



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NOS GÊNEROS *Mesomys* e
Lonchothrix (RODENTIA, ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)**

LEONY DIAS DE OLIVEIRA

BELÉM - PA

2022

LEONY DIAS DE OLIVEIRA

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NOS GÊNEROS *Mesomys* e
Lonchothrix (RODENTIA, ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi

Coorientador: Dr. Willam Oliveira da Silva

BELÉM - PA

2022

Dedico o presente trabalho para minha mãe Simone Dias, por todo apoio, amor e carinho. À minha grande companheira Lidiane Abadessa, por toda paciência, amor, carinho, conselhos e além de tudo, por me passar confiança na busca pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A UFPA e ao PPGNBC, por toda infraestrutura e dedicação que permitiram a realização deste trabalho e formação acadêmica.

A minha orientadora Dra. Cleusa Nagamachi por todos os ensinamentos, coordenação, discursões e contribuições que enriqueceram meus trabalhos acadêmicos e amadurecimento profissional e pessoal.

Aos Dr. Julio Pieczarka, pela chefia do laboratório de citogenética e coordenação centro de estudos avançados da biodiversidade.

A Dra. Renata Noronha, pela chefia e acolhimento no laboratório de citogenética e aos técnicos do laboratório de citogenética Jorge, Shirley e Conceição, por todo apoio.

Aos Drs. Marlyson Rodrigues e Willam Oliveira por todos os ensinamentos, contribuições, conselhos, dicas, discursões, convívio diário, companhia em campos, na bancada e na análise dos experimentos que contribuem nos meus trabalhos acadêmicos e crescimento na pesquisa.

Aos meus pais Simone Dias e Manoel Oliveira e ao meu irmão Leonam Dias por todo apoio familiar e contribuição para os meus estudos e conquistas.

A minha namorada, companheira e amiga Lidiane Abadessa, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por sempre contribuir com seus conselhos e por me passar confiança em acreditar na minha capacidade em conseguir meus objetivos.

A minha segunda família Fátima Machado, Leilane Abadessa, Lidiana Abadessa e Mariano Bentes pela companhia e apoio diário.

Aos meus colegas de laboratório Ananda, Andryo, Daniely, Flávia, Jéssica, Kevin, Luana, Luan, Luyann, Milla, Paula, Thayse, Vinícius, entre outros e em especial a equipe de roedor Gabriel, Marlyson, Vergiana, Willam, por todo auxílio e contribuição aos meus trabalhos e crescimento profissional.

Aos pesquisadores Drs. Rogério Vieira, Juliane Saldanha e Jeferson Carneiro por todo apoio e colaboração neste trabalho.

Aos seres celestiais que iluminam e guiam meus caminhos.

A todas as instituições e órgãos de apoio financeiro e estrutural: UFPA, CNPq, CAPES, Bionorte e Projeto Pró-Amazônia.

RESUMO

A família Echimyidae é considerada a mais diversificada taxonomicamente entre os roedores hystricognatos sul-americanos, compreendendo 25 gêneros e 93 espécies. A subfamília Eumysopinae é representada por nove gêneros, dentre os quais destacamos os gêneros arborícolas *Mesomys*, que possui quatro espécies reconhecidas, e *Lonchothrix* descrito como monotípico (*L. emiliae*), ambos distribuídos na Amazônia. Estudos morfológicos, moleculares e cromossômicos nos gêneros *Lonchothrix* e *Mesomys* tem auxiliado para um melhor entendimento no delineamento taxonômico, nas relações filogenéticas e padrões cariotípicos. Investigações moleculares recentes têm evidenciado uma diversidade ainda não descrita, sugerindo que essas taxa são ainda mais diversos do que se supõe. Além disso, os limites de distribuição geográfica na Amazônia para as espécies *M. hispidus* e *M. stimulax* tem sido questionado por alguns autores. Nesse sentido, o atual estudo buscou investigar a diversidade cariotípica e os limites geográficos dos gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix*, a partir de análise citogenética clássica e molecular e por meio de sequências dos genes mitocondriais Citocromo b (Cytb) e Citocromo Oxidase - Subunidade I (COI) de diversas localidades da Amazônia brasileira. As espécies *M. stimulax* e *Mesomys* sp n apresentaram $2n=60/NF=110$, enquanto *M. hispidus* apresentou $2n=60/NF=112$ e *Lonchothrix emiliae* apresentou $2n=66/NF=126$, ambos cariótipos inéditos para os gêneros. A análise filogenética confirmou *Mesomys* e *Lonchothrix* como gêneros irmãos e mostrou alta taxa intraespecífica em *M. hispidus* e *Mesomys* sp. n. proveniente de Itaituba, pode estar relacionada a uma nova linhagem no gênero *Mesomys*.

