907	AY277428	22.95 ⁽¹⁾	158.7 ⁽¹⁾	
<i>A. paranaensis</i>	AY195866	EF626795	27.09 ⁽⁴⁾	192.9 ⁽⁴⁾	
Subgroup 2B = Andean Grassland Group					
<i>A. boliviensis</i>	M35691		22.4 ⁽⁵⁾	155.7 ⁽⁵⁾	Grasslands between
<i>A. spegazzinii</i>	AY196165	AY277431	23.09 ⁽⁵⁾	165.5 ⁽⁵⁾	2500m and 4500m
<i>A. subfuscus</i>	M35695		22.17 ⁽⁵⁾	159.6 ⁽⁵⁾	elevation in Andes of
<i>A. lutescens</i>	M35693		21.33 ⁽⁵⁾	152.7 ⁽⁵⁾	Peru and Altiplanes
<i>A. juninensis</i>	M35698		20.06 ⁽⁵⁾	149.4 ⁽⁵⁾	of Bolivia ⁽⁵⁾
<i>A. fumeus</i>	AY605061		23.48 ⁽¹⁴⁾	171.2 ⁽¹⁴⁾	
<i>A. kofordi</i>	M35697		23.15 ⁽¹⁴⁾	173.9 ⁽¹⁴⁾	
<i>A. philipmyersi</i>	AY702967		21.6 ⁽¹⁵⁾	152.7 ⁽¹⁵⁾	
<i>Akodon</i> sp.	DQ631966				
Outgroups					
<i>Abrothrix andinus</i>	AF108671	AY277418			
<i>Calomys callosus</i>	AY275113	AY277440			
<i>Necomys lasiurus</i>	EF622509	EF626801			
<i>Oryzomys megacephalus</i>	AY275124	AY277465			
<i>Oxymycterus nasutus</i>	EF661854	EF661855			
<i>Sigmodon hispidus</i>	AF108702	AY277479			
<i>Thaptomys nigrita</i>	EF206815	EF626800			

*Only series in which more than 5 individuals were measured were used. ⁽¹⁾ HersHKovitz, 1998; ⁽²⁾ Geise *et al.*, 1996; ⁽³⁾ Geise *et al.*, 1998; ⁽⁴⁾ Christoff *et al.*, 2000; ⁽⁵⁾ Myers *et al.*, 1990; ⁽⁶⁾ Smith and Patton, 1993; ⁽⁷⁾ Myers and Patton, 1989a; ⁽⁸⁾ Myers, 1989; ⁽⁹⁾ HersHKovitz, 1990; ⁽¹⁰⁾ Geise *et al.*, 2001; ⁽¹¹⁾ Geise *et al.*, 2005; ⁽¹²⁾ This Paper; ⁽¹³⁾ González *et al.*, 1998; ⁽¹⁴⁾ Myers and Patton, 1989b; ⁽¹⁵⁾ Pardiñas *et al.*, 2005.

Table 2: Divergence times calculated for the nodes from I to VIII in Figs. 1 and 3, according to the LF, PL, and NPRS. Climate types and respective ranges according to Hooghiemstra (1984), Mercer (1976) and Clapperton (1979).

Nodes	Methods	Mean	Median	Interquartile Range 25%	Interquartile Range 75%
<i>Akodon-Necromys</i> node I	LF to cyt <i>b</i>	3.6	3.5	3.5	3.7
	PL to cyt <i>b</i>	3.6	3.5	3.5	3.7
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	4.2	4	3.5	5
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	4.2	4	3.5	5
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	4.2	4	3.5	5
Clade 1-2 Temperate climate=3.2-2.5 node II	LF to cyt <i>b</i>	2.6	2.6	2.2	3
	PL to cyt <i>b</i>	2.6	2.6	2.2	3
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	2.8	2.7	2.2	3.4
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	2.8	2.7	2.2	3.3
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	2.8	2.6	2.3	3.3
Clade 2A- 2B Cold climate=2.5-0.9 node III	LF to cyt <i>b</i>	2.3	2.3	2	2.7
	PL to cyt <i>b</i>	2.3	2.3	2	2.7
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	2.5	2.4	2	3
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	2.5	2.4	2	3
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	2.4	2.3	2	2.9
<i>A. lindgerghi</i> -clade 1AB Cold climate =2.5-0.9 node IV	LF to cyt <i>b</i>	1.9	1.9	1.6	2.3
	PL to cyt <i>b</i>	1.9	1.9	1.6	2.3
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	2.1	2	1.6	2.6
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	2.1	2	1.6	2.5
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	2.1	2	1.8	2.5
Clade 1A- 1B Cold climate =2.5-0.9 node V	LF to cyt <i>b</i>	1.6	1.6	1.3	1.9
	PL to cyt <i>b</i>	1.6	1.6	1.3	1.9
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	1.7	1.7	1.4	2.1
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	1.7	1.7	1.4	2.1
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	1.8	1.7	1.5	2.1
Clade 1A Andean Forests Cold climate =2.5-0.9 node VI	LF to cyt <i>b</i>	2.0	2.0	1.7	2.4
	PL to cyt <i>b</i>	2.0	2.0	1.7	2.4
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	2.1	2.0	1.7	2.5
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	2.1	2.0	1.7	2.5
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	2.0	1.9	1.7	2.4
Clade 1B South Lowlands Cold climate =2.5-0.9 node VII	LF to cyt <i>b</i>	1.5	1.5	1.2	1.8
	PL to cyt <i>b</i>	1.5	1.5	1.2	1.8
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	1.6	1.6	1.3	1.9
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	1.6	1.6	1.3	1.9
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	1.6	1.5	1.3	1.9
Clade 2A Atlantic Forest Cold climate =2.5-0.9 node VIII	LF to cyt <i>b</i>	1.6	1.6	1.3	1.9
	PL to cyt <i>b</i>	1.6	1.6	1.3	1.9
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP	1.7	1.7	1.4	2.1
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP	1.7	1.7	1.4	2.1
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP	1.8	1.7	1.5	2.1
Clade 2B Andean Grasslands Cold climate =2.5-0.9 node IX	LF to cyt <i>b</i>	1.4	1.4	1.1	1.6
	PL to cyt <i>b</i>	1.4	1.4	1.1	1.6
	LF to cyt <i>b</i> +IRBP				
	PL to cyt <i>b</i> +IRBP				
	NPRS to cyt <i>b</i> +IRBP				

Figure legends

Figure 1: Phylogenetic relationships among the species of *Akodon* and outgroups. (a) Maximum likelihood phylogeny with bootstrap values below branches in the left tree and (b) Bayesian trees with posterior probabilities below branches in the right tree. Boxes show

the groups and subgroups, circled numbers in the box represent group names and circled letters represent subgroups. Roman numerals represent dated nodes

Figure 2 : Phylogenetic relationships among the *Akodon* species and outgroups included in the analyses. (a) Maximum likelihood phylogeny with bootstrap values inside branches in the left tree and (b) Bayesian trees with posterior probabilities values indicated inside nodes branches in the right tree. Boxes show the groups and subgroups, circled numbers in the box represent groups names and circled letters represent subgroups.

Figure 3: Box plot of divergence dates for each node for methods PL and LF for *cyt b*, and NPRS, PL and LF in the concatenated genes. Boxes are divided in quartiles. Horizontal lines are limit between geological epochs: solid line for the interval of climate (temperate climate=3,2-2,5, cold climate=2,5-0,9), and dashed line Miocene-Pliocene boundaries (5.3 Ma line - point - line) or Pliocene-Pleistocene boundaries (1.8 Ma line large- line short).

Figure 4: Chart illustrating the difference in size of *Akodon* species as measured by condyloincisive length (a) and total length (b). Sources of the measurements

are found in Table 1. Rectangle = *A. serresnsis*; Triangle = *A. lindberghi* and *A. azarae*; Square = *A. mystax*; Rhomb = species with large skull and body and, Circle = species with small skull and body.

Figure 5: Maximum likelihood phylogram for the *Akodon* and outgroups included in the analyses under the TVM+I+G model. Numbers above branches refer to ML bootstraps percentages. Boxes show the groups and subgroups. (1) Geise et al., 1998; (2) Patton, 1986; (3) Vitullo et al., 1986; (4) Myers and Patton, 1989a; (5) Bianchi et al., 1971; (6) Lobato et al., 1982; (7) Patton et al., 1990; (8) Hsu and Benirschke, 1973; (9) Barros et al., 1990; (10) Blaustein et al., 1992; (11) Svartman and Almeida, 1994; (12) Yonenaga et al., 1975; Sbalqueiro and Nascimento, 1996; Fagundes et al., 1998; (13) Liascoviich and Reig, 1989; Fagundes et al., 1997; Geise et al., 1996; (14) González et al., 1998; (15) Sbalqueiro et al., 1986; (16) Myers et al., 1990.

Figure 6: Geographic distribution of groups obtained by molecular analysis (a) current distribution of subgroups; (b) diversification of Group 1 and of Subgroups 1A and 1B; (c) diversification of Group 2 and of Subgroups 2A and 2B. Star = *A. lindberghi*; Circle = *A. azarae*.

References

Almeida, F.C., Bonvicino, C.R., Cordeiro-Estrela, P., 2007. Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 449-466

Apfelbaum, L.I., Reig, O.A., 1989. Allozyme genetic distance and evolutionary relationships in species of Akodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). Biol. J. Linn. Soc. 38, 257-280.

Barros, M.A., Liascovich, R., Gonzalez, L., Lizarralde, M. Reig, O.A., 1990. Banding pattern comparisons between *Akodon iniscatus* and *Akodon puer* (Rodentia, Cricetidae). Mamm. Biol. 55, 115-127.

Bianchi, N.O., Reig, O.A., Molina, O.J., Dulout, F.N., 1971. Cytogenetics of the South American akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report on Argentinian and Venezuelan forms. Evolution 21, 724-736.

Blaustein, S.A., Liascovich, R., Apfelbaum, L.I., Daleffe, L., Barquez, R.M., Reig, O.A., 1992. Correlates of systematic differentiation between two closely related allopatric populations of the *Akodon boliviensis* group from NW Argentina (Rodentia: Cricetidae). Mamm. Biol. 57, 1-13.

Cerqueira, R., 1982. South American landscapes and their mammals. In: Mares, M.A., Genoways, H.H. (Eds.), Mammalian biology in South America, The Pymatuning symposia in ecology. Special publication series. University of Pittsburgh, pp. 53-55.

Christoff, A.U., Fagundes, V. Sbalqueiro, I.J., Mattevi, M.S., Yonenaga-Yassuda, Y., 2000. Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *J. Mammal.* 81, 838-851.

Clapperton, C.M., 1979. Glaciation in Bolivia before 3.27 Myr. *Nature* 277, 375-377.

D'Elia, G., 2003. Phylogenetics of sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Gladistics* 19, 307-323.

D'Elia, G., González, E.M., Pardiñas, U.F.J., 2003. Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muridea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mamm. Biol.* 68, 1-14.

Eisenberg, J.F., Redford, K.H., 1999. *Mammals of the Neotropics: the central Neotropics*. University of Chicago Press. Chicago.

Fagundes, V., Vianna-Morgante, A.M., Yonenaga-Yassuda, Y., 1997. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14,15 and 16). *Chromosome Res.* 5, 228-232.

Fagundes, V.A., Christoff, A.U., Yonenaga-Yassuda, Y., 1998. Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the Neotropical

species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ($2n=16, 15$ and 14). *Hereditas* 129, 263-274.

Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.

Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44, 570-572.

Geise, L., Cerqueira, R., Seuánez, H.N., 1996. Karyological characterization of a new population of *Akodon lindberghi* (Rodentia, Sigmodontinae) in Minas Gerais state (Brazil). *Caryologia* 49, 57-63.

Geise, L., Canavez, F.C., Seuánez, H.N., 1998. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. *J. Hered.* 89, 158-163.

Geise, L., Smith, M.F., Patton, J.L., 2001. Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: Mitochondrial DNA sequence analysis. *J. Mammal.* 82, 92-101.

Geise, L., Moraes, D., da Silva, H.S., 2005. Morphometric differentiation and distributional notes of three species of *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae, Akodontini) in the Atlantic coastal area of Brazil. *Arquivo do Museu Nacional, Rio de Janeiro* 63, 63-74.

González, E.M., Langguth, A., De Oliveir, L.F., 1998. A new species of *Akodon* from Uruguay and Southern Brazil (Mammalia: Rodentia: Sigmodontinae). Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo 191, 1-8.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simples, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696-704.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98.

Herskovitz, P., 1990. Mice of the *Akodon boliviensis* size class (sigmodontinae, Cricetidae), with the description of two new species from Brazil. Fieldiana: Zool. 57, 1-35.

Herskovitz, P., 1998. Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with description of a new genus and six new species. Bonn. Zool. Beitr. 47, 193-256.

Hooghiemstra, H. 1984. Vegetacional and climatic history of the high plain of Bogota, Colombia. Dissertations Botanicae—Band 79. 337p.

Hsu, T.C., Benirschke, K., 1973. *Akodon orophilus*. In: Hsu, T.C., Benirschke, K. (Eds.), *An Atlas of Mammalian Chromosomes*, Springer-Verlag, New York, 7: 34.

Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in an evolutionary context. *Science*, 276, 227-232.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.

Jacobs, L.L., Lindsay, E.H., 1981. *Prosigmodon oroscoi*, a new sigmodont rodent from the late Tertiary of Mexico. *J. Paleontol.* 55,425–430.

Jansa, S.A., Voss, R.S., 2000. Phylogenetic studies on didelphid marsupials I. introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *J. Mamm. Evol.* 7, 43-77.

Klammer, G., 1984. The relief of the extra-Andean Amazon basin. In: Sioli, H. (Ed.), *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Lancaster.

Liascovich, R., Reig, O.A., 1989. Low chromosomal number in *Akodon cursor montensis* Thomas, and karyologic confirmation of *Akodon serrensis* Thomas in Misiones, Argentina, *J. Mammal.* 70, 391-395.

Lobato, L., Cantos, G., Araujo, B., Bianchi, N.O., Merani, S., 1982. Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). X. *Akodon mollis*: a species with XY females and b chromosomes. *Genetica* 57, 199-205.

Maia, V., Langguth, A. 1981. New karyotypes of Brazilian Akodont rodents with notes on taxonomy. *Mamm. Biol.* 46, 241-249.

Marroig, G., Cerqueira, R., 1997. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of amazonian diversification. *J. Comp. Biol.* 2, 103-119.

Medrano, J.F., Aasen, E., Sharrow, L., 1990. DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8, 43.

Mercer, J., 1976. Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Res.* 6, 125–166.

Musser G.G., Carleton, M.D., 2005. Superfamily Muroidea. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 894-1531.

Myers, P., 1989. A preliminary revision of the *varius* groups of *Akodon* (*A. dayi*, *dolores*, *molinae*, *neocenus*, *simulator*, *toba*, and *varius*). In: Eisenberg, J.F.,

Redford, K.H. (Eds.) *Advances in Neotropical Mammalogy*. Sandhill, Gainesville, pp 5-54.

Myers, P., Patton, J.L., 1989a. *Akodon* of Peru and Bolivia – Revision of the *Fumeus* group (Rodentia: Sigmodontinae). *Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* 721: 1-35.

Myers, P., Patton, J.L., 1989b. A new species of *Akodon* from the cloud forests of eastern Cochabamba department, Bolivia (Rodentia: Sigmodontinae). *Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* 720: 1-28.

Myers, P., Patton, J.L., Smith, M.F., 1990. A review of the *boliviensis* groups of *Akodon* (Muridae: Sigmodontinae), with emphasis on Peru and Bolivia. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan*.

Nixon, K.C., 1999. *Winclada* (beta) Version 0.9.9. Published by the author, Ithaca, NY.

Pardiñas, U.F.J., Tonni, E.P., 1998. La procedencia estratigráfica y edad de los más antiguos muroideos (Mammalia, Rodentia) de América del Sur. *Ameghiniana*, 35, 473-475.

Pardiñas, U.F.J., Tonni, E.P., 1998. Procedencia estratigráfica y edad de los más antiguos muroideos (Mammalia, Rodentia) de América del Sur. *Ameghiniana* 35, 473-475.

Pardiñas, U.F.J., D'Elia, G., Ortiz, P.E., 2002. Sigmodontinos fósiles (Rodentia: Muridae: Sigmodontinae) de América del Sur: Estado actual de su conocimiento y perspectiva. *Mastozoología Neotropical* 9, 209-252.

Pardiñas, U.F.J., D'Elia, G., Cirignoli, S. Suarez, P., 2005. A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from the northern campos grasslands of Argentina. *J. Mammal.* 86, 462-474.

Patton, J.L., 1986. Patrones de distribución y especiación de fauna de mamíferos de los bosques nublados andinos del Peru. *Na. Mus. Hist. Nat. Valparaíso* 17, 87-94.

Patton, J.L., Myers, P., Smith, M.F., 1990. Vicariant versus gradient models of diversification: The small mammal fauna of eastern Andean slopes of Peru. In: Peters, G., Hutterer, R. (Eds.), *Vertebrates in the Tropics*. Museum Alexander Koenig, Bonn.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

Reig, O.A., 1978. Roedores cricetideos del Plioceno superior de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Publicaciones del Museo Municipal de Ciencias Naturales de Mar del Plata "Lorenzo Scaglia"* 2, 164-190.

Reig, O.A., 1987. An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Fieldiana Zool.* 39, 347-399.

Rieger, T.T., Langguth, A., Wiener, T.A., 1995. Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* species group (Rodentia, Cricetidae). *Biochem. Genet.* 33, 283-295.

Sanderson, M.J., 2003. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19, 301-302.

Sbalqueiro, I.J., Kiku, M., Lacerda, M., El Achkar, D., Arnt, L.R., 1986. Estudos cromossômicos em roedores da família Cricetidae coletados no Paraná. *Cienc. Cult.* 38, 926.

Sbalqueiro, I.J., Nascimento, A.P., 1996. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 19, 565-569.

Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1114-1116.

Silva, M.J., Patton, J.L., Yonenaga-Yassuda, Y., 2006. Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* ($2n=10$ and $2n=16$) from Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 29, 469-474.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1991. Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural population of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol. Biol. Evol.* 8, 85-103.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1993. The diversification of South-American murid rodents: evidence from mitochondrial-DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biol. J. Linn. Soc.* 50, 149-177.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome *b*. *J. Mamm. Evol.* 6, 89-128.

Stearns, C.E., 1978. Pliocene-Pleistocene emergence of the Moroccan Meseta. *Geol. Soc. Am. Bull.* 89, 1630–1644

Steppan, S.J., Adkins, R.M., Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst. Biol.* 53, 533-553.

Svartman, M., and Almeida, E.J.C., 1994. The karyotype of *Akodon lindberghi* Hershkovitz, 1990 (Cricetidae, Rodentia). *Genet. Mol. Biol.* 17, 225-227.

Swofford, D.L., 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4.0b10, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Tate, G.H.H., 1932. The taxonomic history of the South and Central American akodont rodent genera: *Thaptomys*, *Deltamys*, *Thalpomys*, *Hypsimys*, *Bolomys*, *Chroeomys*, *Abrothrix*, *Scotinomys*, *Akodon* (*Chalcomys* and *Akodon*), *Microxus*, *Podoxymys*, *Lenoxus*, *Oxymycterus*, *Notiomys*, and *Blarinomys*. Amer. Mus. Novitates 582, 1-32.

Templeton, A., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. Evolution 37, 221–244.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24, 4876-4882.

Ventura, K., Silva, M.J.J., Fagundes, V., Yonenaga-Yassuda, Y., 2006. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). Cytogenet. Genome Res., 115, 169-175.

Vitullo, A.D., Merani, M.S., Reig, O.A., Kajon, A.E., Scaglia, O., Espinosa, M.B., Perez-Zapata, A., 1986. Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae): new karyotypes and chromosomal banding patterns of Argentinean and Uruguayan forms. *J. Mammalogy* 67, 69-80.

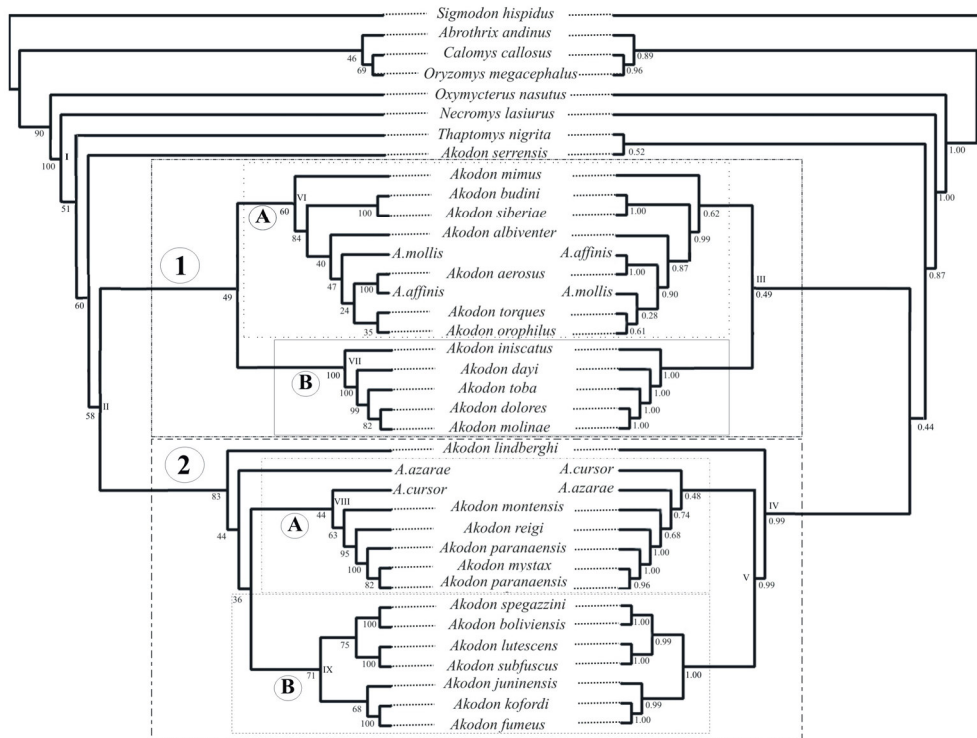


Figure 1

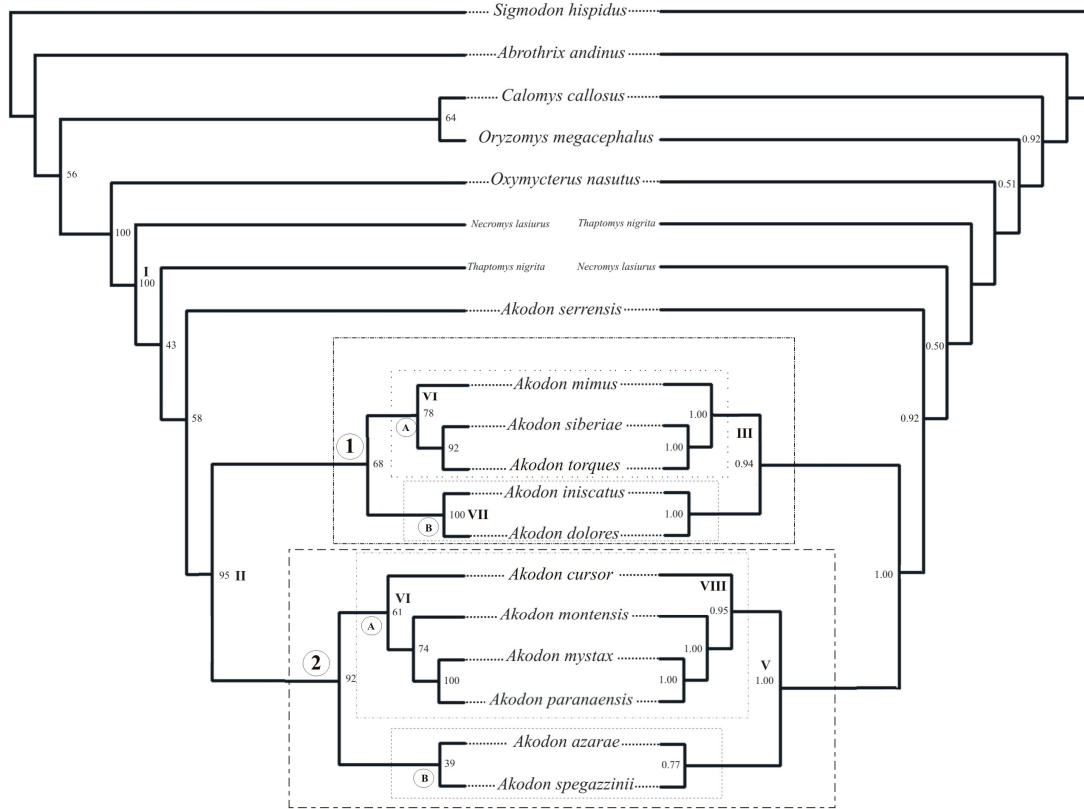


Figure 2

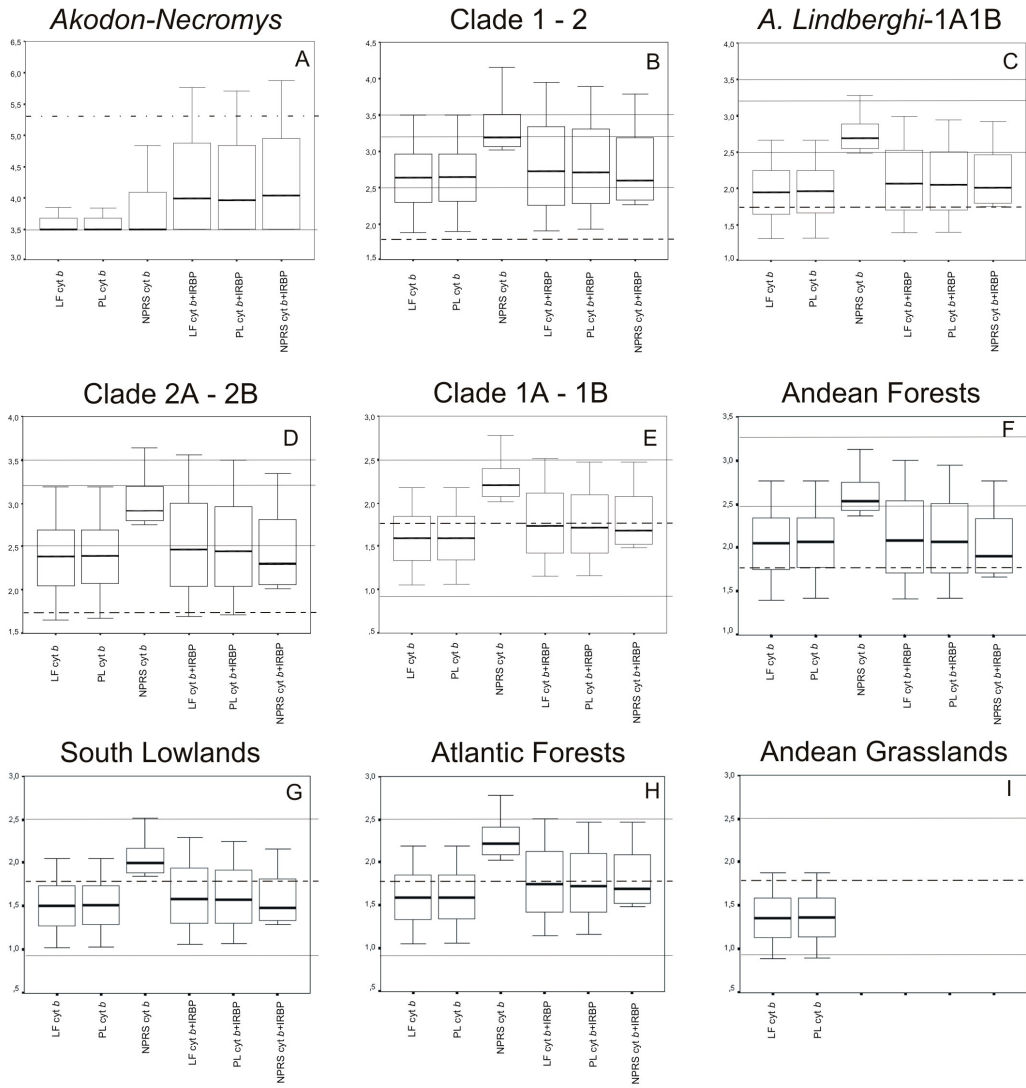


Figure 3

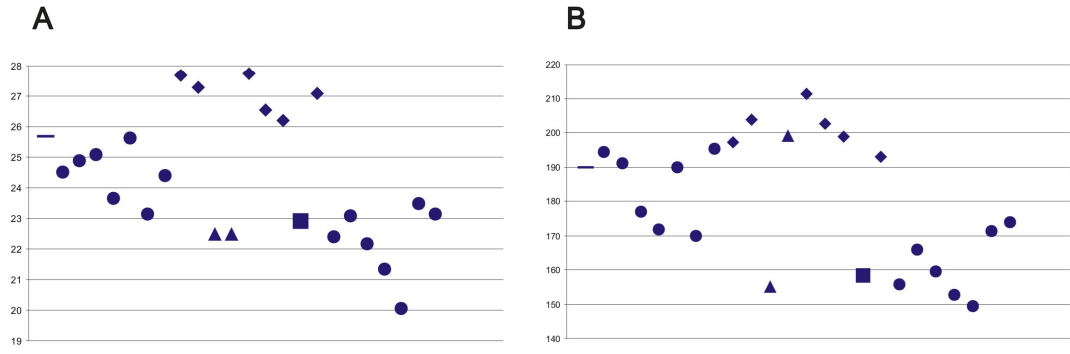


Figure 4

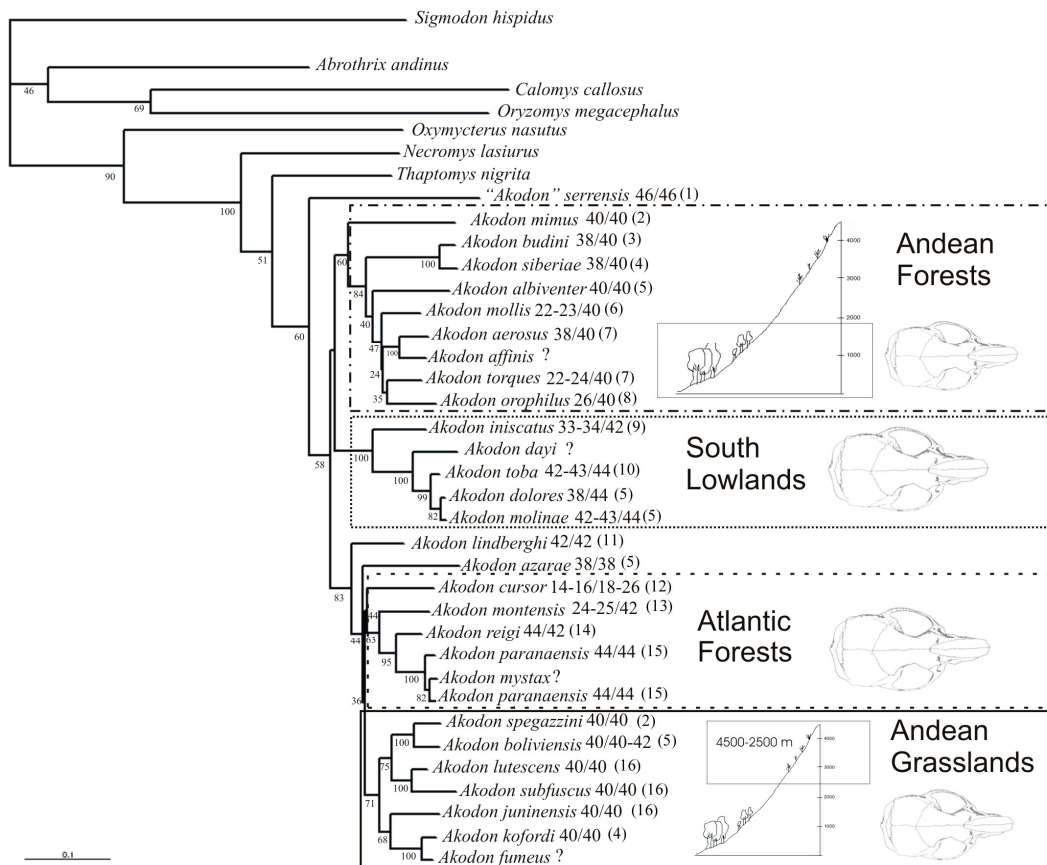


Figure 5

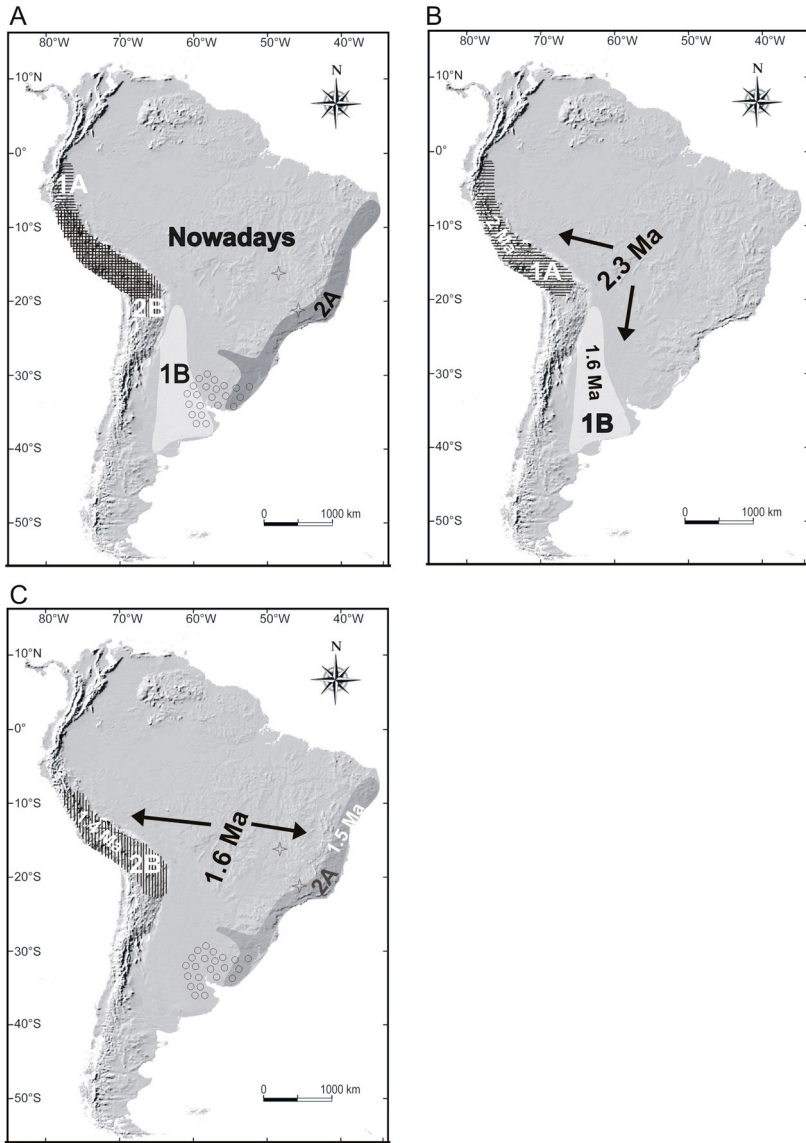


Figure 6

CAPÍTULO 3

DNA sequence analysis and the phylogeographical history of the rodent *Deltamys kemp* (Sigmodontinae, Cricetidae) on the Atlantic Coastal Plain of South of Brazil

M. A. Montes¹, L. F. B. Oliveira², S. L. Bonatto³, S. M. Callegari-Jacques^{1,4} and M. S. Mattevi^{1,5,*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; ²Setor de Mastozoologia, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Centro de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ⁵Curso de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

Running title: Phylogeographical history of *Deltamys kemp*

*Correspondence: Margarete S. Mattevi, Laboratório Diagnóstico Genético-Molecular da Biodiversidade, Universidade Luterana do Brasil, Av. Farroupilha, n. 8001, 92450-900, Canoas, RS, Brazil.