Palavras-Chave: Evolução cromossômica; Hibridização *in situ* fluorescente (FISH); Rato espinhoso; Filogenia; Rearranjos cromossômicos

ABSTRACT

The Echimyidae family is considered the most taxonomically diverse among South American hystricognathi rodents, comprising 25 genera and 93 species. The subfamily Eumysopinae is represented by nine genera, among which we highlight the arboreal genera *Mesomys*, which has four recognized species, and *Lonchothrix* described as monotypic (*L. emiliae*), both distributed in the Amazon. Morphological, molecular and chromosomal studies in the genera *Mesomys* and *Lonchothrix* have contributed to a better understanding of taxonomic design, phylogenetic relationships and karyotypic patterns. Recent molecular investigations have shown an as yet undescribed diversity, suggesting that these taxa are even more diverse than previously assumed. Furthermore, the limits of geographic distribution in the Amazon for the species *M. hispidus* and *M. stimulax* have been questioned by some authors. In this sense, the current study sought to investigate the karyotypic diversity and the geographic limits of the *Mesomys* and *Lonchothrix* genera, based on classical and molecular cytogenetic analysis and through sequences of the mitochondrial genes Cytochrome b (Cytb) and Cytochrome Oxidase - Subunit I (COI) from different locations in the Brazilian Amazon. The species *M. stimulax* and *Mesomys* sp. n. presented $2n=60/NF=110$, while *M. hispidus* presented $2n=60/NF=112$ and *Lonchothrix emiliae* presented $2n=66/NF=126$, both unpublished karyotypes for the genera. Phylogenetic analysis confirmed *Mesomys* and *Lonchothrix* as sister genera and showed a high intraspecific rate in *M. hispidus* and *Mesomys* sp. n. from Itaituba, may be related to a new lineage in the genus *Mesomys*.

Keywords: Chromosomal evolution; Fluorescent in situ hybridization (FISH); prickly mouse; Phylogeny; Chromosomal rearrangements

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de endemismo identificadas para vertebrados terrestres na Amazônia, de acordo com Silva <i>et al.</i> (2005). Países em que o bioma Amazônia ocorre: BO–Bolívia. BR–Brasil. CO–Colômbia. EC–Equador. GF–Guiana Francesa. GY–Guiana. PE–Peru. SR–Suriname. VE–Venezuela. Rios Amazônicos que delimitam as áreas de endemismo: Amazonas, Japurá-Caquetá, Madeira, Negro, Solimões, Tapajós, Tocantins e Xingu. Fonte: WILLAM OLIVEIRA DA SILVA (2018).	8
Figura 2 - Crânio de <i>Lonchothrix emiliae</i> mostrando as principais características dentárias dos roedores. Fonte: LEANDRO PEREZ GODOY (2015).	9
Figura 3 - Mapa de distribuição dos gêneros da família Echimyidae na região neotropical (FABRE <i>et al.</i> , 2017): West Indies (Índias Ocidentais), NA (Região dos Andes), SA (Região sul da América do Sul). AM (Bacia Amazônica e Escudo das Guianas), CC (Caatinga e Cerrado), ABF (Floresta Atlântica).	11
Figura 4 - Exemplar de <i>Mesomys stimulax</i> (Malcher <i>et al.</i> , 2021).	12
Figura 5 - Mapa da distribuição dos gêneros <i>Mesomys</i> e <i>Lonchothrix</i> . Banco de dados obtido de IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2008) e DIVA (HIJMANS <i>et al.</i> , 2004). Fonte: Presente trabalho.	13
Figura 6 - Exemplar de <i>Lonchothrix emiliae</i> . Fonte: LEONY DIAS DE OLIVEIRA (2019).	14
Figura 7 - Cariótipo de <i>M. hispidus</i> (2n=60/NF=116) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH telomérica; d) FISH rDNA 45S (DIAS DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019).	15
Figura 8 - Cariótipo de <i>M. stimulax</i> (2n=60/NF=110) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH telomérica; d) FISH rDNA 18S (MALCHER <i>et al.</i> , 2022).	16
Figura 9 – Cariótipo de <i>L. emiliae</i> (2n=64♀,65♂/NF=124) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH Telomérica (FITC-verde) setas indicam marcação intersticial e rDNA45S (CY3-vermelho) (DIAS DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019).	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	BIOMA AMAZÔNICO	7
1.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS DA ORDEM RODENTIA	8
1.3	FAMÍLIA ECHIMYIDAE E SUBFAMÍLIA EUMYSOPINAE	10
1.4	GÊNEROS <i>Mesomys</i> e <i>Lonchothrix</i> (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)	12
1.5	ESTUDOS CITOGENÉTICOS E FILOGENÉTICOS NOS GÊNEROS <i>Mesomys</i> e <i>Lonchothrix</i> (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)	14
1.6	A PROBLEMÁTICA DOS GÊNEROS <i>Mesomys</i> E <i>Lonchothrix</i> (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	GERAL	20
2.2	ESPECÍFICOS	20
3	REFERÊNCIAS	21
4	ARTIGO.....	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMA AMAZÔNICO