E-mail: mattevi@terra.com.br

Fone: 55 5137796386

ABSTRACT

The rodent *Deltamys kemp* Thomas, 1917 is found on the Coastal Plain — a recently formed geographic region located on Brazil's southeast coast. Considering that *Deltamys* is the only south-American sigmodontine with a sex chromosome system of the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ type, this investigation was focused on the phylogeographic history of this taxon by gene sequence analysis, trying to clarify when *Deltamys* differentiated, what was its center of diversification, and what were the probable routes it used to reach its present distribution. We analyzed sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene and nuclear recombination activating gene 2, performed cranial measurements and searched for centric fusions in individuals collected in distinct localities. The results obtained, clearly demonstrate that *D. kemp*, on the Coastal Plain, divided into two groups, one occupying a small portion to the north of this region and the other spreading widely to the South. In this process, the phenomena of marine transgression and regressions which molded its habitat, together with the occurrence of successive chromosomal rearrangements, were certainly fundamental factors in *D. kemp* diversification.

Key words: Akodontini, cyt b gene, *Deltamys kemp*, phylogeography, RAG2 gene, Cricetidae, Sigmodontinae; South America, divergence time

Introduction

The Coastal Plain consists of an area of lowlands (mostly occupied by lakes and coastal lagoons), which encompasses the Atlantic coastline of the State of Rio Grande do Sul in Brazil. Paleotemperature studies show that marine transgression/regression events originated a Lagoon System, formed by Lagoa dos Patos, the largest lagoon in South America, and by a group of smaller interconnected lagoons on the northern coastline of this Brazilian state (Fig. 1; Villwock et al., 1986).

The Cricetidae rodents of genus *Deltamys* Thomas, 1917 belong to the tribe Akodontini, whose representatives occupy most of South America (Musser & Carleton, 2005). Its unique species, *Deltamys kempii* (=Ratón aterciopelado of Massoia 1964 or Kemp's Akodont of Musser & Carleton, 2005) was described in 1917, based on four individuals collected near Buenos Aires, but whose type locality had not been accurately situated (Pardiñas et al., 2007). Later, in 1984, the species was found more than 1,000 km northwest of that area (on the Brazilian coast) by Sbalqueiro et al. In the meantime, the species had been captured only in a small area of Buenos Aires, Argentina, and in Montevideo, Uruguay (Massoia, 1964; Fronza et al., 1981). More recently, González & Massoia (1995) found *D. kempii* in some other Uruguayan localities. Furthermore, this rodent is but rarely captured – since the first capture made by R. Kemp in the beginning of the 20th century until the last article published about it in 2005 (Udrizar Sauthier et al., 2005), only 117 *D. kempii* specimens have been reported (Thomas, 1917; Massoia, 1964; Fronza et al., 1981; Sbalqueiro

et al., 1984; Castro et al., 1991; Bianchini & Delupi, 1994; González & Massoia, 1995; D'Elia et al., 2003), 42 of them trapped in Brazil. The geographical distribution of *D. kempfi* in Brazil is limited to a region on the southeastern coast known as the Coastal Plain, where this species preferentially inhabits lowland areas frequently swamped by the sea, although it does not show any specialized external adaptations for aquatic life (Sbalqueiro et al., 1984; Castro et al., 1991). Considering the fact that it can be trapped using many different kinds of bait, this rodent probably is a generalist (Massoia, 1964). No fossil records of *Deltamys* are known (Pardiñas et al., 2002).

The first cytogenetic studies in *D. kempfi* were done by Fronza et al. (1981) who, studying the karyotype of a male and a female from Buenos Aires, Argentina, found that both individuals bore translocations. Subsequently, Sbalqueiro et al. (1984) showed that all the males had $2n=37$ and the females $2n=38$. These differences in the karyotypes were interpreted as being due to a centric fusion between the Y chromosome and an autosome (Y/A), originating a unique multiple sex chromosome system of the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ type. Afterwards, Castro et al. (1991), revising the other autosomal fusions reported for the species, found that *D. kempfi* bears not only fusion (Y/A), plesiomorphic to the males of the taxon, but also an extensive system of autosomal apomorphic fusions characterized by being local/specific which warrant future investigations (Musser & Carleton, 2005).

By using gene sequences analysis, D'Elia (2003) and D'Elia et al (2003) reaffirmed the monophyly of the genus and Smith and Patton (2007) found that it grouped within the genus *Akodon*.

Taking into account the peculiarities shown by the biological model - *Deltamys* is the only South American sigmodontine with a multiple sex chromosome system of the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ -type — this study was designed to reconstitute the phylogeographic history of this taxon by gene sequence analysis, seeking to clarify when *Deltamys* differentiated, what was its center of diversification, and which routes it probably used to reach its present distribution. Therefore we analyzed sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene (cyt *b*) and nuclear recombination activating gene 2 (RAG2), performed cranial measurements and looked for the presence of different centric fusions in individuals collected in various localities in its distribution area. Finally, we investigated how the geological events that resulted in the formation of the Coastal Plain might be related to the present genetic structure of *D. kempi*.

Materials and Methods

Specimens Analyzed

We analyzed the complete sequence of the cyt *b* gene (1,140 bp) obtained from 28 *D. kempi* specimens collected in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul State (Table 1 and Fig. 1B). We included also the only two complete sequences of this species deposited in GenBank — one from Argentina, (AY195860) and the other from Uruguay (AY195862). As outgroups we chose the same akodontini species of cyt *b* genes which were analyzed with the RAG2 gene also from *Akodon cursor* (Winge, 1887) distributed through the Atlantic forest formations from Paraíba state to Paraná state, Brazil; *A. montensis* Thomas, 1913 inhabiting E Paraguay, NE Argentina, and SE and S Brazil; and *Thaptomys nigrita* (Lichtenstein, 1829) which occupies SE Brazil (from Bahia to

Rio Grande do Sul), E Paraguay, and NE Argentina.

The samples were collected in Coastal Plain, an area located approximately between latitudes 29°S and 33°S (Fig. 1A and B) and covering the coastline of south Brazil, extending to the coasts of Uruguay, and Argentina (Villwock et al., 1986). Paleotemperature studies demonstrated that the temperatures dropped slowly and gradually in the glacial periods but rose rapidly in the interglacial periods (Imbrie et al., 1984). Such alternations caused considerable variation in sea level, opening and closing areas of communication with the Atlantic Ocean, building a system named Multiple Barrier (Urien et al., 1981; Villwock, 1984), formed mainly by four major depositional events (Barrier I to IV) that extended from 400 to 5 KYR, and led to the formation of large lagoons.

The earlier of these depositional events (Barrier I, Fig. 1C) developed as result of the first transgression-regression of the sea in the Pleistocene (about 400 KYR ago) and shaped what is called the Lombas Barrier. Lombas Barrier is a strip that runs from Osório to Tapes and that isolated the “Guaíba-Gravataí” lagoon system from the sea. The next event, which occurred about 325 KYR ago, formed the Barrier 2 (Fig. 1C) and connected Porto Alegre to the Continent by sand banks, and flooded areas. The system called Barrier 3 (Fig. 1C) is formed by deposits that run from Torres to Chuí — its central portion created a barrier that isolated the Lagoa dos Patos. According to Martin et al. (1982), these deposits are around 120 KYR old. The depositional system called Barrier 4 (Fig. 1B and 1C) developed during the Holocene, more or less 5 KYR ago. In this event, the sea reached roughly five meters above the present level and formed a barrier along the coastline from Torres to Argentina. The space between Barrier 4 and Barrier 3 was occupied during the transgressive peak of

the Holocene by great bodies of brackish water and a rosary of smaller interconnected lagoons on the northern coastline of the Coastal Plain of Rio Grande do Sul and the Uruguayan coast. It may also have formed the Paraná delta in Argentina (Urien et al., 1980; Tomazelli et al., 2000).

The specimens sequenced here were collected at six Brazilian sites located in the depositional system described above: Barrier I (samples from Tapes, Fig. 1, locality 5), II (Taim, locality 6), III (Osório, locality 2), IV (Torres, and Tramandaí, localities 1, and 3, respectively) and Charqueadas (locality 4), this latter, aged about 65 –10 MYR, situated in the sedimentary sequence of the Paraná basin. The GenBank sequences included in the analyses came from Route 1 near Cufre river in San José Department (Uruguay, locality 7) and La Balandra, Buenos Aires (Argentina, locality 8), sites that correspond to Barrier IV (table 1 and Fig. 1).

Our study also included the sequence analysis of the RAG2, for which we selected individuals to represent all haplotypes found of *cyt b* from the localities investigated in Brazil (one from Charqueadas, three from Taim, two from Tramandaí, one from Torres, one from Tapes and one from Osório). The outgroups were also sequenced.

All the animals sequenced for both genes were karyotyped, the karyotypes being organized as proposed in Sbalqueiro et al. (1984) and Castro et al. (1991). The craniums and skins of the specimens used in this study are deposited in the mammal collection of the National Museum in Rio de Janeiro, Brazil (Appendix).

Morphological Measurements

We analyzed 61 specimens from Taim (n=18), Tramandaí (n=41) and Osório (n=2). Of these, the sex of 44 had been determined — 18 males and 26 females. No deviation ($p < 0.291$) in the 1:1 sex ratio was observed. The following 20 cranial measurements were made with a digital caliper accurate to 0.01mm according to DeBlase & Martin (1981): length of incisive foramina, crown length of maxillary tooth row, nasal length, breadth of rostrum, tympanic bullae length, breadth of braincase, of zygomatic bone, least interorbital breadth, mandible length, length of rostrum, height of braincase, breadth of zygomatic plate, distance between first molars, breadth of the first upper molar, depth of upper incisive, condylo-incisive length, palatal length, length of diastema, orbital length and length of rostrum (Fig. 2). All measurements were log-transformed before statistical analysis. Sexual dimorphism in cranial morphometric variables was evaluated (t-test) and no significant differences ($p > 0.10$) were detected between males and females. One missing value (mandible length) was estimated by the mean. Discriminant function and principal component analyses of the craniometrical data, using the SPSS® software, are performed to compare the groups of individuals produced by the molecular analysis. (Montes et al, in prep.). Preliminary results are shown in this paper.

Analysis of Nucleotide Sequences

DNA was extracted from kidneys, heart, liver and muscles (conserved at -20°C or in 70% ethanol), using the standard protocol described by Medrano et al. (1990). The sequences of the *cyt b* were isolated by polymerase chain reaction (PCR), using two sets of primers. For the first part of the *cyt b* amplification,

primers MVZ 05 (light-strand) and MVZ 16 (heavy-strand) were used, while for the second part we used primers MVZ 26 (light-strand) and MVZ 14 (heavy-strand), as suggested in Smith & Patton (1993). For the amplification of RAG2, the primers were RAG2F1 (light-strand) and RAG2R1 (heavy-strand), both as suggested in Baker et al. (2000).

The PCR products were purified with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences, Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). All the specimens were sequenced directly from the purified PCR products using the primers mentioned above and the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) in a MegaBase 1000 automated sequencer (Amersham Biosciences) following the manufacturer's protocols. The sequences of all the haplotypes are available in GenBank, as shown in Table 1.

Data Analysis

The sequences obtained were read with the Chromas 1.45 software and aligned with the Clustal X 1.81 program (Thompson et al., 1997), using the default setting costs and manually corrected with the BIOEDIT program (Hall, 1999). The saturation test of substitutions was carried out using the Data Analysis in Molecular Biology and Evolution software (DAMBE; Xia & Xie, 2001). The Kimura 2-parameter distance (K2p) and the base composition were obtained with the Molecular Evolution Genetics Analysis software (MEGA 3; Kumar et al., 2004).

The phylogenetic analysis was carried out using the Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML) and Maximum Parsimony (MP) algorithms, with the PAUP* v.4.0b10 program (Swofford, 2001). The Networks using the Median-

joining (MJ) method were obtained with the Network v.4.1.0.0 software (Bandelt et al., 1999).

Before performing the analyses, the nucleotide substitution model appropriate for the ML and NJ analyses was determined using the MODELTEST 3.06 program (Posada & Crandall, 1998). To estimate the ML tree (with 1,000 bootstrap replications), we chose a heuristic search with as-is, tree bisection-reconnection (TBR), branch swapping and the MULPARS option. The support values for the tree branches were estimated by bootstrap analysis as described in Xiang et al. (2002).

The MP analysis was performed by heuristic search with TBR, branch swapping, the MULPARS option and 100 random-addition replicates. The statistical support for bootstrap (Felsenstein, 1985) was executed with 1,000 replications of the heuristic search and the addition of a simple taxon, saving all the trees in a file.

The Bayesian inference (BI) was conducted with the MrBayes 3.0b4 program (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) to generate the distribution of the posterior probabilities, according to the Markov Chain Monte Carlo method (MCMC). No *a priori* assumptions about the topology of the tree were made and all searches were provided with a uniform prior. The DNA substitution model used was as estimated by the MODELTEST. The MCMC process was adjusted so that four chains ran simultaneously for a million generations, displaying trees every 100 generations, for a total of 10,000 trees. The first 100,000 generations were considered a burn-in and thus discarded. To calculate the posterior probability of each bipartition, a 50% majority-rule consensus tree was constructed from the remaining trees using PAUP. A partition-homogeneity test (incongruence

length difference, ILD) was computed to detect the presence of conflictive characters between the *cyt b* and RAG2 genes, as described by Farris et al. (1994, 1995) and was implemented in the WINCLADA version 0.9.9+ (BETA) (Nixon, 1999).

All topologies were compared using the Templeton (Templeton, 1983) and Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira & Hasegawa, 1999) tests performed under the parsimony and the likelihood criteria, respectively.

The population genetics software package ARLEQUIN version 2000 (Schneider et al., 2000) was used to examine patterns of mismatch distribution using the observed number of differences between pairs of haplotypes, and the hierarchy analyses of genetic diversity of populations were carried out using AMOVA (Excoffier et al., 1992). We tested the selective neutrality of the sequences by estimating the sequences' *F* values (Fu & Li, 1993). In addition, we assessed neutral evolution bias by the presence of significant values of parameter *D* described by Tajima (1989) and the Ramos-Onsins and Rozas test (*R*₂) design for small samples size, using the DnaSP program, version 4.1 (Rozas et al., 2003).

The molecular clock hypothesis was tested for complete *cyt b* gene using the likelihood ratio test (LRT) (Huelsenbeck & Rannala, 1997) with the PAUP* v.4.0b10 program (Swofford, 2001). For the LRT, the likelihoods of the trees with and without a molecular clock enforced were compared. Since the clock hypothesis is the simpler model, the likelihood statistic is estimated as $2(\ln L_{\text{clock}} - \ln L_{\text{no clock}})$. This statistic follows a chi-square distribution with $n - 2$ degrees of freedom, where n is the number of sequences. Divergence time was calculated using MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) taking into account all the mutations

(transitions and transversions) in the sequences, including all codon positions (Palma et al., 2005). The estimate of the separation of genera *Akodon/Thaptomys-Necromys*, considered as 3.5 (Reig, 1987; Pardiñas et al., 2002), was used as calibration for the analysis of the divergence time of our sequences.

To calculate the divergence time, three approaches were employed: one used Kimura 2-parameter model (K2p, Kimura, 1980), according to Smith & Patton (1993); the other employed Tamura-Nei model (TN, Tamura & Nei, 1993), as Palma et al. (2005); and the third utilized transversions in the third position of the codon to calibrate the differentiation between *Mus* and *Rattus*.

Results

Characteristics of the Sequences

The analysis of the mitochondrial *cyt b* gene included sequences of 30 *D. kempfi* individuals (28 sequenced by us and another two specimens from GenBank) from eight locations in South America and the three outgroups (Table 1).

The average *cyt b* sequence composition presented low guanine content (0.1655) and similar A, T and C contents (0.296; 0.297; 0.282, respectively). Such nucleotide compositions have been reported in *Deltamys* (D'Elia et al., 2003), in other sigmodontine rodents (Smith & Patton, 1991, 1993, 1999), and this strong bias in base composition is a characteristic of the *cyt b* gene in mammals (Irwin et al., 1991). The guanine deficiency observed was more marked in the second and third codon positions (0.122 and 0.034, respectively), while the frequencies of the different bases in the first codon positions were similar. The graph representing the transition/transversion versus the pairwise

distance indicated an absence of substitution saturation (data not shown).

A total of 10 haplotypes exclusive to *Deltamys* and one haplotype for each outgroup were obtained for the *cyt b* gene (Table 1). Haplotypic diversity was 0.0098 and nucleotide diversity was 0.0071. Only one haplotype was shared between two geographically close locations (Tramandaí and Torres). The analysis of these 10 haplotypes revealed 32 polymorphic sites, of which 26 were transitions and six transversions. In the transitions, 23 were silent, two located in the first and 21 in the third codon positions. The remaining three were non-silent — two in the first and one in the second codon positions. As for transversions, three were silent in the third codon positions and three were non-silent — two of these being in the first and one in the third codon positions.

As regards the RAG2 gene, an 801-bp fragment was generated, and the sequences resulted in two haplotypes (Table 1) in *D. kempfi*, two polymorphic sites being two silent transitions, one in the first and the other in third codon positions. Three other haplotypes were found in the outgroups.

Phylogeographic Analysis

As the ILD test did not reveal significant incongruence between the mitochondrial and nuclear genes ($S=0$, $W=5$, $p=1$), both were brought together in a combined analysis, resulting in a 1,941-bp fragment. However, because the representatives from GenBank of Argentina and Uruguay were studied through *cyt b* only, aiming at obtaining information about all the distribution area of the taxon, we performed an analysis including this gene separately.

The model selected for *cyt b* in the MODELTEST (Posada & Crandall, 1998) was TVM+I, and the values were $-\ln L=3087.7561$, $AIC=6191.5122$. Base

frequencies were A=0.2902; C=0.2970; G=0.1198 and T=0.2929. The rate matrix was R(a) [A-C]=2.0616; R(b) [A-G]=25.7892; R(c) [A-T]=3.7890; R(d) [C-G]=1.0642; R(e) [C-T]=25.7892; R(f) [G-T]=1.0000. The proportion of invariable sites (*I*) was 0.6588. The analysis of the *cyt b* 1,140-bp fragment using the MP, NJ, ML and BI, generated trees with highly similar topologies, since neither the Templeton or the Shimodaira –Hasegawa tests detected statistically significant differences between any of them ($p=0.3422$; $p=0.2371$, respectively). The ML tree is shown in Fig. 3A. It could be observed that there are two groups within *D. kempfi*, one which we have called the Tramandaí Group (with bootstrap values of 61 for NJ, 96 for MP, 86 for ML and 1.00 for BI posterior probability), formed by the Torres, Tramandaí, Osório and Tapes Brazilian localities; and a second group, denominated the Taim Group, (with bootstrap values 70 for NJ, 93 for MP, 57 for ML and 0.99 for BI posterior probability), which includes Charqueadas and Taim (Brazil), San José (Uruguay) and Buenos Aires (Argentina). The average genetic distance, using K2p, measured between the groups was 0.010. Within the Tramandaí Group, the average genetic distance was 0.005, varying from 0 between the Tramandaí and Torres haplotypes to 0.008 between Osório and Tapes haplotypes. For the Taim Group, the average genetic distance was 0.006, varying from 0 for the Charqueadas and some Taim haplotypes to 0.009 between haplotypes from Charqueadas and Uruguay (Table 2).

The MP analysis of ingroup plus outgroups included 152 informative sites and generated a tree (not shown) of 349 evolutionary steps, with a consistency index (CI) of 0.8796 and a retention index (RI) of 0.8384. The MJ analysis demonstrated an arrangement similar to that of the NJ, MP, ML and BI trees,

with a network tree (Fig. 3B) differentiating Tramandaí and Taim groups by a separation of 10 mutational events.

As regard the *cyt b* and RAG2 concatenated analysis, the model selected using the MODELTEST (Posada & Crandall, 1998), was GTR+G and the values were $-\ln L=4454.4136$ and $AIC=8926.8271$. Base frequencies were $A=0.2923$; $C=0.2599$; $G=0.1637$ and $T=0.2841$. The rate matrix was $R(a) [A-C]=1.6701$; $R(b) [A-G]=8.7551$; $R(c) [A-T]=2.1787$; $R(d) [C-G]=0.4263$; $R(e) [C-T]=18.2225$; $R(f) [G-T]=1.0000$. The gamma distribution parameter (Γ) was 0.0653. This model was employed for the NJ, ML and BI analyses.

In this concatenated analysis of the two genes, MP produced two equally parsimonious trees (including the outgroups), with a length of 366 steps, and with $CI=0.8880$ and $RI=0.8400$. The tree topologies generated by these methods were very similar, since neither the Templeton test ($p=0.3173$) nor the Shimodaira-Hasegawa test ($p=0.2100$) detected significant differences between them, and discriminated two groups, Tramandaí and Taim. The Bayesian tree is presented in Fig. 4A. Similarly to the *cyt b* individual analysis, the Tramandaí Group is formed by the Torres, Tramandaí, Osório and Tapes locations, with bootstrap values 93 for NJ, 95 for MP and ML, and 1.00 for BI posterior probability. The Taim Group includes Taim and Charqueadas locations, with bootstrap values of 88 for NJ and MP, 84 for ML and 1.00 for BI posterior probability. The average genetic distance between both groups was 0.014. Within the Tramandaí Group, the average genetic distance was 0.005, varying from 0 between the Tramandaí and Torres haplotypes up to 0.008 between Osório and Tapes haplotypes. In the Taim Group, the average genetic distance

was 0.006, varying from 0 in the Charqueadas and in some of the specimens from Taim, up to 0.009 between Taim and Charqueadas haplotypes (Table 2).

In the MJ analysis with the two concatenated genes, a pattern similar to that presented by the NJ, MP, ML and BI trees can be observed (Fig. 4B), with the Tramandaí and Taim groups separated by 12 mutational events.

The AMOVA including all the individuals of the eight localities investigated for a complete *cyt b* gene (1,140 bp), revealed a considerable differentiation between the localities, resulting in a significant F_{ST} (0.8696; $p < 0.0001$). As expected in view of the fact that all the trees generated indicated the formation of two groups, we found a statistically significant differentiation between both ($F_{CT} = 0.6634$; $p = 0.0282$) using a hierarchical AMOVA.

As regards the karyotypes found in the different locations (Fig. 3A), four centric fusions were observed between various autosomes each one restricted to a specific site: $t(2;3)$ from Tapes; $t(9;15)$ in Tramandaí (of which both the homozygotes and the heterozygotes were found); $t(1;13)$ in Taim; and another distinct fusion of this kind which occurred in Buenos Aires (Fronza et al., 1981).

The *t* test of the discriminant function of 20 cranial measurements obtained from individuals in both groups showed significant differences between the two groups ($p > 0.05$), but in the case of principal component analysis significant differences were observed in the second component only (PC1 $p = 0.383$; PC2 $p = 0.000$).

Divergence Time

The molecular clock hypothesis for the *cyt b* gene was not rejected by the LRT test ($D = 9.2154$; $df = 12$; $p > 0.20$) and the time of differentiation of this rodent on

the Coastal Plain was calculated. The neutral evolution of the sequences were investigated with the F' value (Fu & Li, 1993), with the Tajima (Tajima, 1989), and with the R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) tests. The values obtained are depicted in Table 4, and show that the neutrality for the sequences studied was not rejected.

The evolutionary rate obtained between *Akodon* and *Necromys/Thaptomys* (employing transitions and transversions in all positions of codon) by the K2p model was 0.02366 per MYR, a value very similar to that found with the TN model, which was 0.0232 per MYR. Smith & Patton (1993), calculating the transversions in the third codon positions for *Mus* and *Rattus*, obtained a differentiation value of 0.0170 per MYR.

Using these values in the calculation of the *Deltamys* divergence time from the others Akodontini, we estimated this genus differentiated approximately 3.2 and 3.5 MYR ago (Table 3). The same procedure was utilized to estimate the period spent by *Deltamys* to spread in the Coastal Plain (from Torres to Buenos Aires, assuming a molecular clock already tested): c. 200,000 years ago (Table 3).

Discussion

All the analyses, whether using the *cyt b* on its own or in combination with RAG2, have shown the *Deltamys* genus to be a monophyletic taxon, with a high level of bootstrap and posterior probability support. This monophyly was expected when the *Deltamys* chromosomal analysis demonstrated that the genus was bearer of unique one character apomorphic to the Sigmodontinae — the multiple sex chromosome system in the $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ form. The meiotic

configuration of this system prevents its bearers from mating with other taxa that are bearers of other sex chromosome systems, including the XX/XY.

Both the phylogenetic trees and the haplotype networks generated have demonstrated, with high congruence, the formation of two groups of great statistical confidence (bootstrap and posterior probability). As can be seen in Fig. 5, the Tramandaí Group includes the Brazilian localities of Torres, Tramandaí, Osório and Tapes, and the Taim Group formed by the localities of Charqueadas, Taim (Brazil), San José (Uruguay) and Buenos Aires (Argentina). As regards the Tramandaí Group, two sister-groups were formed, one including the haplotype of Tapes and the other putting together the haplotypes of Osório and Tramandaí (Fig. 3A and 4A). The position of Tapes on the Coastal Plain corresponds to the “Barrier I” geological formation formed by the first marine transgression (Fig. 1B) around 0.4 MYR ago (Tomazelli & Villwock, 1996). As a result, the subsequent regression linked Tapes to Tramandaí and Osório. The two latter locations, together with Torres, originated in the third and fourth marine transgressions which took place about 0.12 MYR ago and 0.05 MYR ago, respectively (Villwock & Tomazelli, 1998).

The region of the Taim Group corresponds to the second, third and fourth marine transgressions. Of these localities, Taim is the result of the second and fourth transgressions (Tomazelli et al., 2000), while San José and Buenos Aires were formed only in the last Holocene transgression (Fig. 1B) and are therefore geologically more recent (Urien et al., 1980).

Charqueadas, in geological terms, is located in the Paraná basin sedimentary sequences, a site which originated before the marine transgressions of the Pleistocene. When only the haplotypes of Taim Group (Table 2, in grey) were

considered, the genetic distances show that the haplotype of Charqueadas locality is, most of the time (two out of three), closest to the outgroups. This fact, together with the relatively old geological age of this locality, suggests that the region that encloses the Tapes locality could also be the center from which this species started its dispersion across the Coastal Plain. However, this scenario do not eliminate the possibility that Charqueadas would be occupied recently by individuals migrated from south.

This geological background, with localities of different ages originated by the sequential marine transgressions in the Pleistocene/Holocene that shaped the southern coasts of Brazil and Uruguay and the basin of the River Plate in Argentina, may explain the topology of the molecular trees found for *Deltamys*, in which the most derived sequences are located in the most recent land masses.

This organization into Tramandaí and Taim groups becomes very clear in the network analyses (Fig. 3B and 4B), where it can be seen that 10 and 12 mutations, for the *cyt b* gene and for the combined analysis of *cyt b* and RAG2 respectively, separate the two groups. The AMOVA analysis also indicates a significant differentiation between the Tramandaí and Taim groups. It is observed from the mismatch distribution (not shown) that the whole species (Tramandaí Group + Taim Group) does not present a signal of a population size expansion as it shows a ragged distribution. However, when the two groups were analyzed separately, we only found a sign of expansion in the Taim group, as it presents a single wave pattern. This result seems to be a reflex of the dispersion pattern of *Deltamys* in a southerly direction, from Charqueadas (Brazil) to the River Plate, near Buenos Aires. This dispersion may have

progressed along with the formation of brackish coastal lagoons in this part of the South American coast — a habitat characteristic of *Deltamys*. Another factor, which stands out, is that this territorial occupation was apparently accompanied by a number of rearrangements of the autosomal chromosomes specific to each location.

The rearrangement of the sex chromosome pair may be very old and was perhaps the mechanism that triggered the differentiation of the taxon, as this rearrangement was found in all the individuals from all the localities we studied. The differences in the autosomal rearrangements between the localities are accompanied by high and significant F_{ST} values, indicating that these locations are structured.

In the case of this rodent it is worthwhile noting, however, that living in small populations seems to be a feature of its natural history. This characteristic may explain, at least in part, why we obtained only a few individuals in certain locations, notwithstanding the fact that we have searched the Coastal Plain intensively for specimens during the past 10 years – for instance, the absence of *Deltamys* in the in the several collections performed between the sites numbers 5 and 6 of Fig. 1. On the other hand, both in our own research and in the revision made by González and Pardiñas (2002) it was observed that in certain locations (Tramandaí for instance) *Deltamys* seems to be relatively common.

The analysis of the cranial measurements of animals from the two groups for which we have representative material (Osório and Tramandaí in the Tramandaí Group and Taim from the Taim Group) revealed a significant separation between the two. This means that the molecular differentiation

observed in this study was also accompanied by modifications in the morphology of the animals' craniums, and these differences suggest that *Deltamys* is divided into two taxa — one to the North of the Lagoa dos Patos and the other to the South (extending as far as Buenos Aires). González & Massoia (1995) suggested that *Deltamys* could support two sub-species, one of which, *D. k. langguthi*, would correspond to the individuals inhabiting Brazil and Uruguay, while the remainder would be *D. k. kempi*. The fact that we found both molecular and morphological differences significant only between the individuals belonging to the groups we denominated Tramandaí and Taim indicates that, if *Deltamys* is in fact differentiated into two taxa, this differentiation is true only between the representatives of these two groups.

The molecular analyses conducted in this study reveal that *Deltamys* is a monophyletic taxon whose differentiation as an akodontine genus must have occurred in the Tertiary, a little more than 3 MYR ago, a period of time that corresponds with the differentiation of the other akodontines (Reig, 1987; Smith & Patton, 1999). The molecular analyses also show that this rodent spread out over the Coastal Plain after the first marine transgression in the Pleistocene (which was about 400 KYA) a period which agrees perfectly with the geological age estimated for this region of the South American Atlantic coastline.

The trees generated in the NJ, MP, ML, BI and MJ analyses, the hierarchical AMOVA test and the cranial measurements, demonstrate clearly that *D. kempi*, on the Coastal plain, initially divided into two groups probably in the region of Charqueadas: one occupying a small portion to the north of this region and the other spreading widely to the South — from Charqueadas in Brazil, along the coast of Uruguay, to the River Plate in Argentina. In this process, the

phenomena of marine transgression and regressions which molded its habitat, together with the occurrence of successive chromosomal rearrangements, were certainly fundamental factors in *D. kempfi* diversification.

Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Organization of American States (OAS) have supported this study. The authors are grateful to Luciano S. Silva for technical help, to Dr. Mara H. Hutz for several facilities provided, to Dr. Jorge A. Villwock for the discussion of the geology of the Coastal Plain, to Dr. Ana L. Garcia for help in preparing the figures and to Valeria C. Muschner for help in the molecular analyses.

Figure Legends

Figure 1

1A- Shows the distribution of the *Deltamys kempfi* on a map of the South American continent. 1B- Map of the Coastal Plain of Southern Brazil, Uruguay and Northern Argentina showing the Holocene transgressions. The numbers correspond to the localities of the samples of *Deltamys kempfi* Thomas, 1917 used in the analyses: 1=Torres, 2=Osório, 3=Tramandaí, 4=Charqueadas, 5=Tapes, 6=Taim, 7=San José and 8=Buenos Aires. Stars correspond to the mainly sites where *Deltamys* specimens were recorded (González and Massoia, 1995; Udrizar Sauthier et al., 2005). 1C- Geological map of Rio Grande do Sul state Coastal Plain (Brazil) showing the distribution of the

Multiple Barrier system (adapted from Tomazelli & Villwock, 1996).

Figure 2

Cranial characters used in morphometric analyses of *Deltamys*: LIF = length of incisive foramina; LMR = crown length of maxillary tooth row; NL = nasal length; BR = breadth of rostrum, TBL = tympanic bullae length, BB = breadth of braincase; BZB = breadth of zygomatic bone; LIB = least interorbital breadth; LR = length of rostrum; DFM = distance between first molars; BFM = breadth of the first upper molar; CIL = condylo-incisive length; PL = palatal length; LD = length of diastema, OL = orbital length. Not shown: mandible length, height of braincase, breadth of zygomatic plate, depth of upper incisive.

Figure 3

3A- Maximum likelihood tree based on the TVM+I model ($-\ln L=3087,7561$, $AIC=6191,5122$) derived from *cyt b* sequences for 10 haplotypes found among eight populations of *Deltamys kempfi*. *Akodon cursor* (Winge, 1887), *A. montensis* Thomas, 1913 and *Thaptomys nigrita* (Lichtenstein, 1829) were used as outgroup. Bootstrap values for maximum likelihood are given below each branch. The rectangles indicate the two divergent groups inferred: the Tramandaí and Taim groups. st/st = standard homozygote karyotype; st/t(2;3) = 2;3 fusion heterozygote; st/t(9;15) = 9;15 fusion heterozygote; t(9;15)/t(9;15) homozygote; st/t(1;13) = 1;13 fusion heterozygote.

3B- Median-joining network showing the phylogenetic relationships between *Deltamys kempfi cyt b* haplotypes. Circular areas are proportional to the number of individuals bearing a particular haplotype. Branch lengths are proportional to the number of mutations involved between haplotypes. Mutations are indicated with tick marks and the longest branches are represented by numbers.

Figure 4

4A- Phylogenetic tree based on the combined analysis of the nuclear RAG2 and *cyt b* genes of *Deltamys kempfi* using Bayesian analysis (GTR+G model of evolution). *Akodon cursor*, *A. montensis* and *Thaptomys nigrita* were used as outgroups. Posterior probabilities are shown below the branches. The rectangles indicate the two divergent groups inferred: the Tramandaí and Taim groups.

4B- Median-joining network showing the phylogenetic relationships of the *Deltamys kempfi* based on combined analysis of the nuclear RAG2 and *cyt b* genes. The circular areas are proportional to the number of individuals bearing a particular haplotype. Branch lengths are proportional to the number of mutations involved between the haplotypes. Mutations are indicated by tick marks and the longest branches are represented by numbers.

Figure 5

Map of the Coastal Plain of Southern Brazil, Uruguay and Northern Argentina and superimposed Maximum likelihood tree based on the TVM+I model showing the geographical association of the different haplotypes.

References

- Baker, R.J., Porter, C.A., Patton, J.C. & Van Den Bussche, R.A. 2000. Systematic of bats of the Family Phyllostomidae based on *Rag2* DNA sequences. Occas. Pap. Tex. Tech. Univ. Mus. 203: 1-16.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16: 37-48.

- Bianchini, J. & Delupi, L. 1994. Consideraciones sobre el estado sistemático de *Deltamys kemp* Thomas, 1917 (Cricetidae: Sigmodontinae). *Physis* C49: 27-35.
- Castro, E., Mattevi, M.S., Maluf, S. & Oliveira, L.F.B. 1991. Distinct centric fusions in different populations of *Deltamys kemp* (Rodentia: Cricetidae) from South America. *Cytobios* 68: 153-159.
- DeBlase, A.F. & Martin, R.E. 1981. A manual of mammalogy with keys to families of the world. 2nd edn. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa.
- D'Elia, G., González, E.M. & Pardiñas, U.F.J. 2003. Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mamm. Biol.* 68: 351-364.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application of human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44: 570-572.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fronza, M., Wainberg, R. & Cataleo, G. 1981. Multiple sex chromosomes in *Deltamys kemp* (Rodentia: Cricetidae): Preliminary steps towards the establishment of the $XY_1Y_2/X_1X_1X_2X_2$ system. *Caryologia* 34: 457-466.
- Fu, Y.X. & Li, W.H. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.

González, E.M. & Massoia, E. 1995. Revalidación del género *Deltamys* Thomas, 1917, con la descripción de una nueva subespecie de Uruguay y sur de Brasil (Mammalia: Rodentia: Cricetidae). *Comunic. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo* 12: 1-8.

González, E.M. & Pardiñas, U.F.J. 2002. *Deltamys kempii*. *Mamm. Spec.* 711: 1-4.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in an evolutionary context. *Science* 276: 227-232.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Imbrie, J., Hays, J., Martinson, D., McIntyre, A., Mix, A., Morley, J., Pisias, N., Prell, W. & Shackleton, N. 1984. The orbital theory of Pleistocene climate: support from a revised chronology of the marine $\delta^{18}\text{O}$ record. In: *Milankovitch and Climate* (A. Berger, J. Imbrie, J. Hays, G. Kukla, B. Saltzman, eds), pp. 269-305. Reidel Publishing Co, Dordrecht.

Irwin, D., Kocher, T. & Wilson, A. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Mol. Ecol.* 32: 128-144.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.

- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. 2004. Mega3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- Martin, L., Bittencourt, A.C.S.P. & Vilas-Boas, G.S. 1982. Primeira ocorrência de corais pleistocênicos da costa brasileira: datação do máximo da penúltima transgressão. *Ciência da Terra* 1: 16-17.
- Massoia, E. 1964. Sistemática, distribución geográfica y rasgos etoecológicos de *Akodon (Deltamys) kempi* (Rodentia: Cricetidae). *Physis* 24: 299-305.
- Medrano, J.F., Aasen, E. & Sharrow, L. 1990. DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Musser, G.G. & Carleton, M.D. 2005. Superfamily Muroidea. In: *Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference* (D.E. Wilson & D.M. Reeder, eds), pp. 894-1531. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Nixon, K.C. 1999. *Winclada (beta) Version 0.9.9* published by the author, Ithaca, NY.
- Palma, R.E., Marquet, P.A. & Boric-Bargetto, D. 2005. Inter- and intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *J. Biogeogr.* 32: 1931-1941.
- Pardiñas, U.F.J., D'Elia, G. & Ortiz, P.E. 2002. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: estado actual de su conocimiento y prospectiva. *J. Neotrop. Mammal.* 9: 209-252.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., D'Elia, G., Cirignoli, S. & Ortiz, P.E. 2007. Resolution of Some Problematic Type Localities for Sigmodontine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). In: *The quintessential naturalist: honoring The life and legacy of Oliver P. Pearson* (D.A. Kelt, E.P. Lessa, J. Salazar-Bravo & J. L. Patton,

eds), pp. 391-416. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Reig, O.A. 1984. Distribuição Geográfica e história evolutiva dos roedores monóides sul americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev. Bras. Genet.* 7: 333-365.

Reig, O.A. 1986. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. In: *High altitude tropical biogeography* (F. Vuilleumier & M. Monasterio, eds), pp. 404-439. Oxford University Press, New York.

Reig, O.A. 1987. An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Field. Zool.* 39: 347-399.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescence and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Sbalqueiro, I.J., Mattevi, M.S. & Oliveira, L.F.B. 1984. An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ mechanism of sex determination in a South American rodent, *Deltamys kempi* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 38: 50-55.

Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. *Arlequin version 2.0: a software for population genetic data*. Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

Shimodaira, H. & Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1114-1116.

Smith, M. & Patton, J. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae, Sigmodontinae). *Mol. Biol. Evol.* 8: 149-177.

Smith, M. & Patton, J. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol. J. Linn. Soc.* 50: 149-177.

Smith, M. & Patton, J. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in south America: evidence from cytochrome *b*. *J. Mamm. Evol.* 6: 89-128.

Swofford, D.L. 2001. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, Version 4.0b10, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.

Tamura, N. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512–526.

Templeton, A.R. 1983. Convergent evolution and non-parametric inferences from restriction fragment and DNA sequence data. In: *Statistical Analysis of DNA sequence Data* (B. Weir, ed), pp. 151-179. Marcel Dekker, New York.

Thomas, O. 1917. On small mammals from the Delta del Paraná. *J. Nat. Hist. (=Annals and Magazine of Natural History)* 20: 95–100.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876-4882.

Tomazelli, L.J. & Villwock, J.A. 1996. Quaternary geological evolution of Rio Grande do Sul coastal Plain, Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 68: 373-382.

Tomazelli, L.J., Dillenburg, S.R. & Villwock, J.A. 2000. Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal Plain, Southern Brazil. *Rev. Bras. Geoc.* 30: 470-472.

Udrizar Sauthier, D.E., Abba, A.M., Pagano, L.G. & Pardiñas, U.F.J. 2005. Ingreso de micromamíferos brasílicos en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozool. Neotrop.* 12: 91-95.

Urien, C.M., Martins, L.R. & Martins, I.R. 1980. Modelos deposicionais na plataforma continental do Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e Buenos Aires (Argentina). *Rev. Notas Técnicas* 2: 13-26.

Urien, C.M., Martins, L.R. & Martins, I.R. 1981. Evolução geológica do quaternário do litoral atlântico uruguaio e regiões vizinhas. *Rev. Notas Técnicas* 3: 7-43.

Villwock, J.A. 1984. Geology of the Coastal province of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. A synthesis. *Pesquisas* 16: 5-49.

Villwock, J.A. & Tomazelli, L. J. 1995. Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Tecnicas* 8: 1-45.

Villwock, J.A., Tomazelli, L.J., Loss, E.L., Dehnhardt, E.A., Fo, N.O.H. & Bachi, F.A. 1986. Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. In: *Quaternary of South America and Antartic Peninsula* (J. Rabassa, ed), pp. 79-97. Balkema, Rotterdam.

Villwock, J.A. & Tomazelli, L.J. 1998. Holocene Coastal Evolution in Rio Grande do Sul, Brazil. In: *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* (J. Rabassa, ed), pp. 283-296. Balkema, Rotterdam.

Xia, X. & Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92: 371-373.

Xiang, Q.Y., Moody, M.L., Soltis, D.E., Fan, C. & Soltis, P.S. 2002. Relationships within Cornales and circumscription of Cornaceae-matK and rbcL sequence data and effects of outgroups and long branches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24:35-57.

Table 1. Taxa studied localities, coordinates, number of specimens, number of exemplar measured, *cyt b* (Arabic) and RAG2 (Roman) haplotypes (H) and GenBank Accession numbers of the samples investigated.

Locality*	Coordinates	Specimens (N)	Cranial measures (N)	Cyt <i>b</i> haplotypes	GenBank Access	RAG2 haplotypes	GenBank Access
<i>Deltamys kempfi</i> Thomas, 1917							
Torres (1)	29°19'S;49°46'W	1		H5	EF206809	HI	EF206816
Osório (2)	29°53'S;50°16'W	1	2	H7	EF206811	HI	EF206816
Tramandai (3)	29°54'S;50°16'W	18	41	H5, H6	EF206809, EF206810	HI	EF206816
Charqueadas (4)	29°57'S;51°37'W	2		H4	EF206808	HII	EF206817
Tapes (5)	30°40'S;51°23'W	1		H8	EF206812	HI	EF206816
Taim (6)	32°29'S;52°34'W	5	18	H1, H2, H3	EF206805, EF206806, EF206807	HII	EF206817
San José, UR (7)	34°21'S;57°06'W	1		H9	AY195862		
Buenos Aires, AR (8)	34°54'S;57°45'W	1		H10	AY195860		
<u>Outgroups</u>							
<i>Akodon montensis</i> Thomas, 1913							
Tainhas	29°16'S;50°18'W	1		H11	EF206813	HIII	EF206819
<i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)							
João Pessoa	7°06'S;34°51'W	1		H12	EF206814	HIV	EF206820
<i>Thaptomys nigrita</i> (Lichtenstein, 1829)							
Monte Verde	19°53'S;41°57'W	1		H13	EF206815	HV	EF206818

*Numbers correspond to those of Figure 1.

Table 2. Genetic distances (Kimura 2-parameter model) between the haplotypes of *Deltamys kempi* of the different localities and outgroups. Superior diagonal *cyt b* and RAG2 concatenates genes distances. Inferior diagonal *cyt b* gene distances.

	Osório (Tramandai)	Tramandai/ Torres (Tramandai)	Tramandai (Tramandai)	Tapes (Tramandai)	Uruguay (Taim)	Argentina (Taim)	Taim 1 (Taim)	Taim 2 (Taim)	Taim 3 (Taim)	Charqueadas (Taim)	<i>Akodon cursor</i>	<i>Akodon montensis</i>	<i>Thaptomys nigrita</i>
Osório (Tramandai)		0.002	0.003	0.005	-	-	0.013	0.015	0.011	0.009	0.367	0.431	0.435
Tramandai/Torres (Tramandai)	0.003		0.001	0.003	-	-	0.011	0.013	0.009	0.009	0.350	0.427	0.422
Tramandai (Tramandai)	0.004	0.002		0.003	-	-	0.011	0.013	0.009	0.007	0.350	0.410	0.414
Tapes (Tramandai)	0.008	0.005	0.005		-	-	0.011	0.013	0.009	0.009	0.352	0.430	0.394
Uruguay (Taim)	0.018	0.015	0.015	0.015		-	-	-	-	-	-	-	-
Argentina (Taim)	0.017	0.014	0.014	0.014	0.001		-	-	-	-	-	-	-
Taim 1 (Taim)	0.018	0.015	0.015	0.015	0.004	0.003		0.003	0.003	0.004	0.346	0.430	0.442
Taim 2 (Taim)	0.020	0.017	0.017	0.017	0.007	0.006	0.005		0.004	0.006	0.352	0.439	0.434
Taim 3 (Taim)	0.015	0.012	0.012	0.012	0.006	0.005	0.004	0.006		0.003	0.326	0.406	0.434
Charqueadas (Taim)	0.012	0.010	0.012	0.012	0.009	0.008	0.007	0.009	0.004		0.336	0.395	0.414
<i>Akodon cursor</i>	0.159	0.155	0.155	0.155	0.159	0.158	0.154	0.155	0.151	0.153		0.135	0.385
<i>Akodon montensis</i>	0.165	0.161	0.164	0.164	0.164	0.165	0.164	0.165	0.160	0.159	0.096		0.405
<i>Thaptomys nigrita</i>	0.173	0.169	0.170	0.166	0.175	0.174	0.173	0.172	0.172	0.169	0.155	0.156	

Table 3. Divergence times estimations (in MYR).

Divergence period	K2p model (all positions)	TN model (all positions with)	Split <i>Mus/Rattus</i> (third position transversions)
Between <i>Deltamys</i> and others Akodontini	3.2	3.3	3.5
Spread of <i>Deltamys</i> in the Costal Plain	0.2113	0.2150	0.2941

Table 4. *Deltamys kemp*i summary statistics.

	Fu and Li test	Tajima test	Ramos-Onsins and Rozas's test
<i>Deltamys</i>	2.475	0.015 (p=0.579)	0.159 (p=0.000)
<i>kemp</i> i	(p=0.846)		

Figure 1

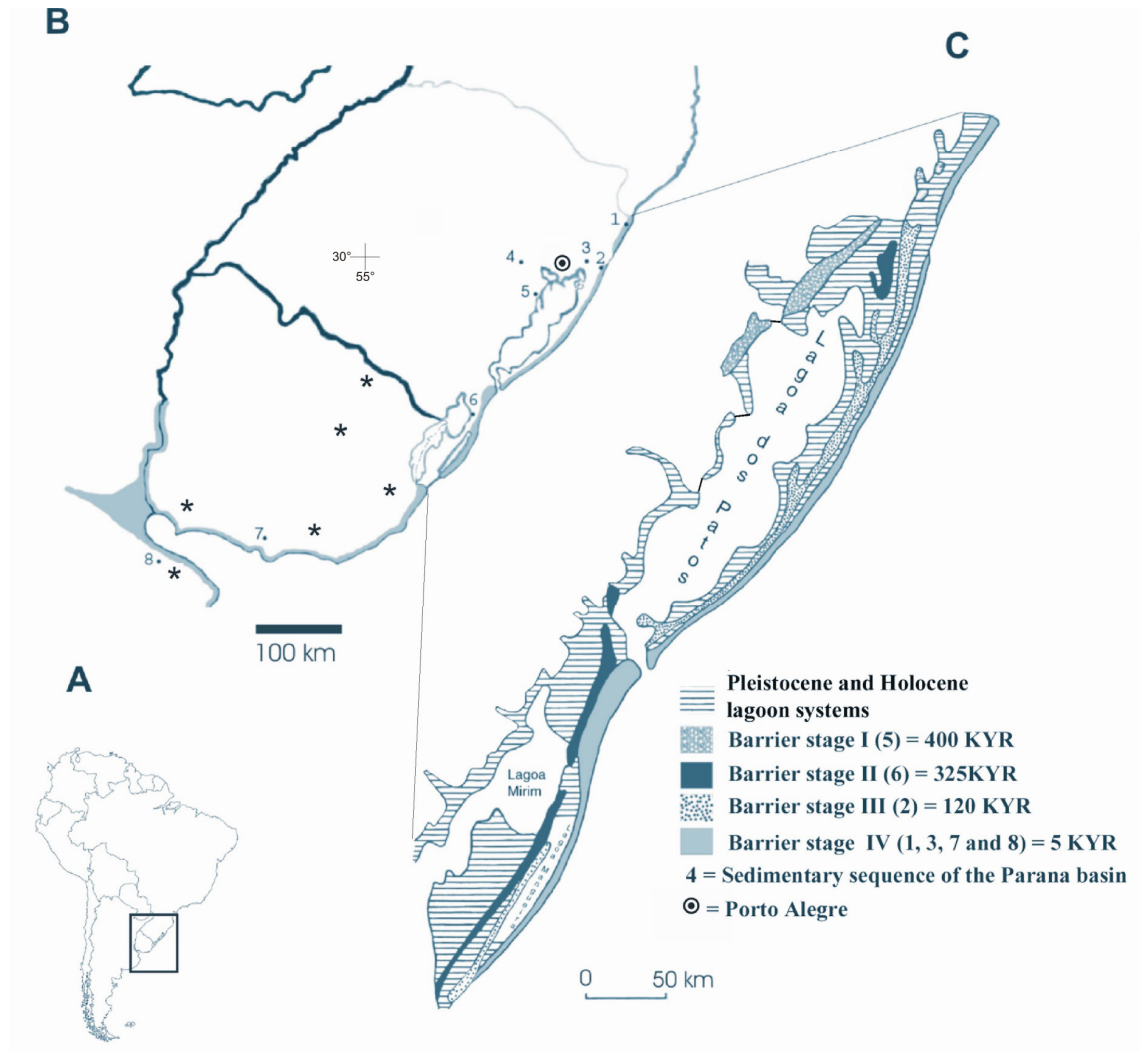


Figure 2

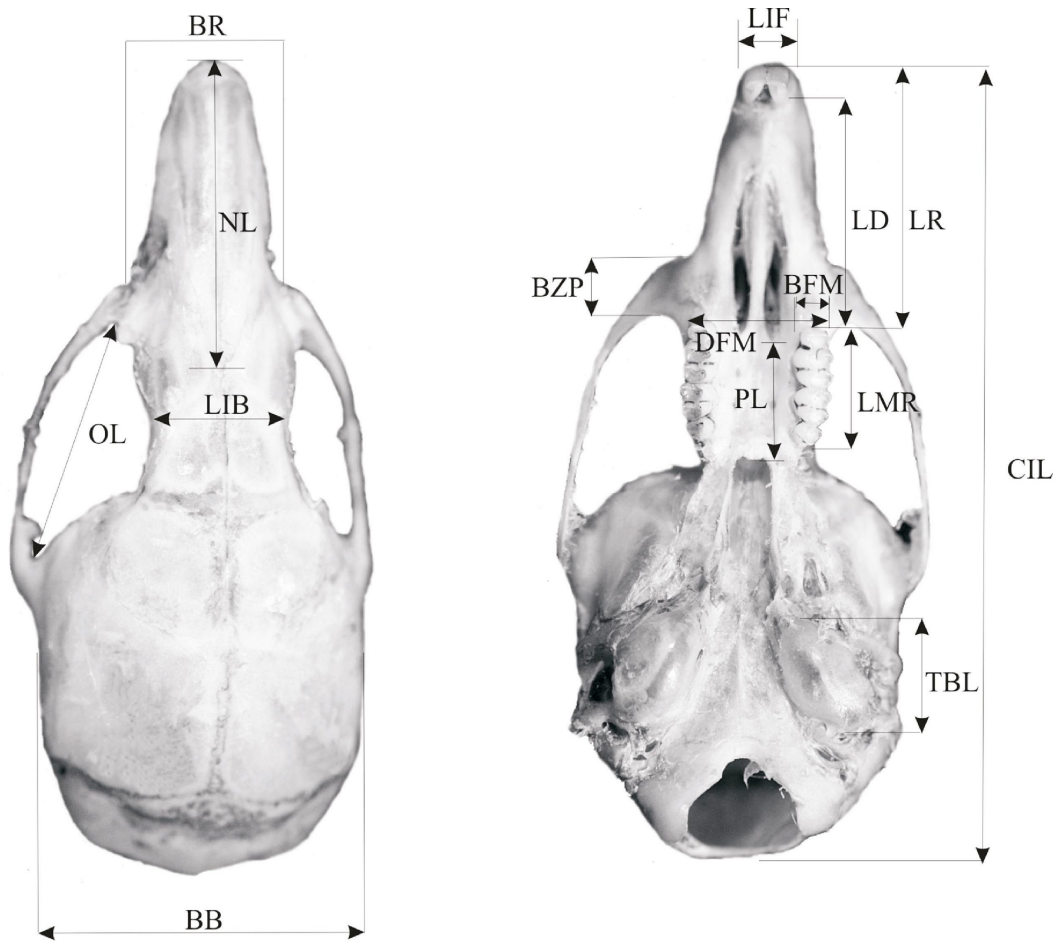
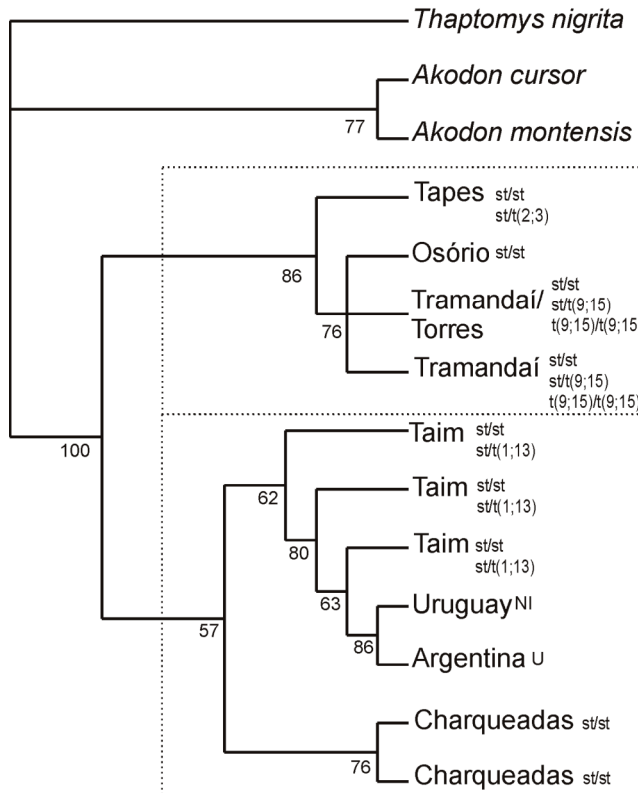


Figure 3

A



B

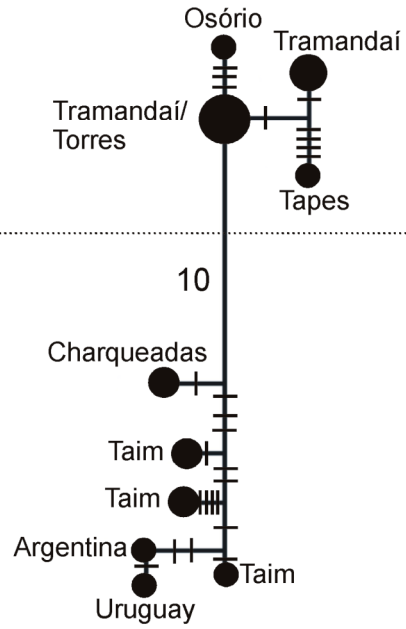


Figure 4

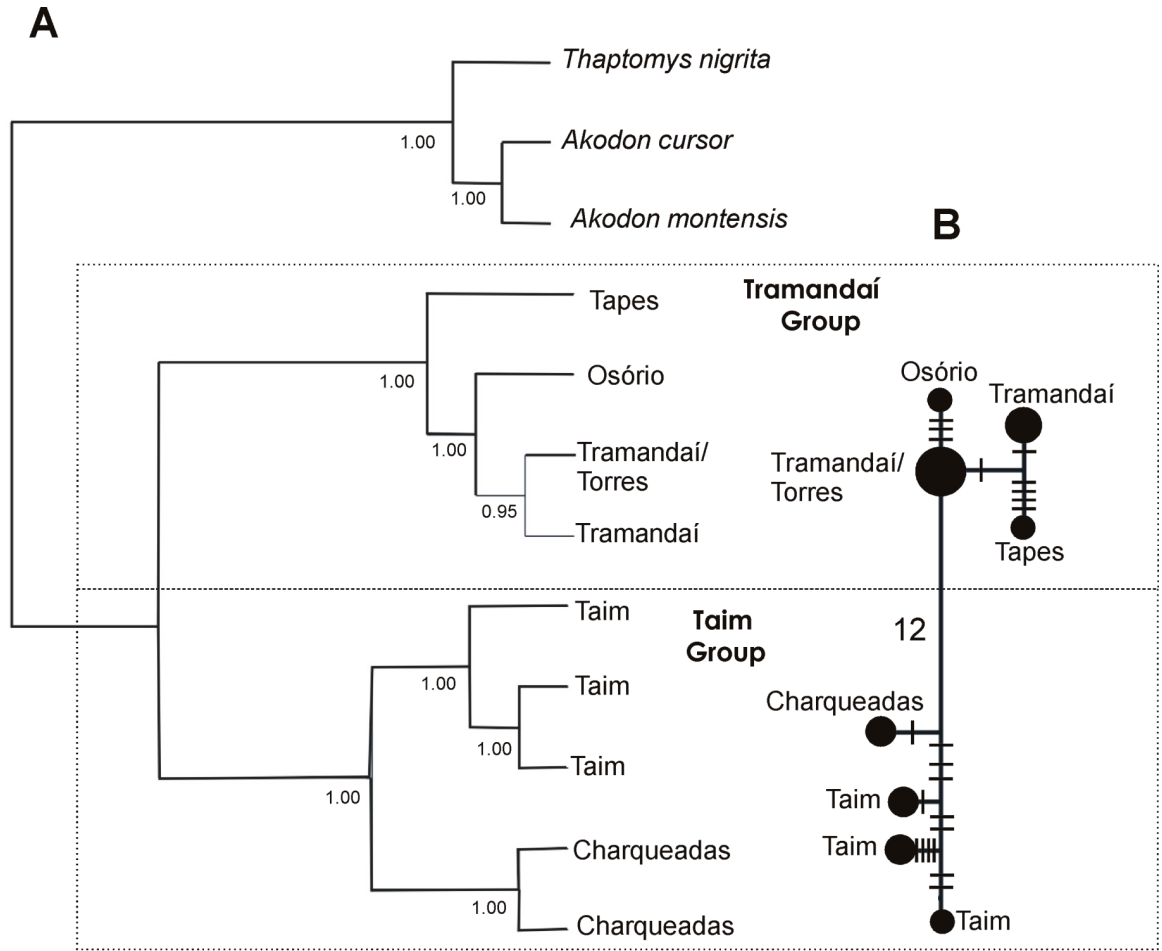
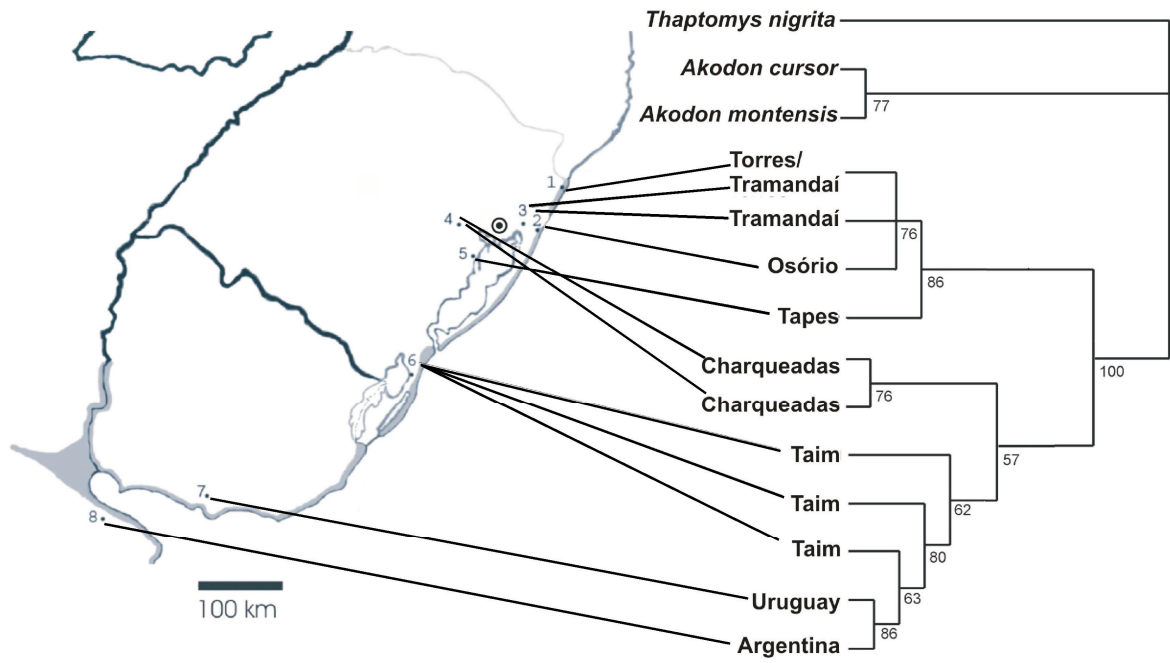


Figure 5



Appendix

Specimens examined of *Deltamys kemp*. Brazil, Rio Grande do Sul state, Torres City, ZE13*; Osório City, MN42081; Tramandaí City, MN42085, MN42073, MN42079, MN42072, MN42065, MN42064, MN42056, MN42057, LF587* (MN42046=LF994), MN42041, LF589* (MN42048=LF1060), LF591* (MN42047=LF1021), MN42054, MN42070, MN42039, MN42059, MN42045; Charqueadas City, LF2371*, LF2392*; Tapes City, LF421*; Taim City, MN42078, MN42058, MN42071, MN42080, MN42084

* Samples without vouchers were from rodents released following capture.