O bioma amazônico é reconhecido como a maior floresta tropical do mundo, tendo sua extensão territorial reconhecida em mais de seis milhões de quilômetros quadrados, abrangendo nove países da América do Sul. Apresenta elevada diversidade, com a ocorrência de 399 espécies de mamíferos, sendo que 231 são endêmicas do bioma (PAGLIA *et al.*, 2012).

A Amazônia, devido à sua elevada biodiversidade, não é uma única entidade biogeográfica, pois possui ecossistemas desiguais em características bióticas e abióticas. Nesse contexto, estudos biogeográficos reconheceram regiões com características próprias delimitadas pelos grandes rios amazônicos, sendo diferentes entre si, com ocorrência dentro do bioma, que possibilitam a construção da história evolutiva, da distribuição e da diversidade das comunidades de animais que habitam cada região (CODY, 1996; AB'SABER, 2003; SILVA, 2005).

Wallace (1852) analisou a distribuição dos primatas na Amazônia e foi pioneiro em testar a hipótese de barreira geográfica formada pelos grandes rios amazônicos. Seu estudo confirmou a separação entre os grupos de primatas, pelos rios amazônicos e separou as primeiras regiões em quatro (Guiana, Equador, Peru e Brasil) delimitadas pelos rios Amazonas-Solimões, rio Negro e rio Tapajós.

Posteriormente, análises biogeográficas realizadas em comunidades de aves, anfíbios, répteis e mamíferos, deram suporte para a hipótese das regiões isoladas pelos rios e conseqüentemente os rios atuando como barreira geográfica, limitando o fluxo gênico e promovendo a especiação (ÁVILA-PIRES *et al.*, 1995; SILVA e OREN, 1996; RON *et al.*, 2000; HALL e HARVEY, 2002).

Atualmente, as regiões foram nomeadas como áreas de endemismo e são descritas oito áreas para vertebrados terrestres, sendo elas: Napo, Imeri, Guiana, Inambari, Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém, com foco em estudos biogeográficos para melhor compreensão dos padrões de distribuição e especiação (NOVAES e OREN, 2002; SILVA, 2005) (Figura 1).