CAPÍTULO 4

Filogeografia, tempo de divergência e limites entre espécies de roedores akodontinos de ocorrência na Mata Atlântica

Martín A. Montes ^a, Maria C. Barros ^b, Luiz F. B. Oliveira ^c, Alfredo Langguth ^b,
Margarete S. Mattevi ^{a,d*}

^a Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (martinmontes76@yahoo.com.ar)

^b Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5010, 58059-900, João Pessoa, Brazil (alfredodse@ufpb.br)

^c Setor de Mastozoologia, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20940-040, Rio de Janeiro, Brazil (melfo@terra.com.br)

^d Curso de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, 92420-280, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil (mattevi@terra.com.br)

RESUMO

A Mata Pluvial Atlântica é um dos ambientes mais rico em espécies da terra e um dos cinco mais ameaçados do planeta. Os roedores e os marsupiais representam o grupo de mamíferos mais diversificado da Mata Atlântica tendo um importante papel ecológico neste bioma. No presente estudo investigamos seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* em roedores sigmodontinos da tribo Akodontini habitantes da Mata Atlântica da América do Sul a fim de analisar os níveis e os padrões da variação genética destes roedores neste habitat fragilizado. Objetivamos abordar cinco áreas conceituais: 1) estudar a estrutura filogeográfica em *A. cursor*, *A. montensis* e *O. dasytrichus*, buscando delinear possíveis áreas regionais onde seriam encontrados clados monofiléticos dentro da Mata Atlântica; 2) definição do limite de espécie em *Bruceparetsonius iheringi*, em *Akodon* 2n=46 e *Thaptomys nigrita* e *Akodon* 2n=44 dentro do bioma de Mata Atlântica, 3) determinação da idade das linhagens, 4) avaliar os processos de diversificação das espécies aqui estudadas em relação às mudanças geológicas e paleoambientais ocorridas na Mata Atlântica, 5) revelar a estrutura populacional das espécies e suas conseqüências na definição das prioridades de manejo e conservação de alguns taxa deste bioma. Foram escolhidas amostras de *A. cursor*, *A. montensis*, *O. dasytrichus*, *T. nigrita*, *B. iheringi*, *Akodon* 2n=46 e 2n=44 obtidas de 35 localidades (19 amostradas por nos e 16 do genBank). O padrão filogeográfico apresentado pelas espécies foi diferente, já que *A. montensis* apresentou quatro grupos, dos quais três foram bem definidos geograficamente, *O. dasytrichus* não apresentou uma estruturação em grupos bem definida e *A. cursor* apresentou dois grupos monofiléticos, a princípio claramente não correlacionados com a geografia. Quanto aos limites das espécies, verificou-se nítida diferenciação entre o táxon de *Akodon* 2n=46 e *T. nigrita* enquanto que o táxon de *Akodon* 2n=44 parece admitir mais de uma espécie. O tempo de divergência mais antigo foi observado em *B. iheringi*, com valores correspondentes ao Mioceno tardio.

INTRODUÇÃO

As matas pluviais são consideradas um dos ambientes mais ricos em espécies da terra. Entre estas se destaca a Mata Atlântica do Brasil, Argentina e Paraguai por apresentar a maior diversidade de espécies do mundo. Este bioma, considerado um dos cinco mais ameaçados do planeta, começou a ser destruído há cinco séculos com a chegada dos colonizadores e, ainda hoje, sofre grande pressão antrópica, uma vez que a maior parte da população brasileira, território onde é encontrada a maior porção da Mata Atlântica, se concentra nesta área. Na época do descobrimento a Mata Atlântica cobria uma área de aproximadamente 1.400.000 km² no Brasil, restando, atualmente, apenas 5% a 7% de sua superfície original (Rizzini 1997, Por et al. 2005).

A Mata Atlântica se estende por cerca de 4.000 km pela costa Atlântica do Brasil, desde o Estado do Rio Grande do Norte (3°S) até o Rio Grande do Sul (30°S). Este bioma apresenta grandes variações de altitude, ocorrendo desde o nível do mar até 2.700 m. O limite sul da Mata Atlântica ocorre na Serra Geral, no Estado brasileiro do Rio Grande do Sul. Para o interior, o bioma avança até a Província de Misiones na Argentina e parte oriental do Paraguai, estando também muito devastado nestes dois países. Na província de Misiones, região onde se encontra seu maior índice de preservação, a Mata Atlântica cobria aproximadamente 86% do território, restando hoje 60% da área original (Laclau 1994, Morello e Matteucci 1999, Perucca e Ligier 2000). No Paraguai, o bioma estendia-se por uma grande parte da região Oriental, chegando quase até o Rio Paraguai, atualmente restam 13% de sua extensão original (Barboza et al. 1997). A medida que internaliza-se no continente, a Mata Atlântica apresenta um empobrecimento de espécies, gradualmente correlacionado com às mudanças para um clima mais seco. Esta característica faz com que a vegetação mude para semidecíduas. No sudeste do Brasil este tipo de Mata acompanha os grandes rios.

Os roedores e os marsupiais representam o grupo de mamíferos mais diversificado da Mata Atlântica (Fonseca et al. 1996), tendo um importante papel ecológico neste bioma, já que influenciam na regeneração da floresta através da predação diferencial de sementes e plântulas, bem como na

dispersão de sementes (Pizo 1997, Grelle e Garcia 1999, Vieira e Izar 1999, Vieira et al. 2003, Pimentel e Tabarelli 2004). Desta forma, o estudo deste grupo de pequenos mamíferos se torna importante, uma vez que estão diretamente relacionados com a dinâmica da Mata Atlântica.

Dentre os roedores, a tribo Akodontini é composta de 19 gêneros e 105 espécies, incluindo também o grupo Abrothricine (Musser e Carleton 2005). Várias espécies desta tribo encontram-se no lado leste da América do Sul, algumas sendo endêmicas da Mata Atlântica, outras se distribuindo amplamente neste bioma.

A partir do norte até a região central da Mata Atlântica são encontradas, entre outras, *Akodon cursor* Winge, 1887 ($2n=14-16$) e *Oxymycterus dasytrichus* Schinz, 1821 ($2n=54$), as quais são características de baixas elevações. A primeira espécie está associada, principalmente, com as florestas sempre verdes úmidas, desde o nível do mar até 800 m (Geise et al. 2005) e a outra, *O. dasytrichus*, com as florestas de sub montanha (Bonvicino et al. 1997). O estudo de Umetsu e Pardini (2007) revelou que *A. cursor* não é uma espécie restrita à Mata Atlântica, sendo também encontrada em ambientes de agricultura e de Cerrado.

Na região central e sul da Mata Atlântica ocorre *Thaptomys nigrita* Lichtenstein, 1829 ($2n=52$), sendo encontrada em elevações de intermediárias para altas, mas também com registros em baixas altitudes (Bonvicino et al. 1997). Esta espécie habita a floresta de montanha úmida, composta por vegetação sempre verde dos vales com riachos permanentes e vegetação arbustiva das montanhas, com árvores entre 1,5 e 4 m de altura (Bonvicino et al. 1997). *Thaptomys nigrita* aparece em lugares pouco perturbados e em florestas maduras (Pardini et al. 2005), sendo endêmica da Mata Atlântica (Umetsu e Pardini 2007).

Distribuído na região central da Mata Atlântica é encontrado um táxon do gênero *Akodon* que se caracteriza por apresentar $2n=46$ o qual coletamos nos Estados de Santa Catarina e Espírito Santo. Geise et al. (2001) coletou este táxon no Estado do Rio de Janeiro e o identificou como *A. serrensis*.

Do centro para o sul da Mata Atlântica são encontradas *A. montensis* Thomas, 1913 ($2n=24-25$) e um grupo de espécies com $2n=44$ (*A. mystax*,

Herskovitz 1998; *A. paranaensis*, Christoff et al. 2000; e *A. reigi*, González et al. 1998). Na parte norte de sua distribuição *A. montensis* ocorre ao redor dos 300m de altura (Geise 1995). Onde *A. montensis* e *A. cursor* são simpátricos (Rio de Janeiro, Brasil), a primeira espécie substitui *A. cursor* a 800m de altitude (Geise 1995). O grupo de espécies de $2n=44$ é encontrado desde o centro até o sul da Mata Atlântica e são poucos os relatos dos habitats de suas espécies na literatura, muitas vezes limitando-se às descrições originais.

No sul, com uma distribuição restrita, ocorre *Brucepattersonius iheringi* na qual encontramos um cariótipo de $2n=52$. Esta é uma espécie com limites de distribuição geográfica confusos. As relações filogenéticas desta espécie com os demais taxa do gênero também não estão claras (Eisenberg e Redford 1999).

No presente estudo investigamos seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* em roedores sigmodontinos da tribo Akodontini habitantes da Mata Atlântica da América do Sul a fim de analisar os níveis e os padrões da variação genética destes roedores neste habitat fragilizado. Objetivamos abordar cinco áreas conceptuais: 1) estudar a estrutura filogeográfica em *A. cursor*, *A. montensis* e *O. dasytrichus*, buscando delinear possíveis áreas regionais onde seriam encontrados clados monofiléticos dentro da Mata Atlântica; 2) definição do limite de espécie em *Brucepattersonius iheringi*, *Akodon 2n=44*, *Akodon 2n=46* e *Thaptomys nigrita* dentro do bioma de Mata Atlântica, 3) determinação da idade das linhagens, 4) avaliar os processos de diversificação das espécies aqui estudadas em relação às mudanças geológicas e paleoambientais ocorridas na Mata Atlântica, 5) revelar a estrutura populacional das espécies e suas conseqüências na definição das prioridades de manejo e conservação de alguns taxa deste bioma.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes analisados

Foram escolhidas amostras de *Akodon cursor*, *A. montensis*, *Oxymycterus dasytrichus*, *Thaptomys nigrita*, *Brucepattersonius iheringi*, *Akodon* 2n=46 e 2n=44 obtidas de 35 localidades (19 no presente estudo e 16 do GenBank) que foram analisadas para o gene citocromo *b* (cit *b*, Tabela 1). Para as análises filogenéticas foram utilizados como outgroups *Sigmodon hispidus*, *Abrothrix andinus*, *Calomys callosus* e *Oryzomys megacephalus*. Para as abordagens filogeográficas de *A. cursor* ou *A. montensis* ou *O. dasytrichus* as espécies restantes abordadas neste estudo foram utilizadas como outgroups, evitando, assim, a presença de ramos muito curtos nesta análise.

Todos os indivíduos seqüenciados neste estudo para o gene cit *b* foram cariotipados a fim de confirmar sua identidade (resultados na Tabela 1). Os crânios e peles destes indivíduos estão depositados na coleção de mamíferos do Museu Nacional, Rio de Janeiro e na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

Dados das seqüências

O DNA foi extraído do rim, coração, fígado e músculo (conservados a -20°C ou em etanol 70%), usando o protocolo descrito por Medrano et al. (1990). A seqüência do cit *b* foi isolada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”). Para a amplificação dos primeiros 801 pares de bases do cit *b* foram utilizados os “primers” MVZ 05 (cadeia leve) e MVZ 16 (cadeia pesada), como descrito por Smith e Patton (1993).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase. O seqüenciamento de todos os espécimens foi realizado diretamente a partir dos produtos da PCR purificados, utilizando os “primers” mencionados acima e o “kit” ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, seguindo as instruções do

fabricante. Ambas cadeias foram seqüenciadas com o ABI Prism 3100 Genetic Analyser, as seqüências obtidas estão disponíveis no GenBank, como mostradas na Tabela 1.

Análises dos dados

As seqüências obtidas foram lidas com o programa Chromas 1.45 e alinhadas com o programa Clustal X 1.81 (Thompson et al. 1997), usando os parâmetros do programa e manualmente corrigidas com o programa BIOEDIT (Hall 1999). As distâncias genéticas foram calculadas utilizando o modelo de Kimura 2 parâmetros no programa “Molecular Evolution Genetics Analysis” (MEGA 3; Kumar et al. 2004).

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os algoritmos de Neighbor-joining (NJ) no programa PAUP v.4.0b10 (Swofford 2001); para as análises de Máxima verossimilhança (MV) foi utilizado o programa PHYML v2.4 (Guindon e Gascuel 2003) e para as de Inferência Bayesiana (IB) o programa MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck e Ronquist 2001) o qual gerou a distribuição das probabilidades posteriores, de acordo com o método de Markov chain Monte Carlo (MCMC). Todas as buscas foram efetuadas e nenhuma suposição *a priori* sobre as topologias das árvores foi realizada. O processo MCMC foi ajustado para rodar 4 cadeias simultaneamente por 1.000.000 de gerações, amostrando árvores a cada 100 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 100.000 gerações foram consideradas como “burn-in” e, assim, descartadas.

O modelo de substituição nucleotídica apropriado para as análises de NJ, MV e IB foi determinado utilizando o programa MODELTEST 3.06 (Posada e Crandall 1998).

As análises hierárquicas de diversidade genética das populações foram realizadas utilizando o AMOVA (Excoffier et al. 1992). As análises do teste de Mantel e da distribuição de Mismatch foram realizadas no programa Arlequin 2000 (Schneider et al. 2000).

Estimativas do tempo de divergência

A hipótese do relógio molecular foi testada para o cit *b* utilizando o teste de razão de verossimilhança (“likelihood ratio”, LRT; Huelsenbeck e Rannala 1997) com o programa PAUP* v.4.0b10 (Swofford 2001). As verossimilhanças da árvore com e sem relógio molecular forçado foram comparadas. Como a hipótese do relógio molecular é um modelo simples, a estatística da verossimilhança foi estimada como $2(\ln L_{\text{relógio}} - \ln L_{\text{não relógio}})$. Esta estatística segue uma distribuição de qui-quadrado com $n-2$ graus de liberdade, onde n é o número de seqüências

O tempo de divergência entre os clados foi estimado com o software r8s (Sanderson 2003), mediante a utilização de três diferentes métodos: 1- taxa de substituição uniforme de DNA em toda a filogenia (opção LF); 2- método “nonparametric rate smoothing” (taxa de nivelamento), que admite diferentes taxa de substituição em cada ramo (opção NPRS); e 3- “penalized likelihood” (opção PL) que é um método intermediário entre os dois anteriores. Para a calibração foram utilizados dados de registros fósseis e moleculares. Uma vez que Sigmodontinae tem um registro fóssil limitado, para os três métodos de cálculo foi utilizado um intervalo de tempo de 13 milhões de anos, obtido por Steppan et al. (2004) para a separação de *Sigmodon* e *Oryzomyia*, até 5 milhões de anos para o fóssil de *Prosigmodon oroscoi* (Jacobs e Lindsay 1981). Assim, valendo-se de um intervalo de datas de nodos basais é possível obter um intervalo ao invés de um dado fixo, o que permite abranger todos os cenários de especiação possíveis. A separação de *Akodon* e *Necromys*, datada em 3,55 milhões de anos (Reig 1987) também foi utilizada no cálculo da estimativa do tempo de divergência.

Informação Paleoclimática

As condições paleoclimáticas e as mudanças ambientais ocorridas nos últimos 3,5 milhões de anos foram baseadas em dados palinológicos publicados por Hooghiemstra (1984) para a savana de Bogotá e nos estudos de Mercer (1976)

e Clapperton (1979) referentes ao registro geológico dos glaciais da América do Sul.

RESULTADOS

Filogeografia dos akodontinos que habitam preferencialmente o bioma de Mata Atlântica

As análises de MV, NJ e IB, realizadas num fragmento de 801 pb do gene mitocondrial cit *b* proveniente de 41 espécimes de akodontinos e de quatro espécies utilizadas como “outgroups”, geraram árvores com topologias similares.

A árvore da Figura 1 mostra um sumário das relações filogenéticas das espécies da Mata Atlântica em cuja análise foram incluídas apenas 5 ou 6 representantes de cada uma das espécies da tribo Akodontini aqui investigada. *Oxymycterus dasytrichus* aparece como o clado irmão de todas as espécies aqui estudadas. No clado seguinte está o gênero *Brucepattersonius* como irmão das restantes espécies. A seguir encontram-se dois clados, um formado por *Thaptomys nigrita* e a espécie de *Akodon* com $2n=46$ e outro formado por *A. cursor* como irmã do clado constituído por *A. montensis* e as espécies do gênero *Akodon* com $2n=44$.

A fim de estudar a estrutura filogeográfica, tentando delinear áreas regionais dentro da Mata Atlântica onde são encontrados clados monofiléticos da tribo Akodontini, foram utilizados três espécies que habitam preferencialmente a Mata Atlântica: *Akodon cursor*, *A. montensis* e *Oxymycterus dasytrichus*

Akodon montensis

A análise de 801 pares de bases do gene cit *b* de amostras de 10 localidades revelou uma variação considerável, já que foram obtidos 21 haplótipos. A amostra apresentou 58 sítios variáveis, 59 mutações e 11 trocas de aminoácidos.

As análises de NJ, MV e IB (Fig. 2A), revelaram quatro grupos monofiléticos, um deles formado pelas amostras de São Paulo e Rio de Janeiro, outro por Santa Catarina e Torres (RS), o terceiro agrupamento foi formado pelas seqüências obtidas de amostras do Paraguai (Sapucaia e Caaguazu), Paraná (Parque Iguaçu), Tenente Portela (RS) e Nonoai (RS) e o último agrupamento pela amostras de Tainhas (RS) e Minas Gerais. O mesmo padrão foi observado na análise de Network (Fig. 2B).

A média das distâncias genéticas foi de 1,8%, variando de zero até 3,2%. A distância genética entre os grupos variou de 1,3% até 2,7% (Fig 2A).

A análise da variação molecular (AMOVA) também confirmou a existência dos quatro agrupamentos ($\Phi_{CT}=0.56053$, $p=0.00291$). Esta mesma análise mostrou que estas espécies estão bem diferenciadas em populações ($\Phi_{ST}=0.76537$; $p<0.001$). A diferença entre as populações dentro dos grupos também foi significativa ($\Phi_{SC}=0.50905$; $p=0.00291$). O coeficiente de correlação obtido pelo teste de Mantel não foi muito alto (0.396481), mas significativo ($p=0.000360$). Na análise de distribuição de Mismatch (Fig. 2C) não foram observados sinais de expansão.

Oxymycterus dasytrichus

Foram analisadas 9 localidades desta espécie para os primeiros 801 pares de bases do gene *cit b*, totalizando 14 haplótipos, com a presença de 50 sítios variáveis e o mesmo número de mutações, com 16 mudanças de aminoácidos.

As análises de NJ, MV e IB revelaram quatro grupos com valores de “bootstrap” variáveis (Fig 3A): Minas Gerais-Espirito Santo; Rio de Janeiro e Norte de São Paulo; Sul de São Paulo e Bahia. Estes agrupamentos não foram observados no Network (Fig 3B).

As distâncias genéticas variaram de 0,3% até 3%, com uma média de 1,4%. A existência dos quatro grupos não foi confirmada pela análise de Amova ($\Phi_{CT}=0.36084$, $p=0.06661$), mas esta mesma análise demonstrou que estas espécies apresentam certo grau de diferença entre as populações ($\Phi_{ST}=0.45120$; $p<0.001$). A diferença entre as populações dentro dos grupos não foi significativa ($\Phi_{SC}=0.32177$; $p=0.06623$). O coeficiente de correlação do

teste de Mantel foi alto ($r=0.699761$) e significativo ($p=0.000120$). A análise de Mismatch revelou sinais claros de expansão populacional (Fig 3C).

Akodon cursor

Foram estudadas 12 localidades, as quais apresentaram 24 haplótipos para os primeiros 801 pares de bases do cit *b*. Esta espécie apresentou 118 sítios variáveis e 47 mudanças de aminoácidos. Dois agrupamentos foram observados nas análises de NJ, MV e IB: um formado pelas seqüências obtidas das amostras de Paraíba (Sapé), Bahia (Estação Experimental Djalma, Fazenda Aldeia), Espírito Santo-Minas Gerais (Parque Nacional Caparaó), Alagoas (Usina Caeté), Pernambuco (Caruarú) e Paraná (Guaraqueçaba), aqui denominadas de grupo 1 e outro grupo formado por São Paulo (Fazenda Intervales, Fazenda Capricórnio e Estação Biológica Boracéia), Rio de Janeiro (Fazenda Amazonas), Espírito Santo (Monte Verde) e Paraná (Guaraqueçaba), designado como grupo 2 (Fig 4A).

A distância genética total da amostra foi de 3,3%, variando de zero a 6,7%. A distância genética entre os grupos foi de 4,4%, dentro do grupo 1 foi de 2,9% e dentro do grupo 2 foi de 1,3%. Os dois grupos foram observados nos Network (Fig 4B).

A AMOVA também confirmou a existência de dois grupos ($\Phi_{CT}=0.48265$, $p=0.00216$). Esta mesma análise mostrou que esta espécie tem certo grau de diferenciação entre as populações ($\Phi_{ST}=0.49958$; $p<0.001$). A diferença entre as populações dentro dos grupos não apresentou-se muito alta, mas foi significativa ($\Phi_{SC}=0.25242$; $p=0.01562$). O coeficiente de correlação do teste de Mantel foi baixo ($r=0.219761$) e significativo ($p=0.000800$). A análise de Mismatch (Fig 4C) não mostrou sinais de expansão.

Os limites das espécies

Para estudar a definição do limite de espécie utilizamos os seguintes casos:

1) *Akodon* 2n=46 e *Thaptomys nigrita*, já que o único trabalho da literatura que utilizou estas duas espécies juntas (D'Elia et al. 2003), deixou dúvidas sobre a correta identificação de *Akodon* 2n=46.

2) Dentro do cariótipo 2n=44 da Mata Atlântica são relacionadas três espécies descritas, com limites duvidosos - estudamos as relações entre as mesmas.

3) Apenas duas seqüências do gênero *Brucepattersonius* estão depositadas no GenBank, uma delas identificada por Smith e Patton (1999) como *B. iheringi* proveniente de um indivíduo coletado longe da localidade tipo desta espécie. D'Elia et al. (2003), consideram esta mesma seqüência como sendo de *B. soricinus*. Em vista desta controvérsia, procuramos determinar a verdadeira seqüência de *B. iheringi* a partir de indivíduos coletados perto da localidade tipo.

Thaptomys nigrita

Foram analisadas amostras de uma localidade no Rio Grande do Sul (Sapiranga), uma no Paraná (Parque Nacional Iguaçu), uma em São Paulo (Fazenda Intervales, GenBank) e uma no Espírito Santo (Monte Verde), para os primeiros 801 pares de base do gene *cit b*, resultando em 6 haplótipos com 25 sítios variáveis e 6 mudanças de aminoácidos.

Nas árvores de NJ, MV e IB (Fig 1) foram observados dois grupos: um formado pelas seqüências obtidas das amostras de São Paulo e Espírito Santo e outro pelas seqüências dos indivíduos do Rio Grande do Sul e Paraná. O mesmo padrão foi observado pela análise de Network (Fig 5A). As distâncias genéticas variaram de 0,3% até 2,3%, com uma média de 1,2%. A distância genética dentro do grupo norte foi de 0,5% e dentro do grupo Sul foi de 1,2%, entre os grupos a distância genética foi de 1,75%. A análise de Amova não confirmou a presença dos dois grupos ($\Phi_{CT}= 0.52351$, $p=0.33295$), assim como não revelou estruturação populacional ($\Phi_{ST}=0.57609$; $p=0.06719$). A diferença entre as populações dentro dos grupos não foi significativa ($\Phi_{SC}= 0.28947$; $p=1.00000$).

Akodon 2n=46

Foram analisados 801 pares de bases do cit *b* de exemplares de Santa Catarina (Concórdia), Rio de Janeiro (Macaé, Itatiaia) e Espírito Santo (Parque Nacional Caparaó), sendo observados cinco haplótipos com 54 sítios variáveis e 15 mudanças de aminoácidos. Nas análises de NJ, MV e IB (Fig 1) observamos que as seqüências obtidas dos indivíduos classificados como *Akodon* 2n=46 formaram um clado monofilético. No Network (Fig 5B) é observada a relação entre os haplótipos. A distância genética da amostra foi de 2,9%, variando de 0,6% entre as amostras do Rio de Janeiro até 5,2% entre as amostras de Concórdia e Parque Nacional Caparaó. A distância genética média entre *A. serrensis* e *T. nigrita* foi de 15% (Fig 1).

Akodon 2n=44 (*A. reigi*, *A. mystax* e *A. paranaensis*)

No Genbank estão depositadas uma seqüência para cada uma destas três espécies: *A. reigi* (Lavallejas, Uruguai), *A. mystax* (Rio de Janeiro, Brasil) e *A. paranaensis* (Rio Grande do Sul, Brasil); além de uma seqüência identificada como *Akodon* sp. com 2n=44 capturado em Misiones (Argentina). No presente estudo, adicionamos duas novas seqüências obtidas de indivíduos procedentes de Concórdia/SC (situada entre as localidades das amostras seqüenciadas de *A. mystax* e *A. paranaensis*) e uma nova seqüência de Taim/RS (situado entre as localidades das amostras seqüenciadas de *A. paranaensis* e *A. reigi*). Nas árvores de NJ, MV e IB (Fig 1) foram observados dois clados, um formado pela seqüência de *A. reigi* e a seqüência obtida da amostra de Taim e outro clado reuniu *A. mystax*, *A. paranaensis*, as seqüências obtidas das amostras da Argentina e de Concórdia (Fig 1 e Fig 5C). A menor distância genética foi entre os indivíduos de Concórdia (0,7%) e a maior distância entre os indivíduos da Argentina e do Uruguai (11,3%). Foram observados 105 sítios variáveis, 20 trocas de aminoácidos e a distância genética média foi de 5,4%. O clado formado pelas seqüências da Argentina, *A. mystax*, *A. paranaensis* e Concórdia apresentou distância genética média de 4,9%. O clado formado por *A. reigi* e Taim apresentou uma distância genética média de 0,9%, a distância genética média entre os clados foi de 6,4% (Fig 1).

Brucepattersonius Iheringi

Para os primeiros 801 pares de bases do gene *cit b* foram seqüenciados quatro exemplares de Torres, classificados como *B. iheringi*, os quais foram comparados com as seqüências deste gênero depositadas no GenBank: uma seqüência de *B. Iheringi* e uma de *B. soricinus*. A amostra, incluindo as seis seqüências, apresentou uma distância genética de 8,1%. Todas as árvores (NJ, MV e IB, Fig 1) mostraram que a seqüência de *B. iheringi* do GenBank é mais similar geneticamente com a amostra de *B. soricinus*, que com nossas amostras (Entre *B. iheringi* e *B. soricinus* foi de 1,1%, e entre *B. iheringi* e nossas amostras variou de 5,9% até 9,6%). Dentro de nossas amostras a distância genética variou de 0% até 3,7%. As árvores geradas mostram que as seqüências de *B. iheringi* e *B. soricinus* formam um clado e as amostras de Torres que seqüenciamos formam outro clado (Fig 1 e 5D).

Tempos de divergência

A hipótese de que as seqüências do *cit b* evoluem apresentando um relógio molecular foi rejeitada pelo teste de “likelihood ratio” ($D=54.501$, $df=35$, $p=0.019$). Uma vez que tanto os métodos que assumem relógio molecular como aqueles que não assumem, não apresentaram grandes diferenças em seus resultados ambos são apresentados neste estudo.

Baseados nos dados obtidos na análise filogenética da Fig. 1, as seguintes divergências foram datadas com referência aos nodos da Figura: a) divergência de *Brucepattersonius* no nodo I; b) divergência de *Oxymycterus dasytrichus* no nodo II; divergência de *Thaptomys nigrita* no nodo III; c) divergência de *Akodon* $2n=46$ no nodo IV; d) divergência de *Akodon* $2n=14-16$ no nodo V; e) divergência entre *A. montensis* e *Akodon* $2n=44$ no nodo VI; f) divergência de *Akodon* $2n=44$ no nodo VII; g) divergência entre *A. cursor* e *A. aff. cursor* no nodo VIII; h) divergência do primeiro clado de *A. montensis* no nodo IX; i) divergência do segundo clado de *A. montensis* no nodo X; j) divergência entre o terceiro e quarto clado de *A. montensis* no nodo XI.

Na Tabela 2 pode-se observar que as diferenças entre as médias calculadas para cada um dos nodos e comparadas entre os três modelos para o cit *b*, foram muito baixas (variando de variando de 0 para os três métodos para o nodo da primeira diversificação de *Akodon montensis* até 0,15 milhões de anos na diversificação de *Thaptomys nigrita* e *Oxymycterus dasytrichus*). Além disto, as diferenças entre os interquartis mostram que estas médias variaram entre 2,5 e 2 milhões de anos para a separação de *Brucepattersonius iheringi* e *O. dasytrichus*, entre 1 e 0,5 milhões de anos para a diferenciação de *T. nigrita*, *Akodon* 2n=46, *A. cursor* e o clado de *A. montensis* e *Akodon* 2n=44 e menos de 500.000 anos para a diversificação de *Akodon* 2n=44, e a diversificação em grupos de *A. montensis* e *A. cursor*.

DISCUSSÃO

Análises filogeográficas

O padrão filogeográfico apresentado pelas três espécies foi diferente, já que *Akodon montensis* apresentou quatro grupos, dos quais três foram bem definidos geograficamente, *Oxymycterus dasytrichus* não apresentou uma estruturação em grupos bem definida e *A. cursor* apresentou dois grupos monofiléticos, a princípio, claramente não correlacionados com a geografia.

As seqüências de *Akodon montensis* formaram 4 grupos que corresponderiam à sub-regiões da Mata Atlântica (Galindo-Leal e Gusmão Câmara 2005). Assim, o grupo que reuniu as amostras do Paraguai (Sapucaia e Caaguazu), Paraná (Parque Nacional Iguazu) e Rio Grande do Sul (Tenente Portela e Nonoai) correspondem à sub-região da Mata Atlântica denominada de Florestas de Interior, a qual se estende desde o nordeste de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, composto principalmente por florestas sazonais semidecíduas e florestas sazonais decíduas, campos abertos de vegetação baixa, campos rupestres e áreas de transição. As Florestas de Interior são a transição entre a Mata Atlântica e os biomas adjacentes. O grupo formado pelas seqüências obtidas das amostras de Santa Catarina (Florianópolis) e Rio Grande do Sul (Torres) e o grupo formado por São Paulo e Rio de Janeiro

apresentaram correspondência com a sub-região da Serra do Mar, a qual está composta de florestas ombrófilas densas e, de acordo com Collar et al. (1997), poderia ser dividida em Norte e Sul, divisão esta também presente em nossos resultados.

Outro agrupamento foi observado reunindo amostras do Rio Grande do Sul (Tainhas) e Minas Gerais (Lagoa Santa), o qual encontra-se na sub-região de Florestas de Interior que ia desde o Norte de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Deve-se salientar que este agrupamento apresentou-se como grupo irmão dos três grupos anteriormente descritos. As análises de AMOVA mostram que *Akodon montensis* está estruturada em regiões e populações, não mostrando uma alta correlação entre a distância genética e distância geográfica e sem sinais de expansão. Como as distâncias genéticas entre os grupos foi maior que 0,85% cada grupo apresentaria nível de variação maiores aos esperados para subespécie (Bradley e Baker 2001) e poderiam ser considerados como uma unidade com significância evolutiva (ESU) (Avice 2004, Frankham et al. 2002, Moritz 1994).

Oxymycterus dasytrichus, por sua vez, não apresentou evidências claras de estruturação por regiões pela análise de Amova, no entanto mostrou estruturação por populações. O teste de distribuição de Mismatch não apresentou sinais de expansão, mas o teste de Mantel evidenciou uma forte correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, o que reforça a idéia de estruturação por populações. Gonçalves e Oliveira (2004) também testaram a hipótese de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, mas esta não foi significativa. A análise morfométrica (Gonçalves e Oliveira 2004) mostrou uma continua diferenciação num eixo norte sul, o que poderia estar associado ao nosso resultado de estruturação em populações e correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. A distância genética dentro da espécie está dentro dos limites intraespecíficos para roedores definidos por Bradley e Barker (2001) e Barker e Bradley (2006). A alta variabilidade genética (14 haplótipos em 15 exemplares) poderia não ser representativa devido ao tamanho amostral, no entanto a alta correlação entre a distância genética e a distância geográfica poderia estar demonstrando um limitado, mas contínuo, fluxo gênico. A distância genética média entre os

haplótipos (1,4%) foi superior à esperada para roedores para o nível de subespécie (0,85%), estando acima do valor estabelecido por Bradley e Baker (2001). Assim, uma possível área de conservação deveria ser tão grande como a área de distribuição da espécie, visando manter toda a diversidade genética, já que não foram encontrados grupos dentro desta espécie.

Akodon cursor apresentou dois grupos nas análises de NJ, ML, IB e Network, estes dois grupos foram confirmados na análise de AMOVA estruturada. A análise da distribuição de Mismatch demonstrou que a espécie não está em expansão. Alguns autores (Maia e Langguth 1981, Geise et al. 1998, Geise et al. 2001) reconhecem duas espécies dentro de *A. cursor*, uma tendo $2n=14-15$ distribuindo-se principalmente na Floresta Ombrófila Densa, restrita para o sudeste do Brasil e a outra espécie com $2n=16$ (*A. aff. cursor*) que ocorre ao longo da costa nordeste na Floresta Estacional Semidecídua. Neste estudo analisamos indivíduos com $2n=14-15$ da Floresta Ombrófila Densa e $2n=16$ da Floresta Estacional Semidecídua e da Floresta Ombrófila Densa (Paraná) e observamos que os dois agrupamentos não se relacionam com a procedência geográfica, já que encontramos que exemplares do mesmo local no Paraná (Guaraqueçaba) se posicionam em diferentes grupos e que amostras de locais muito próximos no Espírito Santo (Monte Verde e Parque Nacional Caparaó) também se posicionaram em grupos diferentes. No entanto o grupo 1 reuniu exemplares de $2n=16$ do nordeste (Paraíba, Bahia, Pernambuco, Alagoas) e do sudeste (Paraná) com uma amostra de $2n=14$ de Espírito Santo e o grupo 2 reuniu exemplares com $2n=14-15$ do Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. Resulta evidente que os grupos estão de acordo com os cariótipos e não com a origem geográfica e que Guaraqueçaba (Paraná) e Monte Verde e Parque Nacional Caparaó (Espírito Santo) poderiam representar regiões de polimorfismo ancestral ou contato secundário. Novos estudos com mais amostras desses lugares e outros que apresentem as formas $2n=14-15$ e $2n=16$ permitirão, sem dúvida, entender melhor a história evolutiva de *A. cursor*.

A distância genética dentro dos grupos de *A. cursor* foi alta, mas não foi evidenciada diferenciação das populações dentro dos grupos na análise de AMOVA. A AMOVA estruturada demonstrou-se significativa e a distância

genética média entre os grupos foi alta (4,4%), mas está dentro dos valores da variação intraespecífica observada por Bradley e Baker (2001) e Baker e Bradley (2006) para roedores (até 6,29% e até 4,7%, respectivamente). Em outras palavras, os grupos 1 e 2 mostram distâncias genéticas médias muito maiores que o esperado para o nível taxonômico subespécie (Baker e Bradley 2006), por isso deveriam ser considerados ESU (Avice 2004, Frankham et al. 2002, Moritz 1994), o que implicaria na necessidade de preservação, principalmente daqueles locais onde ambos grupos são simpátricos (Paraná) ou quase simpátricos (Espírito Santo).

Limite de espécies

Várias espécies de Akodontini da Mata Atlântica apresentam dúvidas sobre seus limites, já que se mostram taxonomicamente confusas ou revelam relações incertas com outros taxa. Em ambos os casos, na literatura apenas uma ou poucas seqüências que permitem testar estes limites e relações estão disponíveis. Nesta análise adicionamos seqüências e reavaliamos estas relações, tentando esclarecer estas questões duvidosas.

Nossos resultados indicam (Fig. 1) que *Akodon* $2n=46$ e *Thaptomys nigrita* representam dois taxa, uma vez que ambas formaram um clado monofilético e apresentaram distância genética concordante com o *status* de espécie. Em *T. nigrita* observamos que as seqüências do Rio Grande do Sul e Paraná formam um grupo e as seqüências de São Paulo e Espírito Santo formam outro agrupamento. Esta relação é diferente à observada em *A. montensis*, já que nesta espécie as seqüências do Paraná (mesmo local que *T. nigrita*) são um grupo irmão das seqüências de São Paulo e Rio de Janeiro, mas em *T. nigrita* as seqüências do Paraná formam um grupo irmão com as do Rio Grande do Sul.

As taxa com $2n=44$ da Mata Atlântica mostraram ser um grupo com uma alta variação (distância genética média de 5,4%) o que indicaria a presença de mais de uma espécie (de acordo com Bradley e Baker 2001, Baker e Bradley 2006). Observou-se a formação de dois grupos dentro deste clado, assim, cada um deles poderia representar uma espécie. Na Fig. 1 podemos observar que

as seqüências obtidas de amostras identificadas como *A. paranaensis* formam um clado parafilético com *A. mystax*. Podemos notar que nossa seqüência de Taim se agrupou com a de *A. reigi*, na descrição desta espécie sua área de distribuição chegaria até Taim, isto justifica identificar a amostra de Taim como *A. reigi*. Os resultados desta investigação apóiam a idéia de manter *A. reigi* para as populações do sul (Uruguai e Taim) e juntar os taxa de Rio de Janeiro, Paraná e Venâncio Aires dentro de outra espécie. Como *A. mystax* foi proposto antes que *A. paranaensis* e eles formam um grupo monofilético, *A. mystax* teria prioridade e *A. paranaensis* deveria ser considerado um sinônimo. Deste modo, a realização de mais estudos visando esclarecer o número de espécies dentro de *Akodon 2n=44* são necessários.

Brucepattersonius iheringi foi descrito em Taquara do Novo Mundo (RS, Brasil). Neste estudo coletamos amostras identificadas como *B. iheringi* a 103 km de sua localidade tipo (Torres, RS, Brasil). A correta identificação dessas amostras foram confirmadas cariotipicamente. Observamos que as seqüências obtidas formam um clado monofilético, separado de *B. soricinus* e do representante de *B. iheringi*, ambos coletados em São Paulo (Smith e Patton 1999). A seqüência depositada como *B. iheringi* foi considerada como *B. soricinus* por D'Elia et al. (2003). Assim, concluímos que nossas seqüências correspondem a *B. iheringi*, sendo este o primeiro registro molecular para esta espécie.

Tempo de divergência

Das espécies investigadas neste trabalho, *B. iheringi* apresentou valores (Tabela 2) que estariam no Mioceno tardio, com seus primeiro e terceiro interquartis dentro da idade Messiniano. Os valores de *Oxymycterus dasytrichus* coincidiram com a transição Mioceno-plioceno. Para *Thaptomys nigrita*, os valores corresponderam à transição do Plioceno inicial para o tardio. *Akodon 2n=46* apresentou valores num intervalo coincidente com um clima temperado, de acordo com os registros palinológicos (Hooghiemstra 1984) e de glaciais (Mercer 1976, Clapperton 1979). A diferenciação de *A. cursor* e do clado formado por *A. montensis* + *Akodon 2n=44* teria ocorrido num período de

clima frio, conforme os resultados de Hooghiemstra (1984) utilizando informações palinológicas e de Mercer (1976) e Clapperton (1979), através de registros das variações nos glaciais.

A divergência entre os grupos de *A. cursor* e *A. montensis* ocorreu recentemente, numa época onde o registro dos glaciais mostra a presença de quatro grandes aumentos no volume das massas de gelo. Os intervalos de clima frio poderiam ter isolado populações e gerado a estrutura que encontramos atualmente em *A. montensis* pois, segundo o registro palinológico, o intervalo de 465.000 a 300.000 anos atrás se caracterizou por ser frio, com vegetação de páramo aberta e com intervalos curtos de clima quente; o intervalo de 300.000 à 210.000 anos atrás apresentou clima quente com expansão das florestas; e entre 210.000 e 115.000 ocorreram dois intervalos de clima frio.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e à “Organization of the American States “(OAS) pelo financiamento deste estudo. Os autores são gratos ao Dr. Ives J. Sbalqueiro pelo fornecimento de algumas amostras utilizadas, a Luciano S. Silva pelo auxílio técnico, a Dr. Mara H. Hutz pela disponibilidade para a utilização de seu laboratório e a Dr. Ana L. Garcia pela ajuda na preparação das figuras e na redação do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed Sinauer Associates, INC., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Barboza F, Pinazzo J and Fracchia F (1997) Bosque Atlántico Interior 1997. Mapa. Proyecto Sistema Ambiental de la Región Oriental (SARO). Asunción: Ministerio de Agricultura y Ganadería e World Wildlife Fund.
- Barker RJ and Bradley RD (2006) Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *J Mammal* 87: 643-662.

- Bonvicino CR, Langguth A, Lindbergh SM and de Paula AC (1997) An elevational gradient study of small mammals at Caparaó National Park, South eastern Brazil. *Mammalia* 61: 547-560.
- Bradley RD and Baker RJ (2001) A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *J Mammal* 82: 960-973.
- Christoff AU, Fagundes V, Sbalqueiro IJ, Mattevi MS and Yonenaga-Yassuda Y, (2000). Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *J Mammal* 81: 838-851.
- Clapperton CM (1979) Glaciation in Bolivia before 3.27 Myr. *Nature* 277: 375-377.
- Collar NJ, Wege DC and Long AJ (1997) Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna. *Ornithological Monographs* 48: 237–260.
- D’Elia G, González EM and Pardiñas UFJ (2003) Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muridea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mamm Biol* 68: 1-14.
- Eisenberg JF and Redford KH, (1999). *Mammals of the Neotropics: the central Neotropics*. University of Chicago Press. Chicago.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application of human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB and Patton JL (1996) Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occas Pap Conserv Biol* 4:1-38.
- Frankham R, Ballou J and Briscoe D (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York.
- Galindo-Leal C and Gusmão Câmara I (2005) *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica Belo Horizonte. pp. 472.
- Geise L (1995) Os roedores Sigmodontinae do Estado do Rio de Janeiro (Rodentia, Muridae). *Sistemática, citogenética, distribuição e variação geográfica*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

- Geise L, Canavez FC and Seuánez HN (1998) Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from southeastern Brazil. *J Heredity* 89: 158-163.
- Geise L, Moraes D and da Silva HS (2005) Morphometric differentiation and distributional notes of three species of *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae, Akodontini) in the Atlantic coastal area of Brazil. *Arquivo do Museu Nacional, Rio de Janeiro* 63: 63-74.
- Geise L, Smith MF, Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: Mitochondrial DNA sequence analysis. *J Mammal* 82: 92-101.
- Gonçalves PR and Oliveira JA (2004) Morphological and genetic variation between two sympatric forms of *Oxymycterus* (Rodentia, Sigmodontinae): An evaluation of hypotheses of differentiation within the genus. *J Mammal* 85(1): 148-161.
- González EM, Langguth A and De Oliveir LF (1998) A new species of *Akodon* from Uruguay and Southern Brazil (Mammalia: Rodentia: Sigmodontinae). *Com Zool Mus Hist Nat Montevideo* 191: 1-8.
- Grelle CEV and Garcia QS (1999). Potential dispersal of *Cecropia hololeuca* by the common opossum (*Didelphis aurita*) in Atlantic forest, southeastern Brazil. *Revue D'Ecologie – La Terre et La Vie* 54: 327–332.
- Guindon S and Gascuel O (2003) A simples, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Herskovitz P (1998) Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with description of a new genus and six new species. *Bonn Zool Beitr* 47: 193-256.
- Hooghiemstra H (1984) Vegetacional and climatic history of the high plain of Bogota, Colombia. *Dissertations Botanicae–Band* 79. 337p.
- Huelsenbeck JP and Ronquist F (2001) MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

- Huelsenbeck JP and Rannala B (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in an evolutionary context. *Science* 276: 227-232.
- Jacobs LL and Lindsay EH (1981) *Prosigmodon oroscoi*, a new sigmodont rodent from the late Tertiary of Mexico. *J Paleontol* 55: 425–430.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) Mega3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Laclau P (1994) La conservación de los recursos naturales y el hombre en la Selva Paranaense. *Boletín Técnico* 20. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina, Fondo Mundial Para la Naturaleza.
- Maia V and Langguth A (1981) New karyotypes of Brazilian *Akodont* rodents with notes on taxonomy. *Mamm Biol* 46: 241-249.
- Medrano JF, Aasen E and Sharrow L (1990) DNA extraction nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Mercer J (1976) Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Res* 6: 125–166.
- Morello J and Matteucci FD (1999) Biodiversidad y fragmentación de los bosques en la Argentina. In: Matteucci FD, Solbrig O, Morello J and Halffter G (eds) *Biodiversidad y uso de la tierra: conceptos y ejemplos en Latinoamérica*. Colección CEA 24, Buenos Aires: Eudeba, p. 463–499.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Tree* 9:373–375.
- Musser GG and Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE and Reeder DM (eds) *Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 894-1531.
- Pardini R, Souza SM, Braga-Neto R and Metzger JP (2005) The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biological Conservation* 124: 253-266.
- Perucca AR and Ligier HD (2000) Clasificación de montes forestales nativos, mediante imágenes satelitales en la provincia de Misiones, Argentina. In: IX Simposio Latinoamericano de Percepción Remota. Puerto Iguazú,

Misiones: Editorial, Sociedad Latinoamericana de Percepción Remota (SELPER).

- Pimentel DS and Tabarelli M (2004). Seed dispersal of the palm *Attalea oleifera* in a remnant of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 36: 74–84.
- Pizo MA (1997) Seed dispersal and predation in two populations of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 13: 559–578.
- Por FD, Imperatriz Fonseca VL and Neto FL (2005) *Biomass do Brasil: Uma história ilustrada* 207pp
- Posada D and Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Reig OA (1987) An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Fieldiana Zool* 39: 347-399.
- Rizzini CT (1997) *Tratado de fitogeografia do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural.
- Sanderson MJ (2003) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19, 301-302.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000) Arlequin version 2.0: a software for population genetic data. Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Smith MF and Patton JL (1993) The diversification of South-American murid rodents: evidence from mitochondrial-DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biol J Linn Soc* 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.
- Steppan SJ, Adkins RM and Anderson J (2004) Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst Biol* 53 533-553.

- Swofford DL (2001) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4.0b10, Sinauer Associates, Inc, Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Umetsu F and Pardini R (2007) Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats-evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. *Landscape Ecol* 22: 517-530.
- Vieira EM and Izar P (1999). Interactions between aroids and arboreal mammals in the Brazilian Atlantic rainforest. *Plant ecology* 145: 75–82.
- Vieira EM and Monteiro-Filho ELA (2003). Vertical stratification of small mammals in the Atlantic rain forest of south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19: 501–507.

Tabela 1: Espécimes da tribo Akodontini utilizados no presente estudo.

Taxon	Procedência	Catálogo de campo	Coordinates	2n	
		<i>Ingroup</i>			
<i>Akodon cursor</i>	PN caparaó	PH10081	20°28'S,41°48'W	14	
	Faz. Amazonas	AMS14	22°01'S,43°12'W	14	
	Faz. Amazonas	AMS23	22°01'S,43°12'W	14	
	Guaraqueçaba	P768	25°18'S,48°20'W	14	
	Monte Verde	AL2316	19°53'S,13°58'W	14	
	Monte Verde	AL2541	19°53'S,13°58'W	15	
	Monte Verde	AL2542	19°53'S,13°58'W	15	
	Monte Verde	AL2543	19°53'S,13°58'W	15	
	Monte Verde	AL2334	19°53'S,13°58'W	14	
	Monte Verde	AL2277	19°53'S,13°58'W	14	
	Faz. Intervalles	MVZ182072	24°20'S,48°25'W	#	
	Faz. Capricornio	MVZ182075	23°24'S,45°04'W	#	
	EB Boracéia	MZUSP29257	22°11'S,48°46'W	#	
	<i>Akodon aff. cursor</i>	Caruaru	MAS10	08°17'S,35°59'W	16
U. Caeté		AL3406	09°47'S,36°05'W	16	
Faz. Aldeia		AL3456	13°22'S,39°05'W	16	
Sapé		AL3609	07°06'S,35°14'W	16	
Sapé		AL3611	07°06'S,35°14'W	16	
Sapé		AL2557	07°06'S,35°14'W	16	
Sapé		AL2582	07°06'S,35°14'W	16	
Sapé		AL2583	07°06'S,35°14'W	16	
Guaraqueçaba		P765	25°18'S,48°20'W	16	
Guaraqueçaba		P766	25°18'S,48°20'W	16	
EE Djalma		EDH30	15°18'S,39°06'W	*	
<i>Akodon Montensis</i>	PN Iguaçu	JR80	25°30'S,54°34'W	24	
	PN Iguaçu	JR81	25°30'S,54°34'W	24	
	Nonoai	JR153	27°21'S,52°47'W	24	
	Tte Portela	PF94	27°22'S,53°45'W	24	
	EB Boracéia	FMNH141602	22°11'S,48°46'W		
	Itatiaia	MNRJ48066*	22°23'S,44°43'W		
	Itatiaia	AL3470	22°23'S,44°43'W	24	
	Faz. Intervalles	INT2	23°24'S,45°44'W	24	
	Torres	AC49	29°21'S,49°44'W	24	
	Torres	AC117	29°21'S,49°44'W	24	
	Torres	ZE09	29°21'S,49°44'W	24	
	Torres	ZE10	29°21'S,49°44'W	24	
	Florianopolis	LF1990	27°35'S,48°34'W	24	
	Lagoa Santa	LS04 ₃ II	19°38'S,43°53'W	24	
	Tainhas	JR200	29°16'S,50°18'W	24	
	Tainhas	ZE21	29°16'S,50°18'W	24	
	Tainhas	ZE22	29°16'S,50°18'W	24	
	Tainhas	ZE23	29°16'S,50°18'W	24	
	Tainhas	ZE40	29°16'S,50°18'W	24	
	continuação da Tabela 1	Sapucaia/Pi	GD513	25°40'S,56°55'W	
		Sapucaia/Pi	UMMZ174969	25°40'S,56°55'W	
		Caaguazu/Pi	UMMZ133985	25°10'S,56°26'W	
			MN62260		
		MVZJLP16283			
	MN62254				
	MN62258				

<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	Parati		23°03'S,44°36'W	
	EB Boracéia		22°11'S,48°46'W	
	Ilha Grande		23°09'S,44°14'W	
	Ilha Grande		23°09'S,44°14'W	
	Ilha Grande		23°09'S,44°14'W	
	Viçosa		20°45'S,42°52'W	
	Santa Teresa		19°58'S,40°32'W	
	Monte Verde		19°53'S,13°58'W	54
	Monte Verde		19°53'S,13°58'W	54
	Viçosa		20°45'S,42°52'W	
	Venda Nova		20°20'S,41°08'W	
	Faz. Intervalles		23°24'S,45°44'W	
	Faz. Intervalles		23°24'S,45°44'W	
	Porto Seguro		15°45'S,40°05'W	54
<i>Thaptomys nigrita</i>	Sapiranga	LF547	29°53'S,51°00'W	52
	Sapiranga	LF552	29°53'S,51°00'W	52
	PN Iguaçu	JR76	25°30'S,54°34'W	52
	PN Iguaçu	JR77	25°30'S,54°34'W	52
	Monte Verde	AL2378	19°53'S,13°58'W	52
	EB Boracéia	MVZ183044	22°11'S,48°46'W	
<i>Akodon 2n= 46</i>	Concordia	VHT	25°55'S,51°06'W	46
	Macaé	VPF20	22°23'S,41°47'W	46
	PN caparaó	PH10247	20°28'S,41°48'W	46
	Nova Friburgo	MNRJ35927	22°26'S,42°32'W	46
	?			
<i>Akodon sp 2n=44</i>	Concordia	VHT174	25°55'S,51°06'W	44
	Concordia	VHT189	25°55'S,51°06'W	44
	Taim	LF607	32°30'S, 52°35'W	44
	Itatiaia	MNRJ48041	22°23'S,44°43'W	44
	Venancio Aires	CIT1131	29°36'S,52°12'W	
	Lavallejas/Uy	MNHN3682	34°21'S,57°06'W	
	PP I Malvinas	MMP2441	26°S,54°W	
<i>Brucepattersonius iheringi</i>	Torres	LF561	29°21'S,49°44'W	52
	Torres	LF563	29°21'S,49°44'W	52
	Torres	LF651	29°21'S,49°44'W	52
	Torres	LF684	29°21'S,49°44'W	52
	Faz. Intervalles	MVZ183250	23°24'S,45°44'W	
<i>B. soricinus</i>	EB Boracéia	MVZ183036	22°11'S,48°46'W	
		<i>Outgroups</i>		
<i>Sigmodon hipsimys</i>	Puntarenas/CR	BYU15259		
<i>Abrothrix andinus</i>	Arequipa/Peru	MVZ174066		
<i>Calomys callosus</i>	?	GD 421		
<i>Oryzomys megacephalus</i>	?	GD 463		

Tabela 2: Tempos de divergência calculados para os nodos de 1 a 12, utilizando os métodos de LF, PL e NPRS.

	PL	PL	PL	LF	LF	LF	NPRS	NPRS	NPRS
	1 quartil	2 quartil	3 quartil	1 Quartil	2 Quartil	3 Quartil	1 Quartil	2 Quartil	3 Quartil
<i>Brucepattersonius</i>	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75
<i>Dasytrichus</i>	5,27	6,33	7,73	5,27	6,33	7,73	5,39	6,34	7,51
<i>Akodon-Necromys</i>	4,73	5,54	6,78	4,73	5,54	6,78	4,78	5,39	6,31
<i>Thaptomys nigrita</i>	3,5	3,71	4,54	3,5	3,71	4,54	3,5	3,5	3,95
<i>A. serrensis</i>	3,22	3,47	4,24	3,22	3,47	4,24	3,27	3,32	3,65
<i>A. cursor</i>	2,58	2,85	3,48	2,58	2,85	3,48	2,63	2,71	2,91
2n=24-44	1,63	1,87	2,29	1,63	1,87	2,29	1,82	1,89	2,01
<i>Akodon</i> 2n=44	1,19	1,39	1,7	1,19	1,39	1,7	1,36	1,42	1,52
aff-cursor	0,88	1,05	1,28	0,88	1,05	1,28	1,05	1,09	1,17
montensis1	0,49	0,58	0,71	0,49	0,58	0,71	0,63	0,66	0,71
montensis2	0,25	0,3	0,37	0,25	0,3	0,37	0,28	0,3	0,32
montensis3-4	0,19	0,23	0,28	0,19	0,23	0,28	0,2	0,21	0,23
	0,14	0,17	0,21	0,14	0,17	0,21	0,14	0,15	0,16

legendas

Figura 1: Árvore filogenética obtida com o método de máxima verossimilhança utilizando o modelo GTR +I+G. Os valores sobre os braços representam o “bootstrap” de MV, probabilidade posterior para IB, “bootstrap” de NJ.

Figura 2: *Akodon montensis* A) Árvore filogenética obtida com o método de máxima verossimilhança utilizando o modelo GTR +I+G. Os valores sobre os braços representam o “bootstrap” de MV, probabilidade posterior para IB, “bootstrap” de NJ B) Median-joining network C) Mismatch distribution.

Figura 3. *Oxymycterus dasytrichus*: A) Árvore filogenética obtida com o método de máxima verossimilhança utilizando o modelo GTR +I+G. Os valores sobre os braços representam o “bootstrap” de MV, probabilidade posterior para IB, “bootstrap” de NJ.. B) Median-joining network C) Mismatch distribution.

Figura 4: *Akodon cursor* A) Árvore filogenética obtida com o método de máxima verossimilhança utilizando o modelo GTR +I+G. Os valores sobre os braços representam o “bootstrap” de MV, probabilidade posterior para IB, “bootstrap” de NJ. B) Median-joining network C) Mismatch distribution.

Figura 5: Median-joining network de A) *Thaptomys nigrita*, B) *Akodon* 2n=46, C) *Akodon* 2n=44 e D) *Brucepattersonius*.

Figura 1

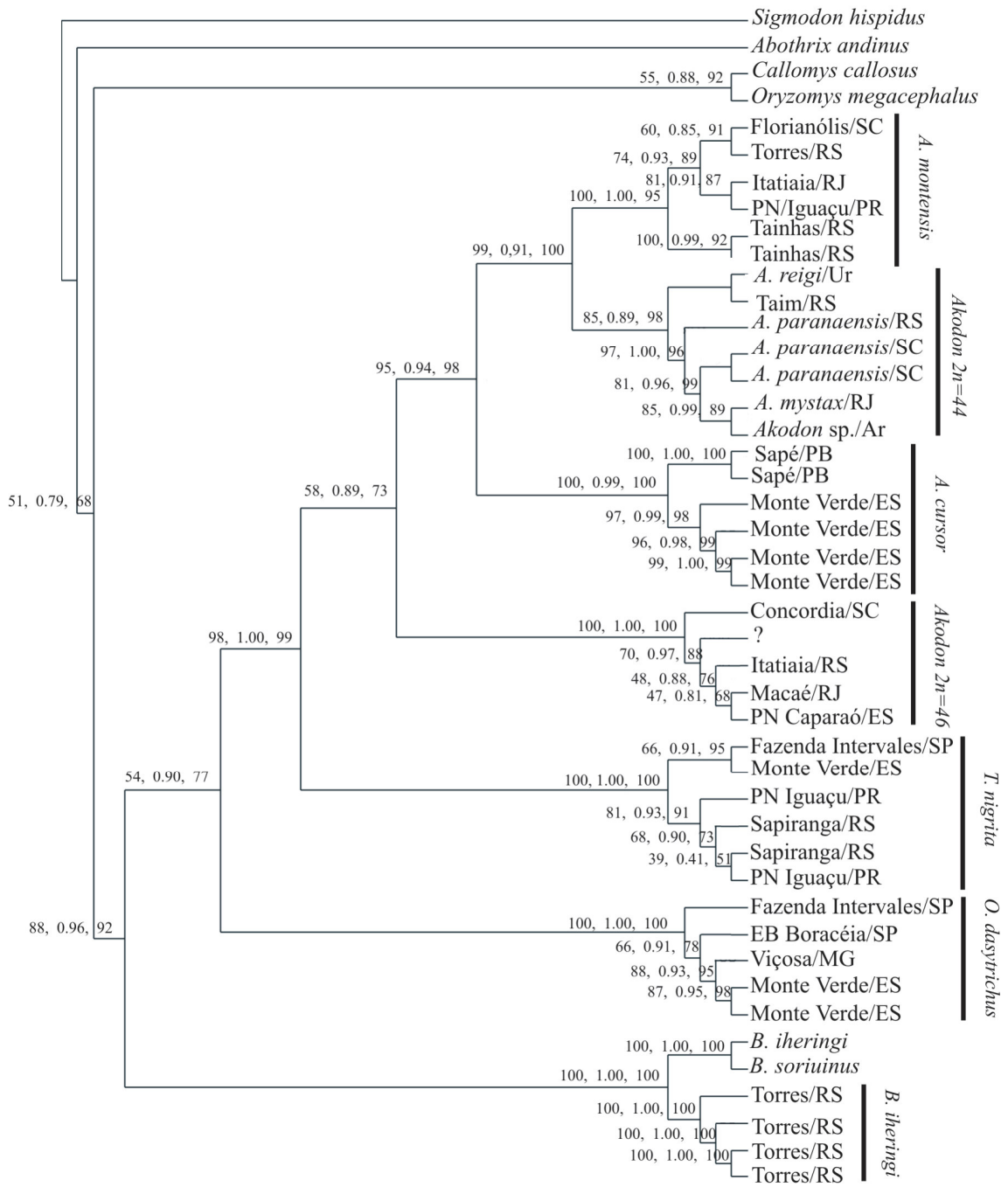
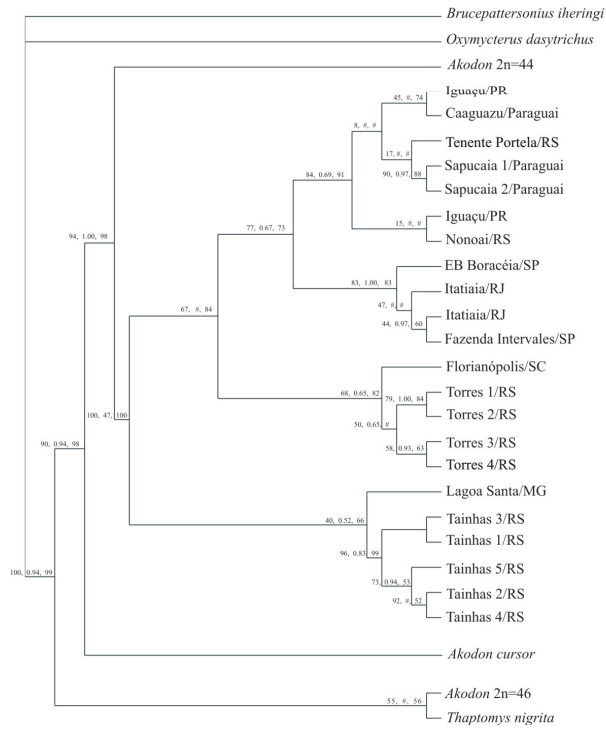
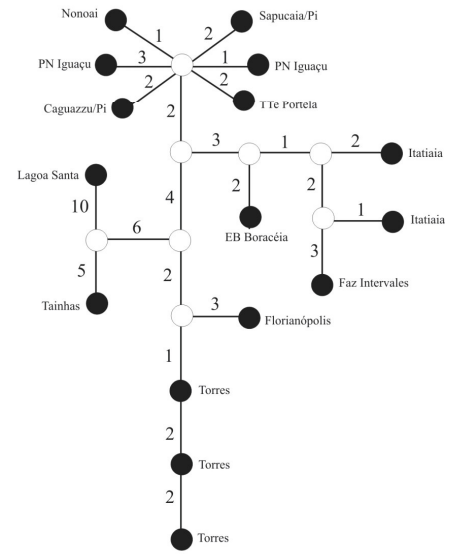


Figura 2

A



B



C

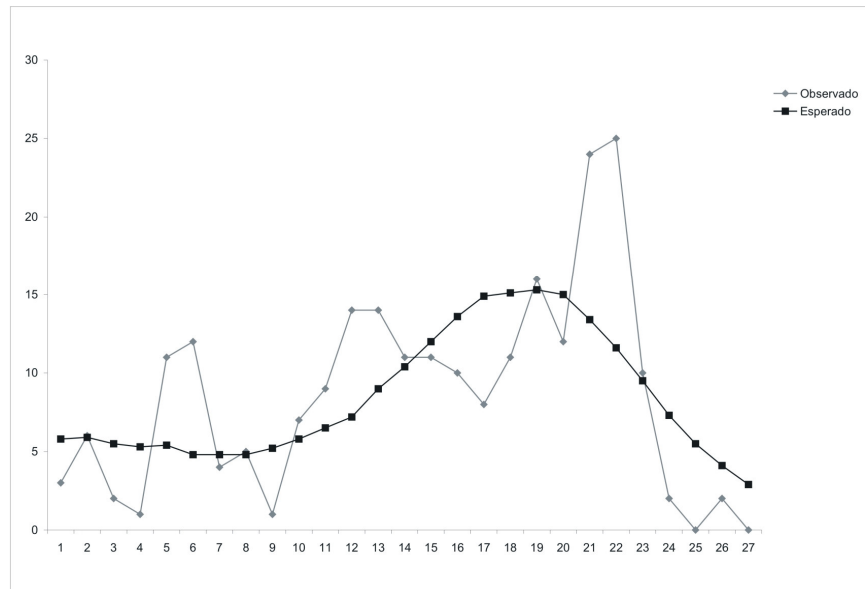
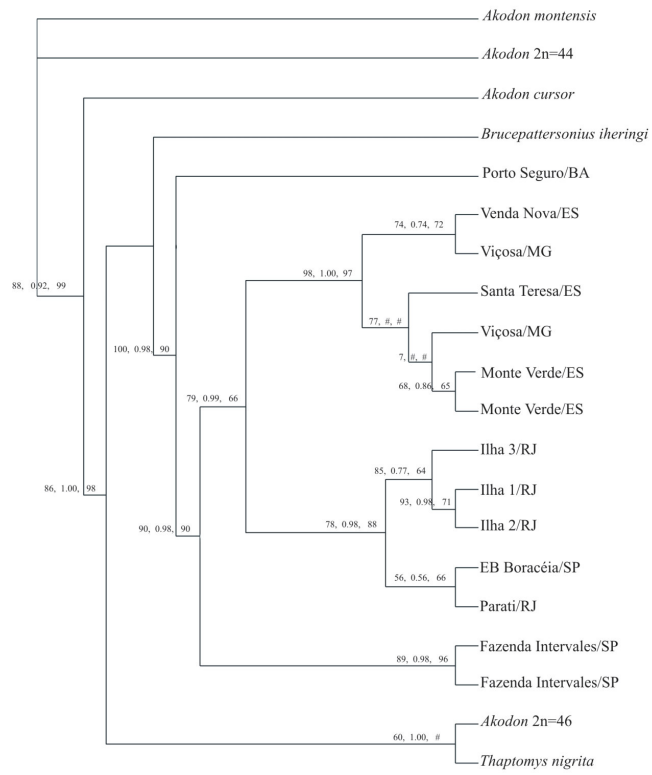
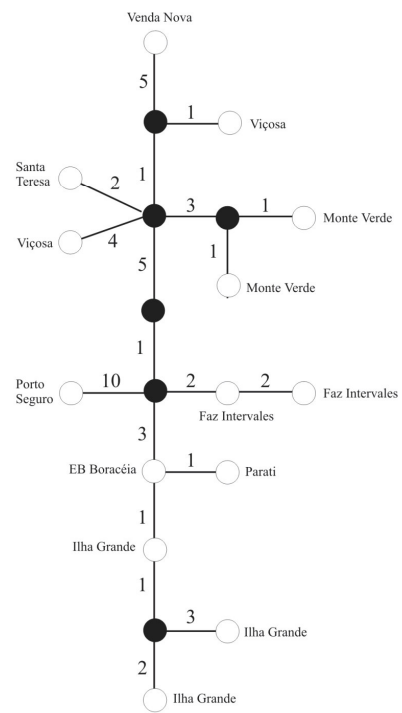


Figura 3

A



B



C

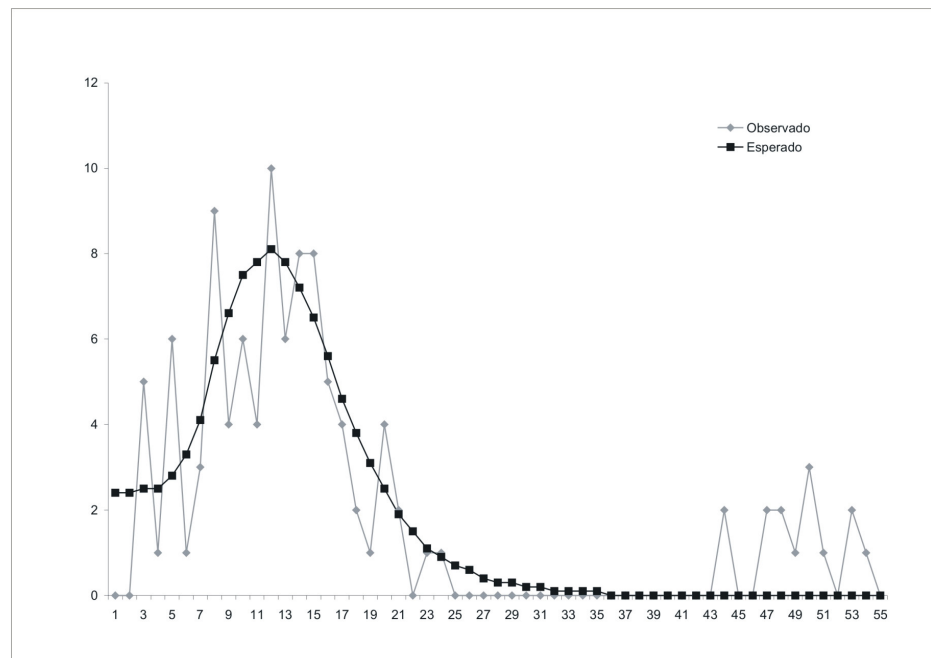
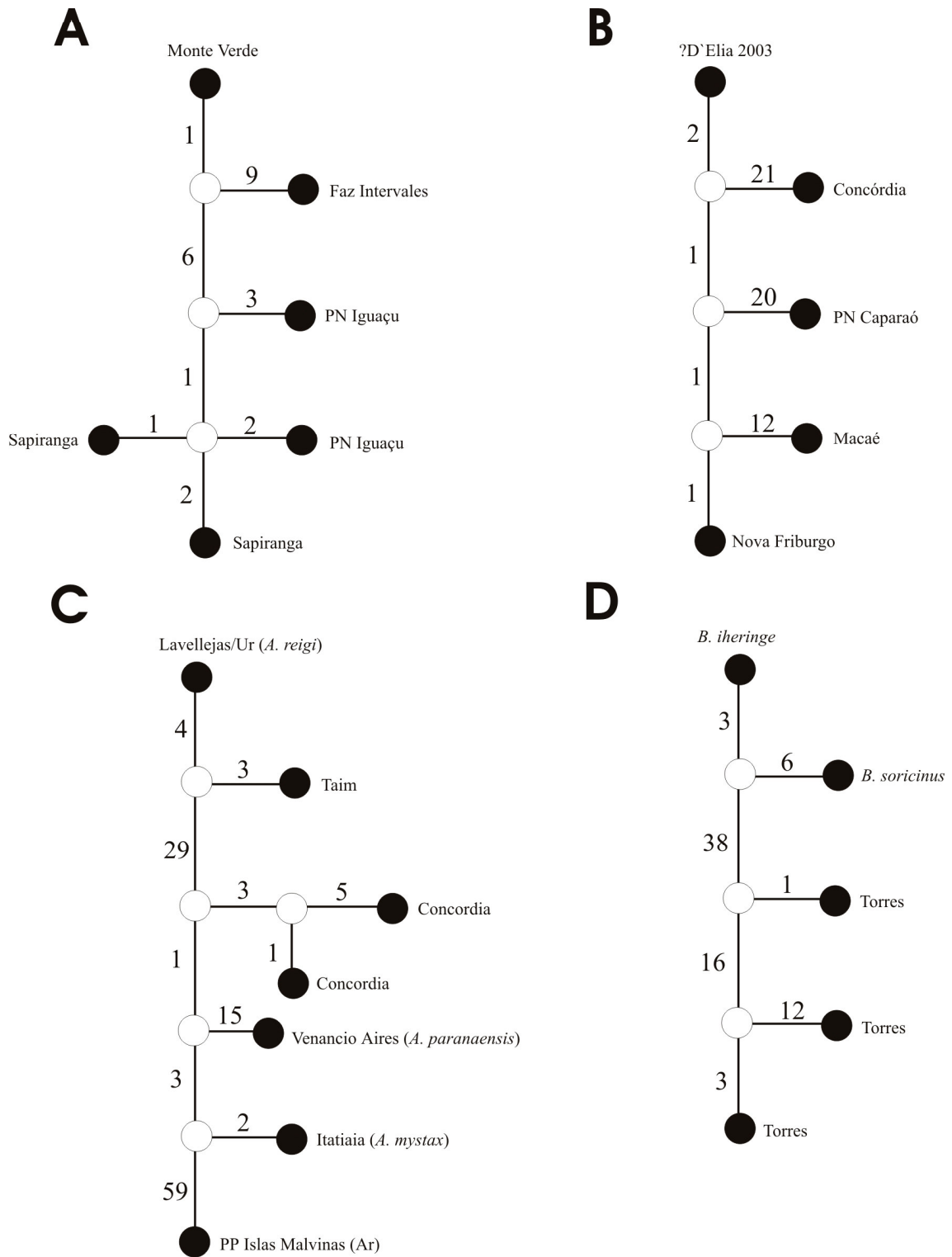


Figura 4



CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

A classificação e a composição de espécies da tribo Akodontini têm passado por diversas mudanças ao longo de seus mais de 200 anos de história, principalmente nos últimos anos, com a utilização das análises de seqüências gênicas, mitocondriais ou nucleares. Outras fontes de informação e estudo também têm contribuído com dados que ajudaram a construir a classificação e composição atual da tribo, mas uma nova definição sob o ponto de vista morfológico, cromossômico ou ecológico-distribucional ainda não está disponível para esta tribo. Algumas das mudanças ainda não são totalmente aceitas nas classificações atuais, enquanto outras já se apresentam em um estado mais conclusivo.

As primeiras informações provenientes de estudos moleculares que levaram a duvidar da classificação da tribo Akodontini derivaram do trabalho de Smith e Patton (1991). Neste estudo os autores observaram, a partir de árvores filogenéticas construídas por parcimônia, que o gênero *Akodon* não seria monofilético, já que duas espécies, *A. (Chroeomys) jelskii* e *A. andinus*, até então consideradas como pertencentes a este gênero não se agruparam com outras oito espécies de *Akodon* utilizadas em sua investigação. Além disso, um gênero reconhecido (*Microxus*) ficou agrupado dentro do clado formado pelas espécies do gênero *Akodon*. Deste modo, os autores propuseram que *Chroeomys* deveria ser considerado um gênero diferente de *Akodon* e deveria conter *C. jelskii* e *C. andinus* e que *Microxus* não deveria receber o *status* de gênero.

Um ano mais tarde os mesmos autores (Patton e Smith 1992a) reavaliaram os resultados do estudo anterior e, juntamente com outros dados disponíveis na literatura, propuseram as seguintes alterações na classificação da tribo Akodontini:

- 1) Não considerar *Microxus* como um gênero pleno;
- 2) Elevar *Abrothrix* ao *status* de gênero. É importante esclarecer que nem neste estudo, nem no anterior, os autores haviam avaliado molecularmente espécies

de *Abrothrix*, de modo que esta segunda proposta foi baseada nas informações e conclusões de Hershkovitz (1990) e de Spotorno et al. (1990);

3) Considerar *Chroeomys*, tradicionalmente classificado como um subgênero de *Akodon*, como um gênero pleno. Esta proposta foi estabelecida a partir de dados morfológicos (Voss e Linzey 1981), cromossômicos (Spotorno et al. 1990), de eletroforese de isozimas (Patton et al. 1990) e análises de seqüências de DNA mitocondrial (Smith e Patton 1991), nas quais foi observado que *C. jelskii* é, na verdade, muito diferente das espécies do gênero *Akodon*;

4) Reafirmar a categoria de gênero para *Bolomys* (= *Necromys*), com base nas revisões de Reig (1987) e Anderson e Olds (1989) e nos dados moleculares de Smith e Patton (1991)

5) As análises moleculares realizadas por Smith e Patton (1991) revelaram que algumas espécies classificadas dentro do gênero *Akodon* são, na verdade, geneticamente mais similares com espécies de outros gêneros. Este foi, por exemplo, o caso de "*Akodon*" *andinus*. Esta espécie estava filogeneticamente mais relacionada com *C. jelskii* do que com outras espécies de *Akodon* e, por isso, foi proposto, até a realização de um estudo dos limites distribucionais deste gênero, que esta espécie deva ser incluída dentro do clado *Abrothrix*.

Em um estudo posterior, Smith e Patton (1993) avaliaram 801 pares de bases do gene citocromo *b*, propondo novas alterações na classificação da tribo Akodontini. Ao incluírem *Hypsimys siberiae* (a espécie tipo do gênero *Hypsimys*) na análise, os autores verificaram que a mesma agrupou-se com o clado das espécies de *Akodon*, o que os levou a propor que *Hypsimys* não deveria ser considerado como um gênero válido.

Também neste artigo observaram que *Bolomys* (= *Necromys*) não representa um clado monofilético e que *A. uruchi* está associado com este gênero. Outro fato interessante observado neste estudo foi que as três espécies de *Oxymycterus* formam um clado monofilético e que, em todas as análises, *Lenoxus* esteve associado ao clado de *Oxymycterus*. Estes dois gêneros, no entanto, não formaram um clado monofilético como proposto por Hershkovitz (1966) e Reig (1980, 1987).

Ainda neste estudo, Smith e Patton (1993), encontraram um clado formado por uma mistura de taxa o qual foi denominado de “grupo andino central e sul”, integrado por: *Akodon andinus*, *A. olivaceus*, *Chroeomys jelskii*, *Abrothrix longipilis*, *Chelemys macronyx*, *Notiomys edwardsii*, e *Geoxus valdivianus*. Isto levou estes autores a concluir que não seria possível afirmar que a tribo Akodontini é monofilética. Os autores observaram que o gênero *Akodon*, quando estudado em sentido restrito (sem as espécies que se associaram com outros gêneros), é recuperado como monofilético e estaria constituído por dois grupos: um formado por *Akodon mollis*, *A. orophilus*, *A. aerosus*, *A. torques*, *A. (=Microxus) mimus* e *A. (=Hypsomys) siberiae*, com alto suporte de *bootstrap*, e o outro grupo estaria constituído por *A. cursor* (= *A. montensis*), *A. juninensis*, *A. kofordi*, *A. subfuscus*, *A. puer*, *A. boliviensis*, *A. azarae* e *A. toba*, grupo este apoiado por baixo valor de *bootstrap*. As espécies do primeiro grupo são características das encostas florestadas dos Andes, se estendendo do norte da Bolívia, através do Peru, até o Equador. Já o segundo grupo reuniu taxa amplamente distribuídos desde a parte alta dos Andes até as terras baixas da Bolívia e Paraguai e o pampas da Argentina. Neste último agrupamento os autores encontraram muitas espécies incluídas no grupo *A. boliviensis* (Myers et al. 1990), mas este grupo não foi monofilético. Outro aspecto interessante ocorreu com *Bolomys* (= *Necromys*) que não formou um clado monofilético, porém, os autores preferiram manter seu *status* de gênero.

Smith e Patton (1993) testaram o chamado “grupo andino central e sul”, encontrando que “*Akodon*” *olivaceus* e “*A.*” *andinus* se associaram formando o grupo irmão de *Abrothrix longipilis* e *Chroeomys jelskii*. Todas estas espécies constituíram um grupo monofilético, apoiado por alto *bootstrap*, irmão do agrupamento constituído por *Chelemys macronyx*, *Notiomys edwardsii* e *Geoxus valdivianus*, também com alto *bootstrap*. Estes sete taxa formaram um grupo único com 100% de *bootstrap*. Ainda neste estudo, os autores salientaram um conjunto de características compartilhadas tanto pelas espécies do grupo andino central como pelas do grupo andino do sul: todas ocorrem nos Andes, desde o sul do Peru até o extremo sul da Argentina e do Chile e todas apresentam o mesmo $2n=52$. Outra colocação dos autores foi que o “grupo andino central e sul” não se encontrou proximoamente relacionado

com *Akodon* (*sensu stricto*) como proposto por Reig (1987), nem está relacionado com “oxymycterini” (Hershkovitz 1966).

Smith e Patton (1999) pesquisaram as relações filogenéticas entre as tribos da subfamília Sigmodontinae através da análise de 1.140 pares de bases do gene citocromo *b*. Foi observado que “*Akodon*” *urichi* está mais relacionado com *Bolomys* (= *Necromys*) que com *Akodon*. Os autores verificaram que *Necromys* formou um clado monofilético. Pela primeira vez, foi incluído “*A.*” (*Thaptomys*) *nigrita* em uma análise molecular e, como esta não apresentou-se dentro do clado de *Akodon*, foi sugerido o *status* de gênero para *Thaptomys* como proposto por Hershkovitz (1998). Em todas as análises deste estudo foi verificado um agrupamento das seqüências de *Brucepattersonius* com *Blarinomys*. *Lenoxus*, por sua vez, agrupou-se muitas vezes com *Blarinomys* e estes três gêneros se relacionaram com *Oxymycterus*.

Além das espécies do “grupo andino central e sul” estudadas em seus dois trabalhos anteriores, Smith e Patton (1999) incluíram “*A.*” *xanthorhinus* e *Pearsonomys annectens*, encontrando novamente que o “grupo andino central e sul” foi monofilético e não diretamente relacionado com *Akodon*. Todas as evidências levaram os autores a propor que este “clado andino” deveria ser organizado numa tribo separada de Akodontini, para a qual propuseram o nome de Abrotrichini. Além de confirmar a separação do clado andino, este trabalho apresentou outro resultado surpreendente, já que duas das três espécies da tribo Scapteromyini (*Scapteromys tumidus* e *Kunsia tomentosus*) agruparam-se, em todas as análises, com três gêneros da tribo Akodontini (*Blarinomys*, *Brucepattersonius* e *Lenoxus*), o que levou os autores a não reconhecer a tribo Scapteromyini e, por sua vez, expandir a tribo Akodontini a fim de incluírem *Scapteromys* e *Kunsia*.

D’Elia (2003) revisou muitas das conclusões dos trabalhos anteriores, mas enriqueceu a análise com uma combinação de seqüências mitocondriais (citocromo *b*) e nucleares (IRBP). Novamente, foram utilizados “*Akodon*” *andinus*, “*A.*” *olivaceus*, *Abrothrix longipilis*, *Chelemys macronyx*, “*Chroeomys*” *jelskii*, *Geoxus valdivinus* (representando quatro dos seis gêneros do “clado andino”). O autor corroborou a proposta de monofilia deste agrupamento e confirmou que este grupo não estaria incluído na radiação dos Akodontini,

conforme já evidenciado por Smith e Patton (1991, 1993, 1999). Sobre esta questão, o autor ainda, discutiu a classificação das espécies dentro da tribo nascente. Os resultados deste estudo, não só reforçaram a remoção do grupo Abrotrichini (=Abrothricine ou “clado andino”) dos limites da tribo Akodontini, mas também, confirmaram que *Scapteromys* (*S. aquaticus* e *S. tumidus*) e *Kunsia* (*K. tomentosus*) pertencem à tribo Akodontini. Alguns anos mais tarde, D’Elia et al. (2005) certificaram, a partir do estudo filogenético dos genes IRBP e citocromo *b*, que *Bibimys* também pertence à tribo Akodontini, mas não forma um grupo monofilético com *Scapteromys* e *Kunsia*. Assim, neste trabalho foi confirmada a redefinição dos limites e a composição de espécies da tribo Akodontini, como previamente proposta por Smith e Patton (1999).

Um outro ponto que não foi discutido nem observado por Smith e Patton (1993, 1999), nem por D’Elia (2003) refere-se ao fato de que a amostra identificada por Smith e Patton (1993) como “*Akodon*” *uruchi* associou-se neste e em outros dois trabalhos (Smith e Patton 1999, D’Elia 2003), com *Necromys*. O gênero *Necromys* é caracterizado por um cariótipo de $2n=34$ e pouca variação na forma de seus cromossomos (como por exemplo, *N. lasiurus* que apresenta o mesmo cariótipo que *N. temchuki*, Vitullo et al. 1986). “*Akodon*” *uruchi*, entretanto, foi caracterizado cariotipicamente por Reig et al. (1971), apresentando $2n=18$.

Dos quatro trabalhos discutidos anteriormente, observamos que Smith e Patton (1991) e Smith e Patton (1993) objetivavam entender, entre outros, as relações dentro do gênero *Akodon*; já Smith e Patton (1999) e D’Elia (2003) se propuseram, principalmente, a esclarecer as relações dentro da tribo Akodontini e as relações desta tribo com as demais tribos da subfamília Sigmodontinae, além, é claro, de estabelecer os limites da tribo Akodontini. Como os resultados desses trabalhos não permitiram estabelecer as relações dentro do gênero *Akodon*, geramos seqüências do gene citocromo *b* e do gene IRBP e as somamos as seqüências existentes no GenBank para estudar as relações filogenéticas dentro do gênero *Akodon* (Capítulo 2 desta Tese).

Pela análise do gene mitocondrial citocromo *b* completo (1.140 pares de bases) observamos que *Akodon serrensis* ($2n=46$) estaria fora do agrupamento do gênero *Akodon*, o qual, pela análise bayesiana, esteve associada a

Thaptomys nigrita, com baixos valores de *bootstrap*. Esta fraca associação com *Thaptomys* e a localização de *Akodon serrensis* ($2n=46$) fora do clado dos *Akodon* foi também observada por D'Elia (2003). Deste modo, evidentemente, a posição filogenética de “*A.*” *serrensis* apresenta-se como um novo caso de mudança de classificação dentro dos *Akodon*. Mais uma vez, estudos moleculares têm revelado que uma espécie tradicionalmente considerada como *Akodon* não apresentava até então, uma correta designação taxonômica. Tanto nosso trabalho quanto o de D'Elia (2003) não podem concluir sobre a correta relação de “*A.*” *serrensis* com *Akodon* e com *Thaptomys*. O estudo de novos genes, ou até mesmo do gene nuclear IRBP completo poderiam esclarecer sobre esta e outras questões.

Em nossas análises (Capítulo 2) observamos dois arranjos dentro do gênero *Akodon* que diferem dos dois agrupamentos apresentados por Smith e Patton (1993) em relação a posição de *A. toba*. Em nosso estudo esta espécie foi encontrada no grupo formado pelas espécies das terras baixas do sul, irmão do grupo das florestas dos Andes. Já Smith e Patton (1993) posicionam esta espécie no grupo das pradarias dos Andes e floresta Atlântica. Dentro de cada grupo apresentado em nossa análise foi encontrada uma subdivisão: em um grupo encontramos o subgrupo das terras baixas do sul como grupo irmão do subgrupo das florestas dos Andes e no outro grupo encontramos as espécies da Mata Atlântica como grupo irmão das espécies que habitam as pradarias dos Andes. Esta estruturação de *Akodon* em subgrupos não foi encontrada por Smith e Patton (1993).

Bianchi et al. (1971), utilizando ferramentas citogenéticas, propuseram que o gênero *Akodon* apresentaria três grupos. Um destes estaria formado pelas espécies do clado andino proposto por Smith e Patton (1991, 1993, 1999) e D'Elia (2003). Os outros dois grupos estariam formados por espécies que apresentam o par 1 telocêntrico ou o par 1 metacêntrico, exibindo este grande instabilidade levando a presença de polimorfismos. Na análise do Capítulo 2 construímos uma árvore baseada nesta hipótese na qual foram incluídos os dados citogenéticos publicados até a atualidade e testamos o grau de similaridade entre nossas árvores e a árvore citogenética. Esta análise

comparativa revelou diferenças significativas entre as árvores estabelecidas pelas duas metodologias (dados citogenéticos e moleculares).

Hershkovitz (1990) também estudou as relações dentro do gênero *Akodon*. O autor estabeleceu que dentro do gênero as espécies se ordenariam em dois grupos, as de crânio pequeno e as de crânio grande. Novamente, realizamos uma ampla pesquisa bibliográfica para obtermos informação do comprimento dos crânios de todas ou da maioria das espécies utilizadas em nossa análise molecular. Somente cinco espécies das que analisamos não foram consideradas, pois apresentaram menos de 5 indivíduos com o comprimento do crânio medido. A árvore obtida de acordo com a classificação do Hershkovitz (1990) foi comparada com as árvores que obtivemos com dados moleculares, tendo sido encontradas diferenças significativas. Isto se explica porque a maioria dos representantes das terras baixas tem comprimento do crânio grande e os representantes das terras altas tem comprimento de crânio pequeno, já nossas análises revelaram que tanto as espécies andinas como as de terras baixas não formam grupos monofiléticos. Parte desta constatação (a não monofilia dos Andes), tinha sido discutida por Smith e Patton (1993) e a segregação por habitat, florestas e pradarias, tinha sido comprovada (com alto valor de *bootstrap*) para o grupo das florestas andinas.

Devido ao fato do baixo valor de *bootstrap* obtido em nosso estudo, reavaliamos as relações entre os grupos e subgrupos, utilizando o gene mitocondrial citocromo *b* e o gene nuclear IRBP concatenados, obtendo-se, como resultado alto valor de *bootstrap* para os grupos e subgrupos (Capítulo 2, Figura 2). Nesta nova análise, observamos a associação de *Akodon spegazzinii* e *A. azarae*, esta última associada a diferentes espécies nas distintas análises. Os resultados deste estudo também demonstraram que algum dos agrupamentos encontrados correspondem aos já descritos na bibliografia, como por exemplo, o grupo *A. varius*, descrito por Myers (1989). Deste grupo incluímos quatro das sete espécies na análise do citocromo *b* e encontramos ser este um subgrupo monofilético, apresentando como grupo irmão *A. iniscatus*. Myers (1989) realizou uma comparação entre muitas espécies que não pertenciam ao grupo *A. varius*, entre elas *A. iniscatus*. Nesta

espécie o autor observou diferenças morfológicas, como menor tamanho das raízes molares, forte curvatura do crânio em vista lateral, menor distância interorbital, forâmen incisivo distintivamente comprido e paralelo e rostral muito curto e amplo. Na análise dos genes concatenados (Capítulo 2) incluímos uma espécie do grupo *A. varius* (*A. dolores*) e *A. iniscatus*, as quais se associaram tanto na análise de máxima verosimilhança como na análise bayesiana.

Do grupo *A. boliensis* definido por Myers et al. (1990) temos representantes de todas as espécies na análise do citocromo *b*. Este grupo não foi encontrado como monofilético, já que *A. juninensis* esteve associada a outro grupo de espécies. Este mesmo fato tinha sido observado por Smith e Patton (1993), mas na análise destes autores o grupo onde se encontrou *A. juninensis* não apareceu sustentado por alto valor de *bootstrap*. Em nosso estudo *A. juninensis* se apresentou como irmão do grupo formado por *A. kofordi* e *A. fumeus*, duas espécies que constituem o grupo *A. fumeus* definido por Myers e Patton (1989a). Assim, este grupo deveria ser ampliado para incluir *A. juninensis*.

Rieger et al. (1995b) propuseram que *A. cursor* e *A. montensis* formariam o grupo *A. cursor*. Em nosso estudo encontramos, tanto na análise do citocromo *b* como na dos genes concatenados, que estas espécies, juntamente com os taxa $2n=44$ da Mata Atlântica, formam um grupo monofilético. Estes resultados nos levam a expandir os limites do grupo *A. cursor* a fim de incluir os taxa com $2n=44$ da região leste. Um quarto grupo monofilético foi observado formado pelas espécies das regiões florestadas dos Andes, apresentando número fundamental autossômico (NFA) de 40, com $2n$ variando de 40 a 22. Assim nossa análise conclui que *Akodon* estaria formado por dois grupos maiores, contendo cada um deles dois grupos menores, onde três dos quatro subgrupos apresentam correspondência total ou parcial com os grupos descritos na literatura para *Akodon*.

Também estudamos as tendências evolutivas sob o ponto de vista cromossômico nos grupos e subgrupos. Os dois subgrupos andinos se caracterizam por apresentar NFA estável de 40, com o subgrupo das florestas mostrando uma variação no número diplóide de 40 a 22. Já o grupo das pradarias tem o mesmo $2n$ ($2n=40$). O subgrupo das terras baixas do sul

apresentou NFA de 44-42 e uma variação no NFA de 40 a 33. O subgrupo da Mata Atlântica apresentou um resultado que vai contra as conclusões citogenéticas. Rieger et al. (1995b) propuseram que *A. montensis* seria o ancestral de *A. cursor*, esta última espécie tendo se originado como isolados periféricos. Fagundes et al. (1997b) compararam o padrão de bandas G e os resultados de Zoo-Fish entre *A. cursor* e *A. montensis* e observaram uma completa homologia de bandas entre estas espécies. Geise et al. (1998) estabeleceram a homologia de bandas G entre *Necromys lasiurus*, *Akodon* sp. ($2n=46$, *A. lindberghi*, *A. montensis* e *A. cursor*). De acordo com este trabalho (Geise et al. 1998), iniciando com *Akodon* sp. ($2n=46$) a evolução teria seguido uma redução no número cromossômico até *A. cursor* por um mecanismo de fusão cromossômica. Nossos resultados mostram que *A. lindberghi* $2n=42$ é o ancestral do subgrupo da Mata Atlântica e do subgrupo de pradarias dos Andes e que dentro da Mata Atlântica *A. cursor* seria a espécie irmã do grupo formado por *A. montensis* e os taxa de $2n=44$. Acreditamos que mais estudos, tanto cromossômicos quanto moleculares seriam necessários para uma melhor compreensão da evolução deste grupo.

No trabalho da filogenia de *Akodon* datamos diferentes nodos, verificando que a diferenciação dos dois grandes grupos aconteceu num clima quente e a diferenciação entre os subgrupos e dentro destes ocorreu num clima frio. Os valores dos cálculos de divergência entre os grupos encontram-se dentro de um intervalo de tempo onde há evidências fósseis de uma transgressão marinha, subindo pelo Rio da Prata (Argentina e Uruguai) até Asunción (Paraguai) e até a condilhera dos Andes. Desta forma, levantamos a hipótese de que os taxa dos Andes deveriam ser mais relacionados com os taxa do sul da América do Sul do que com os taxa das terras baixas do leste do Brasil. Isto é observado em nossos resultados, onde o grupo andino que está relacionado com o grupo do leste do Brasil teria se originado posteriormente.

No Capítulo 3 desta Tese, estudamos *Deltamys kempii* quanto a aspectos moleculares e morfológicos, motivados por várias citações na literatura alertando sobre a falta de conhecimento acerca das populações brasileiras desta espécie (González e Massoia 1995, González e Pardiñas 2002, D'Elia 2003).

Morfológicamente, *D. kempi* foi estudado para a Argentina e o Uruguai por González e Massoia (1995). Estes autores revalidaram o gênero *Deltamys* com base em dados morfológicos e descreveram duas subespécies (*D. kempi kempi* para a Argentina e *D. k. langguthi* para o Uruguai) para este gênero monoespecífico. No mesmo estudo, os autores consideraram, por motivos de distribuição geográfica, que os exemplares do Rio Grande do Sul seriam *D. k. langguthi*.

Deltamys kempi foi estudado citogeneticamente por nosso grupo de pesquisa no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Sbalqueiro et al. (1984) determinaram que esta espécie porta um sistema complexo de determinação do sexo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. Estes autores encontraram a fusão cêntrica 1;13 em indivíduos de *D. kempi* procedentes de Taim/RS (Brasil). Castro et al. (1991) detectaram as fusões cêntricas 2;3 em indivíduos dessa espécie coletados em Tapes/RS (Brasil) e 9;15 em representantes de Tramandaí/RS (Brasil). Os estudos citogenéticos demonstraram que *Deltamys* apresentaria fusões cêntricas local específicas (Castro et al. 1991).

D'Elia (2003) publicou a seqüência completa do gene citocromo *b* de dois indivíduos de *D. kempi* (um procedente da Argentina e outro do Uruguai) e a seqüência parcial deste mesmo gene para outros dois indivíduos dessa espécie. Neste trabalho foi abordada a posição filogenética de *Deltamys* pela análise de máxima parcimônia. O autor constatou que *Deltamys* seria um clado irmão de *Akodon*, sugerindo sua condição de gênero pleno ou, ainda, propondo a expansão dos limites da tribo Akodontini a fim de incluir *Deltamys* dentro desta tribo (D'Elia 2003).

A posição filogenética de *Deltamys* voltou a ser avaliada por D'Elia et al. (2003) através da análise de parcimônia dos genes citocromo *b* e IRBP. Na análise destes genes concatenados, os autores encontraram a mesma posição filogenética para *Deltamys* obtida por D'Elia (2003) mas, desta vez, a conclusão do estudo foi mais contundente com a definição de que *Deltamys* deveria ser elevado ao nível de gênero (D'Elia et al. 2003). Neste mesmo ano, nosso grupo (Montes 2003, Dissertação de Mestrado) estudou a posição filogenética de *Deltamys* pela análise de Neighbor-joining, encontrando que o

grupo formado por *Thaptomys nigrita* e “*Akodon*” *serrensis* era o grupo irmão dos *Akodon* e que *Deltamys* era irmão do agrupamento de *Akodon* mais (*T. nigrita* e “*A.*” *serrensis*). Estes resultados confirmaram o *status* de *Deltamys* como gênero como proposto inicialmente por González e Massoia (1995).

Deltamys kemp é uma espécie raramente encontrada na natureza, já que desde sua primeira captura por R. Kemp no começo de século 20, até a atualidade, somente 117 exemplares desta espécie foram capturados, 42 destes no Brasil. Neste país a espécie foi encontrada na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, nas localidades de Taim, Tapes e Tramandaí.

Os dados de estudos prévios realizados com *Deltamys* motivaram a realização do Capítulo 3 desta Tese no qual investigamos a variação genética de indivíduos de *D. kemp* coletados no Brasil. Neste estudo procuramos compreender a variação genética apresentada pela espécie e verificar se esta variação apresenta algum padrão de estruturação. Em caso afirmativo, responder a seguinte questão: qual é o padrão desta variação, será que segue um padrão organizado por aspectos cromossômicos, por aspectos morfológicos ou, ainda, está organizado geograficamente? Além dos três locais onde *Deltamys* é conhecido no Brasil (Taim, Tapes e Tramandaí) adicionamos a nossa análise três novos locais (Torres, Osório e Charqueadas). A espécie foi estudada a partir de seqüências mitocondriais (citocromo *b* completo) e nucleares (RAG2), bem como em relação a dados morfológicos (20 medidas craniais). Foram acrescentadas a nossa análise as seqüências disponíveis no GenBank a fim de ampliar a informação molecular (citocromo *b*) para toda a distribuição de *Deltamys*. Nossa amostra consistiu de 28 indivíduos, sendo encontrados 8 haplótipos para o gene citocromo *b*, onde cada local apresentou seu próprio haplótipo, com exceção de Torres que revelou o mesmo haplótipo de Tramandaí. Para o gene RAG2 encontramos dois haplótipos no Brasil. As seqüências foram analisadas por Neighbor-joining, Máxima parcimônia e máxima verosimilhança, bem como por Network. A relação entre os haplótipos foi interpretada, primeiramente, para o gene citocromo *b* e, posteriormente, para os dois genes concatenados. As análises mostraram que *Deltamys* estaria formado por dois clados, um que agrupa os haplótipos dos indivíduos provenientes das localidades de Torres, Tramandaí, Osório e Tapes (grupo

Tramandaí) e o outro relacionando os haplótipos de Charqueadas, Taim, Uruguai e Argentina (grupo Taim). A separação dos dois foi confirmada pela análise de Amova estruturada.

No manuscrito do Capítulo 3 observamos ainda que quando colocamos as informações cariotípicas nas árvores filogenéticas o padrão das análises moleculares não apresenta relação com as informações cromossômicas.

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul é o resultado de quatro diferentes eventos geológicos (Villwock et al. 1986, Urien et al. 1981). O primeiro evento de transgressão/regressão marinha ocorreu há 400 mil anos atrás, resultando na formação de uma barreira. A segunda transgressão/regressão aconteceu há 325 mil anos atrás, reorganizando os depósitos formados pela primeira barreira, atualmente restando daquele primeiro evento unicamente um depósito desde Osório até Tapes, a qual isolou o lago Guaíba-Gravataí. Este segundo evento deixou bancos de areia e regiões inundadas responsáveis por ligar Porto Alegre/RS ao continente. O terceiro evento ocorreu há 120 mil anos atrás, deixando um depósito desde Torres/RS até o Chuí/RS, separando do mar a lagoa dos Patos. O quarto evento ocorreu há cinco mil anos atrás, formando a atual linha de costa que se estende de Torres/RS até a Argentina.

As amostras utilizadas no Capítulo 3 representaram os depósitos que formaram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul e a linha de costa atual do sul do Brasil, do Uruguai e de uma parte da Argentina. Tapes representou a primeira transgressão, Taim a segunda, Osório a terceira e Tramandaí/Torres a quarta. As amostras de Charqueadas são de terrenos mais antigos que as transgressões marinhas que formaram a Planície Costeira e as amostras da Argentina e do Uruguai provêm de terrenos costeiros modificados ou gerados durante o último evento de transgressão há cinco mil anos atrás

Quando avaliamos as distâncias genéticas dentro do grupo Taim observamos que a menor distância encontrada em relação aos grupos externos foi registrada nas amostras de Charqueadas, onde observamos, na maioria das vezes, a menor distância com os grupos externos (menor com *Thaptomys nigrita* e com *Akodon montensis*, segunda menor com *A. cursor*). Charqueadas é um local de formação anterior às demais localidades. Para o grupo

Tramandaí encontramos que o haplótipo dos indivíduos de Tapes é irmão do grupo formado pelos haplótipos dos indivíduos de Tramandaí, Osório e Torres. Tapes pertence à primeira transgressão marinha, já Tramandaí, Osório e Torres foram formados pela terceira e quarta transgressão

Ainda no capítulo 3 testamos, a partir de medidas craniométricas, a existência de dimorfismo sexual, o que não foi observado. Como as análises moleculares revelaram a presença de dois grupos testamos, utilizando a função discriminante, a existência de dois grupos morfológicos, revelando que 98% dos crânios foi classificado corretamente nos grupos.

Também testamos a hipótese de que a evolução das seqüências do gene citocromo *b* apresentam relógio molecular. Como esta hipótese não foi rejeitada, calibramos o relógio molecular com dados do registro fóssil para a separação de *Akodon/Necromys* e as transversões na terceira posição do códon entre *Mus* e *Rattus*, utilizando os modelos de Kimura 2 parâmetros e Tamura-Nei. Obtivemos que a separação de *Deltamys* dos Akodontini aconteceu há mais de 3 milhões de anos e sua diversificação na Planície Costeira há menos de 300 mil anos. Estes valores estão dentro do esperado tanto para a separação do gênero *Deltamys* quanto para a diversificação deste gênero na Planície Costeira, que começou sua formação há 400 mil anos

No capítulo 4 discutimos dois assuntos principais: 1) o padrão filogeográfico de espécies da tribo Akodontini de ampla, mas não exclusiva, distribuição no bioma de Mata Atlântica; 2) o limite de espécies de alguns taxa de Akodontini. Para este estudo utilizamos 801 pares de bases do gene citocromo *b*.

O bioma Mata Atlântica é considerado um dos mais diversos e também um dos mais ameaçados do mundo (Por et al. 2005). Dentro dos mamíferos, os roedores e marsupiais representam o grupo mais diversificado na Mata Atlântica (Fonseca et al. 1996) e são muito importantes para a saúde e equilíbrio deste bioma (Pizo 1997, Grelle e Garcia 1999, Vieira e Izar 1999, Pimentel e Tabarelli 2004).

Entre os roedores, algumas espécies da tribo Akodontini estão entre as mais abundantes nos trabalhos de coleta realizados na Mata Atlântica, como por exemplo *Akodon montensis* e *A. cursor* (Carvalho et al. 1999, Graipel et al.

2001, Feliciano et al. 2002, Graipel et al. 2003, Cademartori et al. 2004, Cherem et al. 2004, Paresque et al. 2004, Paglia et al. 2005, Graipel et al. 2006, Umetsu e Pardini 2007).

Akodon cursor é encontrado do norte da Mata Atlântica até o Estado do Paraná. *Oxymycterus dasytrichus* apresenta uma distribuição semelhante a de *A. cursor*, o que nos permitiu comparar os padrões filogeográficos entre as mesmas a fim de compreender se esses padrões são exclusivos das espécies ou característicos da região.

Akodon montensis se distribui desde Minas Gerais até o sul da Mata Atlântica (Rio Grande do Sul, Brasil; Misiones, Argentina; Caaguazue Sapucaia, Paraguai). Umetsu e Pardini (2007) consideram que *A. montensis* não é uma espécie exclusiva das florestas da Mata Atlântica. Entre as espécies da tribo Akodontini observamos que *Thaptomys nigrita* apresenta uma distribuição em parte superposta com a de *A. montensis*, principalmente, na região leste. Isto nos permitiu comparar o padrão filogeográfico de ambas espécies.

De *Akodon cursor* contamos com amostras de toda sua distribuição e de grande parte da imensa variabilidade de cariótipos apresentada por esta espécie. De *A. montensis* analisamos amostras provenientes desde Minas Gerais até o limite Sul, estando ausentes unicamente representantes da Argentina. De *Oxymycterus dasytrichus* avaliamos nossas seqüências e aquelas depositadas no Genbank. Para *Thalpomys nigrita*, no Genbank encontramos uma única seqüência, incluímos em nossa análise amostras dos Estados do Espírito Santo, Paraná e Rio Grande do Sul, aumentando de um para seis a quantidade de seqüências para esta espécie.

Os quatro agrupamentos estabelecidos pela análise das seqüências de *A. montensis* corresponderam a duas das quatro sub-regiões de Mata Atlântica descritas por Galindo-Leal e Gusmão Cámara (2005): 1) Floresta do Interior, reunindo num grupo monofilético amostras de Sapucaia e Caaguazu (Paraguai) + PN Iguaçu (Paraná) + Tenente Portela/RS e Nonoai/RS e, em outro grupo monofilético amostras de Tainhas/RS e Lagoa Santa/MG, 2) Serra do Mar, apresentando dois grupos monofiléticos: Florianópolis/SC + Torres/RS e São Paulo + Rio de Janeiro. Collar et al. (1997), estudando aves da sub-região

Serra do Mar, encontrou que esta poderia ser subdividida em dois domínios. A distância genética entre os agrupamentos foi maior do que o esperado para o nível de sub-espécie (Bradley e Baker 2001). Este resultado deve ser levado em consideração para o estabelecimento de estratégias de conservação na região onde estes indivíduos são encontrados.

Geise et al. (2001) também estudaram a estrutura filogeográfica de *A. montensis*, analisando 611 pares de bases do gene citocromo *b*, a partir de amostras provenientes de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraguai (aproximadamente 80% da amostra correspondeu aos Estados de Rio de Janeiro e São Paulo). Os autores encontraram associação da árvore de “minimum spanning” com a distribuição geográfica da espécie e comentaram a evidência de associação entre as amostras de Minas Gerais/Brasil e Paraguai. Em nossa análise, pelo teste de Mantel, estudamos a correlação entre a distância genética e a distância geográfica, e obtivemos um coeficiente de correlação não muito alto, mas significativo. Nosso resultado foi muito semelhante ao encontrado por Geise et al. (2001) na análise de “Mismatch”, em ambos estudos não foi verificado sinais de expansão populacional.

Para *Oxymycterus dasytrichus* analisamos nove localidades observando nas árvores filogenéticas quatro agrupamentos. A veracidade desses agrupamentos foi testada pela análise de AMOVA estruturada, não resultando ser significativa. Da mesma forma, não foram encontrados sinais de expansão significativa no teste da distribuição de “Mismatch”. Já o teste de Mantel revelou um coeficiente de correlação muito alto e significativo, muito provavelmente explicado pela presença de isolamento pela distância encontrado nesta espécie. A distância genética média entre os haplótipos de *O. dasytrichus* foi alta, até maior que a esperada para o nível de sub-espécie, conforme estabelecido por Bradley e Baker (2001). Isto exigiria de qualquer plano de manejo desta espécie a preservação de uma área tão grande quanto a distribuição de *O. dasytrichus*.

Para *A. cursor* estudamos 12 localidades distribuídas em sete Estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Paraíba, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo), para as quais as diferentes árvores filogenéticas construídas revelaram dois agrupamentos, confirmados pela análise da AMOVA

estruturada. Em um agrupamento encontramos os cariótipos $2n=14$ e $2n=15$ e, no outro espécies com $2n=16$, não sendo observada estruturação pela origem geográfica das amostras. O teste de Mantel apresentou um coeficiente de correlação baixo. Amostras de *A. cursor* provenientes de sete Estados brasileiros (Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo) também foram estudadas por Geise et al. (2001). Da mesma forma que verificado em nosso estudo, estes autores encontraram dois agrupamentos para *A. cursor*, um reunindo as amostras com cariótipo de $2n=14$ e $2n=15$ e outro agrupando as espécies de $2n=16$. O segundo agrupamento foi estabelecido pela utilização de apenas três amostras de *A. aff. cursor* $2n=16$, contrastando com as 12 amostras acrescentadas por nosso estudo. Vale salientar que em ambos estudos (Geise et. al 2001 e a presente Tese), a separação dentro de *A. cursor* ($2n=14$, 15 e 16) é explicada por diferenças no cariótipo das espécies testadas e não pela origem geográfica dos indivíduos. Geise et al. (2001) verificaram que amostras de *A. cursor* do mesmo Estado, mas de localidades diferentes, agruparam-se em diferentes clados de acordo com seus cariótipos. Nosso trabalho contou com amostras do Espírito Santo e Paraná com $2n=14$ e 15 e $2n=16$. Para o Espírito Santo os indivíduos de $2n=14$ e 15 foram coletados em diferentes localidades em comparação com os de $2n=16$, mas para o Paraná todas as nossas amostras de $2n=14$ e 15 e $2n=16$ foram coletadas no mesmo local e, mesmo assim, se organizaram em grupos diferentes. Esta seria a evidência máxima de que a separação em *A. cursor* é explicada pelo cariótipo ($2n=14$ e 15 *versus* $2n=16$). Tudo isto conduz à conclusão de que *A. cursor* $2n=14$ e 15 *versus* $2n=16$ mostram um padrão geográfico complexo.

Geise et al. (2005) estudaram craniométricamente amostras de *A. cursor* $2n=14$ e 15 e *A. aff. cursor* $2n=16$, encontrando diferenças significativas em sete das 20 medidas analisadas, comprovando a existência de algum tipo de diferenciação morfológica entre estes dois taxa.

A distância genética média encontrada entre os grupos de *A. cursor* foi menor do que o valor esperado para duas espécies diferentes de roedores. Por isso, os agrupamentos de *A. cursor* devem ser considerados subdivisões

dentro de uma mesma espécie, e não cada um dos grupos como uma espécie distinta.

A análise de *Thaptomys nigrita* revelou uma alta variabilidade haplotípica, uma vez que foram encontrados seis haplótipos nos seis indivíduos analisados. Para esta espécie as árvores evidenciaram dois agrupamentos: um formado por São Paulo e Espírito Santo e outro formado por Rio Grande do Sul e Paraná. Embora a distância genética entre os agrupamentos tenha sido maior que a distância genética dentro deles, a análise de AMOVA estruturada não confirmou a existência dos dois agrupamentos. Mesmo tendo *T. nigrita* uma distribuição superposta à de *A. montensis* os grupos formados por estas espécies foram muito diferentes.

D'Elia et al. (2003) evidenciaram que a seqüência de *Akodon serrensis*, por eles obtida, foi irmã a seqüência do gênero monotípico *Thaptomys nigrita*, fato que levou estes autores a duvidarem da correta identificação de sua amostra de *A. serrensis*. No Capítulo 4 analisamos cinco seqüências de $2n=46$ (*A. serrensis*) e *T. nigrita*. Entre as seqüências de *A. serrensis* utilizamos a mesma investigada por D'Elia et al. (2003). Em nosso estudo, recuperamos *A. serrensis* como monofilético, assim como *T. nigrita*, os quais formaram grupos irmãos, demonstrando a separação de $2n=46$ (*A. serrensis*) e *T. nigrita* ($2n=52$), assim como sua relação filogenética próxima.

São encontrados na Mata Atlântica três taxa com $2n=44$ (*A. reigi*, *A. mystax* e *A. paranaensis*), segundo nossos resultados existiriam apenas duas espécies. Pardiñas et al. (2005) também estudaram as taxa com $2n=44$, chegando a conclusão de que unicamente *A. mystax* seria diferente, morfologicamente, das outras taxa e propôs o reconhecimento de duas espécies no grupo de $2n=44$, até que fossem realizados novos estudos sobre *A. mystax*. Também concordamos que *A. mystax* deva ser reestudado, já que apresentou pouca diferenciação molecular com a seqüência de $2n=44$ de Concordia e Venâncio Aires.

As amostras obtidas para exemplares identificados como *Brucepattersonius iheringi* não formaram um clado monofilético com a amostra desta espécie depositada no GenBank. A amostra do Genbank pertence a um indivíduo coletado em São Paulo, muito distante da localidade tipo de *B.*

iheringi, Os exemplares desta espécie utilizados em nosso estudo foram coletados a 103 km da localidade tipo de *B. iheringi*, o que nos leva a acreditar que as seqüências geradas em nosso trabalho são realmente desta espécie. Sendo assim, o nosso estudo representaria o primeiro registro molecular de *B. iheringi*.

O cálculo do tempo de divergência estimou que *Brucepatersonius* (*B. iheringi* e *B. soricinus*) teria divergido no Mioceno superior. *Oxymycterus dasytrichus* teria divergido na transição do Mioceno-Plioceno, *Thaptomys nigrita* na transição entre o Plioceno superior e inferior. *Akodon* 2n=46 (*Akodon serrensis*) teria divergido num intervalo de clima temperado, *A. cursor* divergiu do clado num período de clima frio. A formação dos grupos tanto em *A. cursor*, como em *A. montensis*, parece ser muito recente, numa época fria de acordo com o registro dos glaciais.

RESUMO

Atualmente a tribo Akodontini estaria formada por 14 gêneros e 91 espécies (Musser e Carleton, 2005 com modificações). Ultimamente, sua organização e composição têm sofrido grandes mudanças, principalmente com o surgimento de novas tecnologias empregadas em seu estudo. Deste modo esta tribo ainda não apresenta uma classificação estável, uma vez que certas mudanças em sua classificação estão em vias de serem aceitas. Entre os gêneros que compõem a tribo Akodontini encontramos *Akodon* como o mais especioso constituído de 41 taxa, seguido por *Oxymycterus* com 16, *Necomys* com nove e *Bucepattersonius* composto por oito espécies. Também ocorrem nesta tribo vários gêneros monoespecíficos e de distribuição restrita, como é o caso de *Blarinomys*, *Deltamys*, *Geoxus*, *Lenoxus*, *Notiomys*, *Pearsonomys*, *Podoxymys* e *Thaptomys*.

Para os gêneros mais especiosos, unicamente *Oxymycterus* foi analisado em uma investigação com enfoque molecular a qual esclareceu as relações filogenéticas entre suas espécies. Em relação a *Akodon*, mesmo que vários trabalhos moleculares tenham sido realizados nos últimos anos, até a presente Tese as relações filogenéticas entre suas espécies ainda não estavam esclarecidas. Em nosso estudo, através da utilização de genes mitocondriais (citocromo *b*) e nucleares (IRBP), verificamos que as espécies deste gênero se organizam em dois grupos; cada grupo, por sua vez, dividindo-se em dois subgrupos. Esta organização não se ajusta às propostas filogenéticas baseadas em aspectos cromossômicos ou morfológicos. Datamos os eventos cladogenéticos dentro do gênero, verificando que a separação dos dois grupos maiores teria acontecido há 2.6 milhões de anos, numa época de clima temperado; a separação do subgrupo das florestas dos Andes e das terras baixas do sul teria acontecido há 2.3 milhões de anos; e a separação entre o subgrupo da Mata Atlântica e as pradarias dos Andes há 2 milhões de anos.

Devido ao fato de que as populações brasileiras de *Deltamys kempii* não tinham sido caracterizadas em nível molecular e morfológico; estudamos, utilizando seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* e nucleares de RAG2,

populações da Planície Costeira do Rio Grande do Sul com a finalidade de interpretar o padrão filogeográfico para esta espécie. Observamos a presença de dois grupos em *Deltamys*, os quais não estiveram correlacionados com os diferentes cariótipos, um grupo formado por Torres/RS, Tramandaí/RS, Osório/RS e Tapes/RS e outro formado por Charqueadas/RS, Taim/RS e San José/Uruguai e Buenos Aires/Argentina. Verificamos, a partir da análise pela função discriminante de 20 medidas craniométricas, a existência de diferenças entre os agrupamentos encontrados. Calculamos que *Deltamys* divergiu há mais de 3 milhões de anos e se diversificou na Planície Costeira do Rio Grande do Sul há menos de 300 mil anos.

A partir dos primeiros 801 pares de bases do gene mitocondrial citocromo *b*, estudamos o padrão filogeográfico de várias espécies da tribo Akodontini na Mata Atlântica, um dos ambientes mais rico em espécies da terra e um dos cinco mais ameaçados do planeta. *Akodon montensis* apresentou quatro agrupamentos neste bioma que corresponderam a duas sub-regiões da Mata Atlântica. *Oxymycterus dasytrichus* não revelou estruturação em grupos bem definida e *A. cursor* apresentou dois grupos monofiléticos, a princípio claramente não correlacionados com a geografia e sim com seu cariótipos. Um destes agrupamentos reuniu os cariótipos de $2n=14$ e 15 e o outro os cariótipos de $2n=16$. Para *Thaptomys nigrita* geramos cinco novas seqüências neste estudo, as quais, somadas a única existente no Genbank, gerou dois agrupamentos para esta espécie. Esta divisão em dois grupos, no entanto, não foi sustentada pela análise de Amova estruturada e a relação dos agrupamentos não coincidiram com os de *A. montensis*. Observamos que o taxon com $2n=46$ (*A. serrensis*) é monofilético e está muito relacionado com *T. nigrita*. As seqüências dos vários taxa e localidades com $2n=44$ (*A. mystax*, *A. paranaensis* e *A. reigi*) formaram um grupo monofilético mas que, de acordo com a alta distância genética média, poderia conter mais de uma espécie. Geramos e analisamos seqüências de *Brucepattersonius iheringi* de Torres/RS, um local próximo da localidade tipo da espécie. A utilização destas seqüências juntamente com a depositada no Genbank não resultou na formação de um clado monofilético, o que nos leva a propor que a seqüências do Genbank, gerada a partir de um indivíduo muito distante da localidade tipo, é de outra

espécie de *Brucepattersonius*. Deste modo as seqüências geradas em nosso estudo seriam a primeira caracterização a nível molecular de *B. iheringi*.

ABSTRACT

Nowadays, the Akodontini tribe is considered to be formed by 14 genera and 91 species (Musser and Carleton, 2005, with modifications). Akodontini organization and composition have recently undergone considerable changes that are mainly due to the development of new characterization technologies. Thus, the tribe's classification is still changing, as certain amends proposed are about to be accepted. Among the genera that compose Akodontini is *Akodon*, formed by 41 taxa and thus the most specious, followed by *Oxymycterus* with 16, *Necromys* with nine, and *Brucepattersonius*, which comprises eight species. In this tribe, there are several monospecific and of restricted distribution genera, such as *Blarinomys*, *Deltamys*, *Geoxus*, *Lenoxus*, *Notiomys*, *Pearsonomys*, *Podoxymys* and *Thaptomys*.

Considering the most specious genera, only *Oxymycterus* has been investigated in a molecular analysis approach, which clarified the phylogenetic relationships between its species. As regards *Akodon*, even though several molecular studies have been conducted in recent years, upon the conclusion of the present Thesis the phylogenetic relationships between its species had not been fully investigated. By the analyses of mitochondrial genes (*cyt b*) and nuclear (IRBP), the present study verified that the species in this genus are organized as two groups, each dividing into two subgroups. This organization does not fit the phylogenetic proposals based on chromosomal or morphological aspects. The present study dated the cladogenetic events within the genus, and verified that the separation between the two major groups may have occurred 2.6 million years ago, at a period of temperate climate. In turn, the separation between the Andean Forests and the Southern Lowlands subgroups may have taken place 2.3 million years ago, while the separation between the Atlantic Forest subgroup and the grassland subgroup is hypothesized at 2 million years ago.

Due to the fact that the Brazilian populations of *Deltamys kempfi* had never been characterized at molecular and morphologic levels, we set out to study the populations of the species inhabiting the Coastal Plain of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, using sequences of the cytochrome *b* mitochondrial

and RAG2 nuclear genes. The aim was to interpret the phylogeographic pattern of the species. We observed the presence of two groups in *Deltamys*, which were not correlated with the different karyotypes. One of these groups was formed by Torres/RS, Tramandaí/RS, Osório/RS and Tapes/RS, while the other was formed by Charqueadas/RS, Taim/RS and San José/Uruguay and Buenos Aires/Argentina. Based on the discriminating function analysis of 20 craniometric measurements, we verified the existence of differences in the groupings found. It was calculated that *Deltamys* diverged over 3 million years ago, and diversified in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul before the last 300 thousand years.

Based on the first 801 bp of the cytochrome *b* mitochondrial gene, we studied the phylogeographic pattern of several Akodontini species of the Atlantic Forest, one of the richest environments on Earth in terms of species, which is also one of the five most threatened in the planet. *Akodon montensis* presented four groupings in this biome, which corresponded to two sub-regions of the Atlantic Forest. *Oxymycterus dasytrichus* did not reveal a well-defined structure based on groups and *A. cursor* presented two monophyletic groups, at first clearly non-correlated with the geography, but which correlated with its karyotypes. One of these groupings assembled the karyotypes $2n=14$ and 15 , while the other assembled karyotypes $2n=16$. Five new *Thaptomys nigrita* sequences were generated in the present study, which, when added to the only sequence available in GenBank, generated two groupings for this species. Nevertheless, this division in two groups was not supported by the structured Amova analysis, and the relationship between groupings did not coincide with those in *A. montensis*. It was observed that the taxon with $2n=46$ (*A. serrensis*) is monophyletic and that it is very closely related to *T. nigrita*. The sequences of several taxa and locations with $2n=44$ (*A. mystax*, *A. paranaensis* and *A. reigi*) formed one monophyletic group that nevertheless, according to the long mean genetic distance obtained, may contain more than one species. We generated and analyzed sequences of *Brucepattersonius iheringi* from Torres/RS, a location close to the type location of the species. The use of these sequences together with those in GenBank did not result in a monophyletic clade, which leads us to propose that the sequence in GenBank, generated from one

individual that is very distant from the type location, belongs to another *Brucepattersonius* species. Therefore, it is possible that the sequences generated in the present study offer the first molecular characterization of *B. iheringi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen JA (1900) On mammals collected in southeastern Peru. Bull Amer Mus Nat Hist (12): 219-227.
- Ameghino F (1908) Las formaciones sedimentarias de la región litoral de Mar del Plata y Chapalmalán. Anales del Museo Nacional de Buenos Aires 3(10): 343-428.
- Anderson S (1985) Lista preliminar de mamíferos bolivianos. Cuadernos, Ac Nac Cienc Bolivia vol 65 Cienc Naturaleza, nº6 Mus Nac Hist Natur Zoología 3: 5-16.
- Anderson S and Olds N (1989) Notes on Bolivian mammals. 5. Taxonomy and distribution of *Bolomys* (Muridae, Rodentia). Am Mus Novit 2935: 1-22.
- Anthony HE (1929) Two new genera of rodents from South America. Am Mus Novit 388: 4-9.
- Apfelbaum LI and Blanco A (1984) Genetic similarity between species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). J Exp zool 229: 1-5.
- Apfelbaum LI and Blanco A (1985) Temporal variation of allele frequencies in populations of *Akodon dolores* (Rodentia, Cricetidae). Theor Appl Genet 70: 569-572.
- Apfelbaum LI and Reig OA (1989) Allozyme genetic distance and evolutionary relationships in species of Akodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). Biol J Linn Soc Lond 38: 257-280.
- Avila-Pires FD (1960) Roedores coleccionados na região da Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. Arquivos do Museu Nacional 50: 25-46.

Azara F de (1801) Essais sur l'histoire naturelle des quadrupedes de la Province du Paraguay, vol. 2. Paris: Charles Pougens.1: LXXX + 366 pp

Azara F de (1801) Apuntamientos para la Historia Natural de los quadriipedos del Paraguay y Rio de la Plata. Madrid: Imprenta de la Viuda de Ibarra. I: XIV + 328 pp.

Barquez RM, Williams DF, Mares MA and Genoways HH (1980) Karyology and morphometrics of three species of *Akodon* (Mammalia: Muridae) from northwestern Argentina. Ann Carn Nat His 49: 379-403.

Barros MA, Liascovich RC, Gonzalez L , Lizarraldi MS and Reig OA (1990) Banding pattern comparisons between *Akodon iniscatus* and *Akodon puer* (Rodentia, Cricetidae) Mamm Biol 55:115-127.

Bianchi NO and Merani MS (1984) Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae). X. Karyological distances at generic and intergeneric levels. J Mammal 65: 206-219.

Bianchi NO and Contreras JR (1967). The chromosomes of the field mouse *Akodon azarae* (Cricetidae, Rodentia) with special reference to sex chromosome anomalies. Cytogenetics 6: 306-313.

Bianchi NO, Contreras JR and Dulout FN (1969) Intraspecies autosomal polymorphism and chromosomal replication in *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). Can J Genet Cytol 11: 233-243.

Bianchi NO, Dulout FN and Contreras JR (1968) Sex chromosome replication in *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). Theoretical and Applied Genetics 38: 343-347.

Bianchi NO, Merani S and Lizarralde MS (1979) Cytogenetics of the South American akodont rodents (Cricetidae). VI. Polymorphism in *Akodon dolores* (Thomas). *Genetica* 50: 99-104.

Bianchi NO, Reig OA, Molina OJ and Dulout FN (1971) Cytogenetics of the South American akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report on Argentinian and Venezuelan forms. *Evolution* 21: 724-736.

Bianchi NO, Vidal Rioja L and Bianchi MSA (1973) Constitutive heterochromatin, G-bands and robertsonian rearrangements in the chromosomes of *Akodon molinae* (Rodentia, Cricetidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 15: 855-861.

Bianchi NO, Vidal Rioja L and Bianchi MSA (1976) Cytogenetics of the South American Akodont Rodent (Cricetidae) II. Interspecific homology of G-banding patterns. *Cytologia* 41:139-144.

Blaustein S, Liascovich RC, Apfelbaum LI, Daleffe L, Barquez RM and Reig OA (1992) Correlates of systematics differentiation between two closely related allopatric populations of the *Akodon boliviensis* group from NW Argentina (Rodentia: Cricetidae). *Z Säugetierkunde* 57: 1-13.

Bradley RD and Baker RJ (2001) A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *J Mammal* 82: 960-973.

Bravard A (1857) Observaciones geológicas sobre diferentes terrenos de transporte, en la Hoya del Plata. Biblioteca del Diario La Prensa, Imprenta y Linotipia de J. Bernheim, Buenos Aires 1: 1-80.

Cademartori CV, Fabián ME and Menegheti JÁ (2004) Variações na abundância de roedores (Rodentia, Sigmodontinae) em duas áreas de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ver Bras Zool* 6: 147-167.

- Capllonch P, Autino A, Díaz M, Barquez RM and Goytia M (1997) Los mamíferos del Parque Biológico Sierra de San Javier, Tucumán, Argentina: Observaciones sobre su sistemática y distribución. *Mastozoología Neotropical* 4(1): 49-71.
- Carleton MD (1973) A survey of gross stomach morphology in New World Cricetinae (Rodentia, Muroidea), with comments on functional interpretations. *Miscellaneous Publications of Zoology, University of Michigan* 157: 1-146.
- Castellanos A (1944) Paleontología estratigráfica de los sedimentos neógenos de la provincia de Córdoba. Instituto de Fisiografía e Geología, Publicaciones 16: 181-187.
- Castro E, Mattevi MS, Maluf S and Oliveira LFB (1991) Distinct centric fusions in different populations of *Deltamys kempfi* (Rodentia: Cricetidae) from South America. *Cytobios* 68:153-159.
- Carvalho FMV, Pinheiro PS, Fernandez FAZ and Nessimian JL (1999) Diet of small mammals in Atlantic Forest fragments in southeastern Brazil. *Rev Bras Zool* 1:91-101.
- Cerqueira R, Fernandez F and Quintela MFS (1990) Mamíferos da Restinga de Barra de Maricá, Rio de Janeiro. *Papéis Avulsos Zool* 37 (9): 141-157.
- Cestari AN and Imada J (1968) Os cromossomos do roedor *Akodon arviculoides cursor* Winge, 1888 (Cricetidae, Rodentia). *Cienc Cult (São Paulo)* 20: 758-762.
- Cherem JJ, Simões-Lopes PC, Althoff S and Graipel ME (2004) Lista dos mamíferos do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mast Neot* 11:151-184.

Christoff AU, Fagundes V, Sbalqueiro IJ, Mattevi MS and Yonenaga-Yassuda Y(2000) Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from southern Brazil. *J Mammal* 81: 838-851.

Collar NJ, Wege DC and Long AJ (1997) Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna. *Ornithological Monographs* 48: 237–260.

D'Elia G (2003) Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont groups and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19:307-323.

D'Elia G, González EM and Pardiñas UFJ (2003) Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mamm Biol* 68:351-364.

Demarest AG (1819) Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquee aux arts, à l'agriculture, à l'economie rurale et domestique, a la medicine, etc. Nouv. ed., presquentierement refondue et considerablement augmentee. Paris, chez Deterville, vol. 35

Diaz MM, Rubén MB, Braun J and Mares MA (1999) A new species of *Akodon* (Muridae: Sigmodontinae) from Northwestern Argentina. *J Mammal* 80(3): 786-798.

Echeve Llanos JM and Vilchez CA (1964) Anatomía Microscópica del estómago del ratón hocicudo (*Oxymycterus rutilans*). *Revista de la Sociedad Argentina de Biología* 40: 187-192.

Ellerman J (1941) The families and genera of living rodents. *Brit Mus Nat Hist* 11: 1-690.

- Engel SR, Hogan KM, Taylor JF and Davis SK (1998) Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents. *Mol Biol Evolution* 15: 35-49.
- Fagundes V and Yonenaga-Yassuda Y (1998) Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodon rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res* 6: 643-648.
- Fagundes V, Scalzi-Martin JM, Sims K, Hozier J and Yonenaga-Yassuda Y (1997b) Zoo-fish of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *Akodon montensis*. *Cytogenet Cell Genet* 78: 224-228.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AM and Yonenaga-Yassuda Y (1997a) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* ($2n=14,15$ and 16). *Chrom Res* 5: 228-232.
- Fagundes VA, Christoff AU and Yonenaga-Yassuda Y (1998) Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the Neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ($2n=16, 15$ and 14). *Hereditas* 129: 263-274.
- Fejfar O, Blasetti G, Calderoni M, Coltorti G, Ficarelli F, Masini F, Rook L and Torre D (1993). New finds of cricetids (Mammalia, Rodentia) from the Late Pleistocene-Holocene of Northern Ecuador. *Documents des Laboratoire Géologique de Lyon* 125: 151-167.
- Feliciano BR, Fernandez FAS, Freitas D and Figueiredo MSL (2002) Population dynamics of small rodents in a grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mamm Biol* 67: 304-314.

Fisher JB (1829) Synopsis Mammalium.

Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB and Patton JL (1996) Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occas Pap Conserv Biol 4:1-38.

Fronza M, Wainberg R and Cataleo G (1981) Multiple sex chromosomes in *Deltamys Kempfi* (Rodentia: Cricetidae): Preliminary steps towards the establishment of the XY₁Y₂/X₁X₁X₂X₂ system. Caryologia 34:457-466.

Galindo-Leal C and Gusmão Câmara I (2005) Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica Belo Horizonte. pp. 472.

Gardner A and Patton (1976) Laryotypic variation in oryzomini rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetine complex. Occasional paper of the Museum of Zoology, Louisiana state University 49: 1-48.

Geise L, Canavez FC and Seuánez HN (1998) Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. J Hered 89: 158-163.

Geise L, Cerqueira R and Seuánez HN (1996) Karyological characterization of a new population of *Akodon lindberghi* (Rodentia, Sigmodontinae) in Minas Gerais state (Brazil). Caryologia 49: 57-63.

Geise L, Moraes D and da Silva HS (2005) Morphometric differentiation and distributional notes of three species of *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae, Akodontini) in the Atlantic coastal area of Brazil. Arquivo do Museu Nacional do Rio de Janeiro 63: 63-74.

- Geise L., Smith MF and Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: Mitochondrial DNA sequence analysis. *J Mammal* 82: 92-101.
- Gentile de Fronza T (1970) Cariótipo de *Oxymycterus rutilans platensis* (Rodentia, Cricetidae). *Physis* 30:343.
- Gervais H and Ameghino F (1880) Les mammifères fossiles de l'Amérique du Sud. Librairie F. Savy. Paris, 225 pp.
- Gonçalves PR and Oliveira JA (2004) Morphological and genetic variation between two sympatric forms of *Oxymycterus* (Rodentia, Sigmodontinae): An evaluation of hypotheses of differentiation within the genus. *J Mammal* 85(1): 148-161.
- González EM and Massoia E (1995) Revalidación del género *Deltamys* Thomas, 1917, con la descripción de una nueva subespecie de Uruguay y sur de Brasil (Mammalia: Rodentia: Cricetidae). *Comunic Zool Mus Hist Nat Montevideo* 12:1-8.
- González EM, Langguth A and De Oliveir LF (1998) A new species of *Akodon* from Uruguay and Southern Brazil (Mammalia: Rodentia: Sigmodontinae). *Com Zool Mus Hist Nat Montevideo* 191: 1-8.
- González EM, Pardiñas UFJ (2002) *Deltamys kempfi*. *Mamm Spec* 711:1-4.
- Graipel ME, Cherem JJ and Ximenez A (2001) Mamíferos terrestres não voadores da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas*, 14: 109-140.
- Graipel ME, Cherem JJ, Miller PRM and Glock L (2003) Trapping small mammals in the forest understory: a comparison of three methods. *Mammalia* 67:255-260.

- Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho EL A and Glock L (2006) Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no parque municipal da Lagoa do Peri, ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastoz Neot* 13:31-49.
- Grelle CEV and Garcia QS (1999). Potential dispersal of *Cecropia hololeuca* by the common opossum (*Didelphis aurita*) in Atlantic forest, southeastern Brazil. *Revue D'Ecologie – La Terre et La Vie* 54: 327–332.
- Gyldenstolpe N (1932) A manual of Neotropical sigmodon rodents. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 11(3): 1-164.
- Hershkovitz P (1955) South American marsh rats, genus *Holochilus* with a summary of sigmodontine rodents. *Fieldiana: Zoology* 37:639-673.
- Hershkovitz P (1962) Evolution of neotropical cricetine rodents (Muridae), with special reference to the phyllotine group. *Fieldiana: Zoology* 46:1-524.
- Hershkovitz P (1966) Mice, land bridges and Latin American faunal interchange. In: RL Wenzel and VJ Tipton (eds) *Ectoparasites of Panama*. *Field Mus Nat Hist Chicago* pp 725-751.
- Hershkovitz P (1990) Mice of the *Akodon boliviensis* size class (sigmodontinae, Cricetidae), with the description of two new species from Brazil. *Fieldiana: Zool* 57: 1-35.
- Hershkovitz P (1998) Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with description of a new genus and six new species. *Bonn Zool Beitr* 47: 193-256.
- Hoekstra HE (2003) Unequal transmission of mitochondrial haplotypes in natural populations of field mice with XY females (Genus *Akodon*). *Am Nat* 161: 29-39.

- Hoekstra HE and Edwards S (2000) Multiple origins of XY female mice (genus *Akodon*): phylogenetic and chromosomal evidence. Proc R Soc Lond B 267: 1825-1831.
- Hoffmann F, Lessa E and Smith S (2002) Systematics of *Oxymycterus* with description of a new species from Uruguay. J Mammal 83(2): 408-420.
- Hoffstettr R (1963) La faune Pléistocene de Tarija (Bolivie): Nota préliminaire. Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris 35:194-203.
- Hooper ET and Musser GG (1964) The glans penis in Neotropical cricetines (family Muridae), with comments on classification of muroid rodents. Miscellaneous Publications Museum Zoology, University of Michigan 123: 1-57.
- Kashara S and Yonenaga-Yassuda Y (1982) Chromosomal variability in *Akodon* sp. (Rodentia, Cricetidae). Cytologia 47: 317-324.
- Kiblicky P, Merani S, Molina O and Bianchi NO (1976) Citogenética de los roedores sudamericanos akodontinos (Cricetidae). III. Polimorfismos cromosómicos intraespecíficos en *Akodon dolores* (Thomas). Mendeliana 1: 97-103.
- Liascovich RC and Reig OA (1989) Low chromosome number in *akodon cursor montensis* Thomas, and karyologic confirmation of *Akodon serrensis* Thomas in Mision, Argentina. J Mammal 70(2): 391-395.
- Lichtenstein H (1827) Darstellung neue oder wening bekannter Säugethiere.
- Lizarralde M, Bianchi NO and Merani MS (1982) Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae). VII. Origin of sex chromosome polymorphism in *Akodon azarae*. Cytologia 47: 183-193.

Lobato L, Cantos G, Araújo B, Bianchi NO and Merani S (1982) Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). X. *Akodon mollis*: a species with XY females and b chromosomes. *Genetica* 57: 199-205

Lund PW (1840a) Blik paa Brasiliens Dyreverden för Sidste Jordonvaeltning. Tredie Afhandling: Fortsaettelse af Pattedyrene. Lagoa Santa, d.12te.Septbr. 1838. Det Kongelige Danske Videnskavernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger, 8:217-272. Kjöbenhavn.

Lund PW (1840b) Tillaeg til de to Sidste Afhandlinger over Brasiliens Dyreverden för Sidste Jordonvaeltning. Lagoa Santa, den 4de. April 1839. Det Kongelige Danske Videnskavernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger, 8: 273-296. Kjöbenhavn.

Lund P (1841) Blik paa Brasiliens Dyreverden för Sidse Jordonvaeltning. Tredie Afhandning: Fortsaettelse af Pattedyrene. Lagoa Santa d. 12 te. Septbr. Kgl. d. Vid. Selskabs Skrifter, 4 Rackee, nath. og match. Afd. 8: 217-272.

Lund PW (1839) Blik paa Brasiliens Dyreverden för Sidste Jordonvaeltning. Anden Afhandling: Pattedyrene. Lagoa Santa, d. 16 d. Novbr. 1937 Det Kongelige Danske Videnskavernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger, 8: 61-144. Kjöbenhavn.

Lund PW (1842a) Fortsatte Bemaerkninger over Brasiliens UddödenDyrskabning. Lagoa Santa d. 27de. Marts 1840. Det Kongelige Danske Videnskavernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger, 9: 1-16. Kjöbenhavn.

Lund PW (1842b) Blik paa Brasiliens Dyreverden för Sidste Jordonvaeltning: Fortsattelse af Pattedyrene. Lagoa Santa, den 30te. Januar 1841. Det Kongelige Danske Videnskavernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger, 9: 137-208. Kjöbenhavn.

- Macedo R and Mares M (1987) Geographic variation in the South American Cricetine Rodent *Bolomys lasiurus* 68(3) 578-594.
- Maia V and Langguth A (1981) New karyotypes of Brazilian akodon rodents, with notes on taxonomy. Zeitschrift für Säugetierkunde 46: 241-249.
- Mares MA and Braun JK (2000) Three new species of *Brucepattersonius* (Rodentia: Sigmodontinae) from Misiones Province, Argentina. Occasional Papers Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History 9:1-13.
- Mares MA, Lizarralde D, Oliveira D and Bianchi N (1981) Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta Province, Argentina. Ann Carnegie Mus 50: 151-206.
- Marshall L and Sempere T(1991) The Eocene to Pleistocene vertebrates of Bolivia and their stratigraphic context: a review . In Suárez-Soruco R (ed) Fósiles y Facies de Bolivia. Revista Técnica de Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos, 12 (3-4), vol 1, pp 631-652.
- Massoia E (1979) Descripción de un género y especie nuevos: *Bibimys torresi* (Mammalia – Rodentia – Cricetidae – Sigmodontinae- Scapteromyini). Physis 38: 1-7.
- Massoia E (1982) Diagnosis previa de *Cabreramys temchuki*, nueva especie (Rodentia, Cricetidae). Historia Natural (Corriente) 2:91-92.
- Massoia E (1985) El estado sistemático de algunos muroideos estudiados por Ameghino en 1889 con la revalidación del género *Necromys* (Mammalia Rodentia, Myomorpha). Circular Informativa, Asociación Paleontológica Argentina 14:4.
- Massoia E and Fornes (1967) El estado sistemático, distribución geográfica y datos etoecológicos de algunos mamíferos neotropicales (Marsupialia y

Rodentia), com las descripción de *Cabreramys*, género novo (Cricetidae). Acta zoológica Lilloana 23: 407-430.

Massoia E and Pardiñas (1993). El estado sitemático de algunos muroideos estudiados por Ameghino en 1889. Revalidación del género *Necromys* (Mammalia Rodentia, Cricetidae). Ameghiniana 30: 407-408.

McKenna MC and Bell SK (1997) Classification of Mammals above the species level. Columbia University Press, New York.

Merani MS, Lizarralde M, Oliveira D and Bianchi NO (1978) Cytogenetics of South American Akodont redents (Cricetidae). IV. Interspecific crosses between *Akodon dolores* x *Akodon molinae*. J Exp Zool 206: 343-346.

Meserve PL (1981) Trophic relationships among small mammals in a Chilean semiarid thron scrub community. J Mammal 62: 304-314.

Meserve PL and Glanz (1978) Geographical ecology of small mammals in the northern Chilean arid border. Journal of Biogeography 5: 135-148.

Meyen FJF (1832) Nova Acta Ac. Leop XVI

Moojen J (1965) Novo gênero de Cricetidae do Brasil Central (Glires, Mammalia). Revista Brasileira de Biologia 25: 281-285.

Montes MA (2003) História da ocupação da Planície Costeira do RS pelo roedor *Deltamys kempi* - tentativa de reconstrução pela análise do mtDNA. Msc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Musser GG and Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE and Reeder DM (eds) Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp894-1531.

- Myers P (1989) A preliminary revision of the various groups of *Akodon* (*A. dayi*, *dolores*, *molinae*, *neocenus*, *simulator*, *toba*, and *varius*). In: J.F Eisenberg and K.H Redford (eds) *Advances in Neotropical Mammalogy*. Sandhill, Gainesville, pp 5-54.
- Myers P and Patton JL (1989a) *Akodon* of Peru and Bolivia – Revision of the *Fumeus* group (Rodentia: Sigmodontinae). *Occas Pap Mus Zool Univ Mich* 721: 1-35.
- Myers P and Patton JL (1989b) A new species of *Akodon* from the cloud forests of eastern Cochabamba department, Bolivia (Rodentia: Sigmodontinae). *Occas Pap Mus Zool Univ Mich* 720: 1-28.
- Myers P, Patton JL and Smith MF (1990) A review of the *Boliviensis* group of the *Akodon* (Muridae: Sigmodontinae), with Emphasis on Peru and Bolivia. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan* 177: 1-104.
- Osgood WH (1925) The long-clawed South American rodents of the genus *Notiomys*. *Field Mus Nat Hist Zool Ser* 12: 113-125.
- Paglia AP, Lopes MOG, Perini FA and Cunha HM (2005) Mammals of the Estação de Preservação e Desenvolvimento Ambiental de Peti (EPDA-Peti), São Gonçalo do Rio Abaixo, Minas Gerais, Brazil. *Lundiana* 6:89-96,
- Paresque R, Souza WP, Mendes SL and Fagundes V (2004) Composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 17:5-33
- Pardiñas UFJ, D'Elia G and Ortiz PE (2002) Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: estado actual de su conocimiento y prospectiva. *J Neotrop Mammal* 9:209-252.

- Pardiñas UFJ, D'Elia G, Cirignoli S and Suarez P (2005) A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from the northern campos grasslands of Argentina. *J Mammal* 86: 462-474.
- Patton JL , Myers P and Smith M (1989) Eletromorphic variation in selected South American Akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae), with comments on systematic implications. *Z. Säugetierkunde* 54: 347-359.
- Patton J, Myers P and Smith M (1990) Vicariant versus gradient models of diversification: the small mammal fauna of eastern Andean slopes of Peru. In: Peters G and Hutterer (eds) *Vertebrates in the tropics*. Museum Alexander Koenig, Bonn, Germany.
- Patton JL and Smith M (1992a) Evolution and sytematics of Akodontine Rodents (Muridae: Sigmodontinae) of Peru, with emphasis on the genus *Akodon*. *Memorias del Museo de Historia Natural, Lima* 21: 83-103.
- Patton JL and Smith M (1992b) MtDNA Phylogeny of Andean Mice: A test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46(1) 174-183.
- Paula Couto C (1950) Introdução, revisão, comentários e apêndice. In: XX XX (eds) *Memórias sôbre a paleontologia brasileira*. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, pp. XX
- Paula Couto C (1953) *Paleontologia Brasileira: Mamíferos*. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, 516 pp.
- Pearson OP (1982) Distribución de pequeños mamíferos en el altiplano y los desiertos del Peru. In: Salinas P (ed) *Zoológica Neotropical. Actas del VIII Congreso Lationoamericano de Zoología, Mérida, venezuela*, 263-284.
- Pearson OP (1983) Characteristics of mammalian faunas from forests in Patagonia, southern Argentina. *J Mammal* 64: 476-492.

- Pearson OP (1984) Taxonomy and natural history of some fossorial rodents in Patagonia, southern Argentina. *Journal of Zoology (London)* 202: 225-237.
- Pereira J, Teta P, Fracasi N, Johnson A and Moreyra P (2005) Sigmodontinos (Rodentia, Cricetidae) de la Reserva de Vida Silvestre Urugua-Í (Provincia de Misiones, Argentina), con la confirmación de la presencia de "*Akodon*" *serrensis* en la Argentina. *Mastozoología Neotropical* 12(1): 83-89.
- Pimentel DS and Tabarelli M (2004). Seed dispersal of the palm *Attalea oleifera* in a remnant of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 36: 74–84.
- Pizo MA (1997) Seed dispersal and predation in two populations of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 13: 559–578.
- Por FD, Imperatriz Fonseca VL and Neto FL (2005) *Biomass do Brasil: Uma história ilustrada* 207pp
- Reig AO and Kiblicky P (1968) Los cromosomas somáticos de *Akodon urichi* (Rodentia, Cricetidae). *Acta cie Venez* 19: 73.
- Reig AO, Olivo N and Kiblicky P (1971) The idiogram of the Venezuelan vole mouse, *Akodon urichi venezuelensis* Allen (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics* 10: 99-114.
- Reig OA (1977) A proposed unified nomenclature for the enamelled components of the molar teeth of cricetida (Rodentia) *J Zool Lond* 181: 227-241.
- Reig OA (1978) Roedores cricétidos del plioceno superior de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Publ Mus Mun Cien Nat Mar del Plata "Lorenzo Scaglia"* 2: 164-190.

- Reig OA (1980) A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. *J Zool* 192: 257-281.
- Reig OA (1981) Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur. *Publ Mus Mun Cien Nat Mar del Plata "Lorenzo Scaglia"*. pp 1-162.
- Reig OA (1984) Distribuição Geográfica e história evolutiva dos roedores moroideos sul americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev Bras Genet* 7:333-365.
- Reig OA (1986) Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. In: F Vuilleumier and M Monasterio (eds) *High altitude tropical biogeography*, Oxford University Press, New York, pp. 404-439.
- Reig OA (1987) An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Field Zool* 39:347-399.
- Reig OA (1994) New species of akodontine and scapteromyine rodents (Cricetidae) and new records of *Bolomys* (Akodontini) from the upper Pliocene and middle Pleistocene of Buenos Aires Province, Argentina. *Ameghiniana* 31: 99-113.
- Rieger TT, Langguth A and Weimer T (1995b) Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* species group (Rodentia- Cricetidae). *Biochemical Genetics* 33: 283-295.
- Rieger TT, Weimer TA, Langguth A and Oliveira LFB (1995a) Temporal variation of allele frequencies in four samples of *Akodon montensis* (rodentia: Cricetidae). *Rev Bras Genet* 18:385.

- Rovereto C (1914) Los estratos araucanos y sus fósiles. Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires 25: 1-247.
- Rusconi C (1931) Dos nuevas especies de roedores del piso ensenadense de Buenos Aires. Notas Preliminares del Museo de la Plata 1(3): 333-338.
- Rusconi C (1936) Distribución de los vertebrados fósiles del piso Ensenadense. Bio Acad Nac Cienc Córdoba 33: 183-215.
- Sbalqueiro IJ and Nascimento AP (1996) Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. Genet Mol Biol 19: 565-569.
- Sbalqueiro IJ, Mattevi MS and Oliveira LFB (1984) An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ mechanism of sex determination in a South American rodent, *Deltamys Kempi* (Rodentia: Cricetidae). Cytogenet Cell Genet 38:50-55.
- Semino C, Oliveira D, Bianchi NO and Lobato (1982) Cytogenetic of the South American akodon rodents (Cricetidae) IX. Chiasmatic sex bivalent in male meiosis of *Akodon mollis*. J Heredity 73: 149-150.
- Silva MJ, Patton JL and Yonenaga-Yassuda Y (2006) Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* ($2n=10$ and $2n=16$) from Brazil. Genet Mol Biol 29(3): 469-474.
- Silva MJJ and 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.
- Smith M and Patton J (1991) Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae, Sigmodontinae). Mol Biol Evol 8:149-177.

- Smith M and Patton J (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol J Linn Soc* 50:149-177.
- Smith MF and Patton JL (1999) Phylogenetics Relationships and the radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytocrome *b*. *J Mammal Evo* 6:89-128.
- Solari AJ, Espinosa MB, Vitullo AD and Marani MS (1989) Meiotic behavior of gonosomically variant females of *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet* 52: 57-61.
- Spotorno A, Carlos EZ and Arturo C (1990) Evolutionary systematics and heterochrony in *Abrothrix* species (Rodentia, Cricetidae). *Evolución Biológica* 4: 37-62.
- Steppan SJ, Adkins RM and Anderson J (2004) Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiation in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syt Biol* 53(4): 533-553.
- Svartman M and Almeida EJC (1993) Robertsonian Fusion and X chromosome polymorphism in *Zygodomys (=Bolomys) lasiurus* (Cricetidae, Rodentia) from Central Brazil. *Rev Bras Genet* 16: 225-235.
- Svartman M and Cardoso de Almeida J (1994) The Karyotype of *Akodon lindberghi* Hershkovitz, 1990 (Cricetidae, Rodentia). *Rev Bras Genet* 17: 225-227.
- Tate GHH (1932) The taxonomic history of the South and Central American Akodont rodent genera: *Thalpomys*, *Deltamys*, *Thaptomys*, *Hypsimys*, *Bolomys*, *Chroeomys*, *Abrothirx*, *Scotinomys*, *Akodon* (*Chalcomys* and *Akodon*), *Microxus*, *Podoxymys*, *Lenoxus*, *Oxymycterus*, *Notiomys*, and *Blarinomys*. *Amer Mus Novitates* 582: 1-32.

Thomas O (1896) On new small mammals from the Neotropical region. *Ann Mag Nat Hist* (6) 18: 310-316.

Thomas O (1900) New Peruvian species of *Conepatus*, *Phyllitis*, and *Akodon*. *Ann Mag Nat Hist* (7) 6: 466-469.

Thomas O (1901) *Ann Mag Nat Hist* (7):179-190.

Thomas O (1909) Notes on some South American mammals, with description of new species. *Ann Mag Nat Hist* (8) 4: 230-242.

Thomas O (1916) The grouping of the South American Muridae commonly referred to *Akodon*. *Ann Mag Nat Hist* (8) 18: 182-187.

Thomas O (1917) Preliminary diagnoses of new Mammals obtained by the Yale Geographic Society Peruvian Expedition. *Smithson Misc Coll* 68:1.

Thomas O (1918) On small mammals from Salta and Jujuy collected by Sr. Budin. *Ann Mag Nat Hist* (9) 1:186-193.

Thomas O (1927) On a further collection of mammals made by Sr E. Budin in Patagonia. *Ann Mag Nat Hist* (9) 19: 545-554.

Ubilla M (1996) Paleozología del Cuaternario continental de la cuenca norte del Uruguay: biogeografía, cronología y aspectos climáticos ambientales. Tese de Doutorado. Universidade de la República, Montevideo, 232 pp.

Umetsu F and Pardini R (2007) Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats-evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. *Landscape Ecol* 22: 517-530.

- Urien CM, Martins LR, Martins IR (1981) Evolução geológica do quaternário do litoral atlântico uruguaio e regiões vizinhas. Rev Notas Técnicas 3:7-43.
- Vieira EM and Izar P (1999). Interactions between aroids and arboreal mammals in the Brazilian Atlantic rainforest. Plant ecology 145: 75–82.
- Vieira A, Ortiz MI, Oinna-Senn E, Dalmaso G, Bella JL and Lisanti JÁ (2004) Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of Akodon (Rodentia, Sigmodontinae). Cytogenet Genome Res 107:99-102.
- Villwock JA, Tomazelli LJ, Loss EL, Dehnhardt EA, Fo NOH, Bachi FA (1986) Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. In: Rabassa J (ed), Quaternary of South America and Antarctic Peninsula. Balkema, Rotterdam, pp. 79-97.
- Vitullo AD, Merani MS, Reig OA, Kajon AE, Scaglia O, Espinosa MB and Pérez-Zapata A (1986) Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae): new karyotypes and chromosomal banding patterns of Argentinian and Uruguayan forms. J Mammal 67: 69-80.
- Vorontzov NN (1959) Sistema khmiakov (Cricetinae) mirovoi fauny i ikh filogeticheski sviazi. Biuletin Moskovskogo Obshts Ispitatelny Prirody, Otdel Biologia 44: 134-137.
- Vorontzov NN (1967) Evolutsia pishshevaritelnoi sistemy gryzunov (mysheobraznye). Isdatelstvo "Nauka", Novosibirsk 240pp.
- Voss R and Myers P (1991) *Pseudoryzomys simplex* (Rodentia: Muridae) and the significance of Lund's Collections from the Caves of Lagoa Santa, Brazil. Bulletin of the American Museum of Natural History 206: 414-432.
- Voss RS and Linzey AV (1981) Comparative gross morphology of male accessory glands among neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with

comments on systematic implications. *Mis Pub Mus Zool Univ Michigan* 159: 1-41.

Wied M (1826) *Beiträge z. Naturg. v. Brasilien* II

Winge H (1887) Jordfunde og nulevend Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien. *E Museo Lundii* 1(3): 1-200.

Yonenaga Y, Frota Pessoa O, Kasahara S and Almeida EJC (1976) Cytogenetic studies on brazilian rodents. *Cienc e Cult* 28: 202-211.

Yonenaga-Yassuda Y (1972) Chromosomal polymorphism in the rodent *Akodon arviculoides* ssp. ($2n=14$) resulting from two pericentric inversions. *Cytogenetics* 11: 488-489.

Yonenaga-Yassuda Y (1979) New karyotype and somatic and germ cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenet Cell Genet* 23: 241-249.

Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL and Kasahara S (1992) Variability of the nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon* aff. *arviculoides* (Cricetidae, Rodentia). *Caryologia* 45: 163-174.