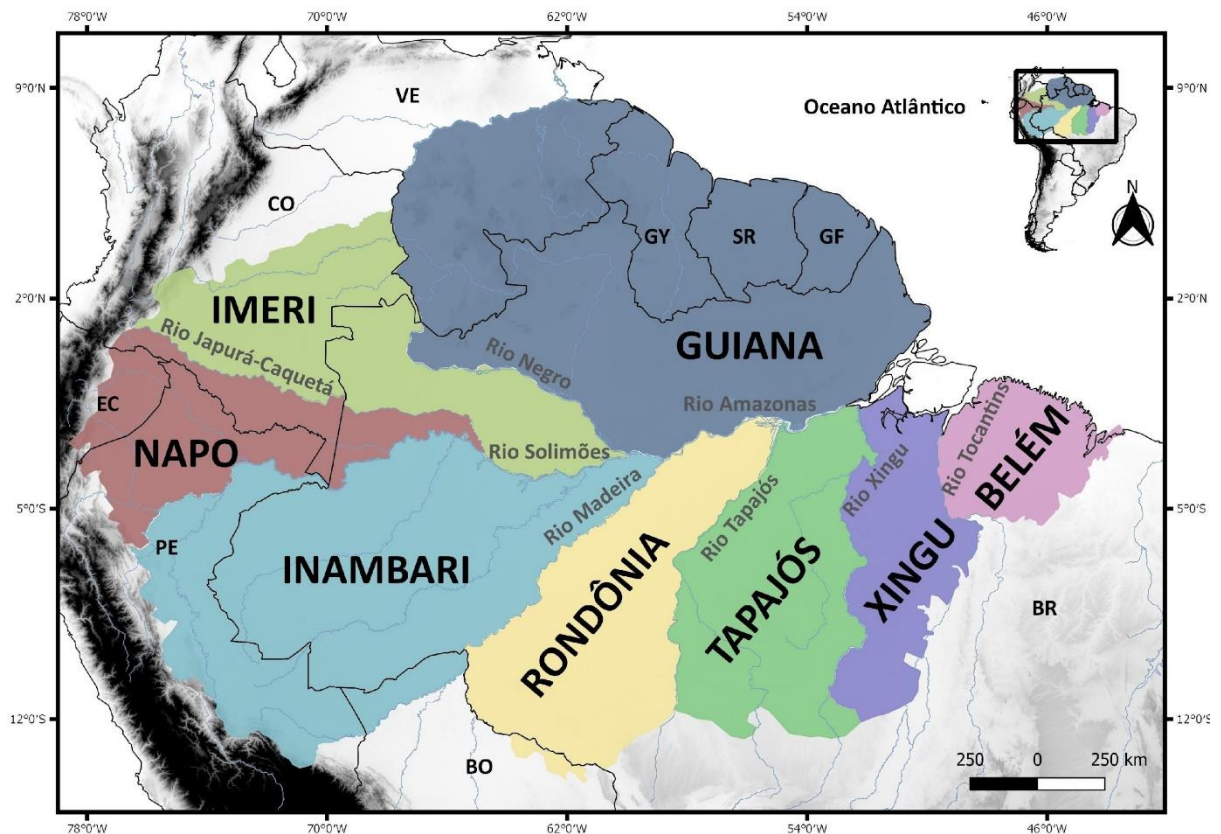


Figura 1 - Áreas de endemismo identificadas para vertebrados terrestres na Amazônia, de acordo com Silva *et al.* (2005). Países em que o bioma Amazônia ocorre: BO–Bolívia. BR–Brasil. CO–Colômbia. EC–Equador. GF–Guiana Francesa. GY–Guiana. PE–Peru. SR–Suriname. VE–Venezuela. Rios Amazônicos que delimitam as áreas de endemismo: Amazonas, Japurá-Caqueta, Madeira, Negro, Solimões, Tapajós, Tocantins e Xingu. Fonte: WILLAM OLIVEIRA DA SILVA (2018).

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA ORDEM RODENTIA

A ordem Rodentia é considerada a mais especiosa entre os mamíferos, constituída atualmente por 35 famílias, 529 gêneros e 2623 espécies, em que 75 gêneros e 240 espécies ocorrem no Brasil. Os roedores são classificados nas subordens Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha e Hystricomorpha,

Rodentia é a ordem mais numerosa e diversa de mamíferos, sendo descrita com 35 famílias, 529 gêneros e 2623 espécies, sendo que 75 gêneros e 240 espécies ocorrem no Brasil (WILSON e REEDER, 2005; BURGIN *et al.*, 2018). Os roedores estão classificados taxonomicamente em quatro subordens: Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha e Hystricomorpha (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015).

A característica mais marcante desta ordem é a presença de um par de incisivos na arcada dentária superior e inferior e poucos molares e pré-molares, que se separam dos incisivos por um espaço denominado diastema, os caninos são ausentes e os incisivos não têm raiz e crescem continuamente (Figura 2). O ato de roer promove um atrito nos incisivos, ocasionando o desgaste da dentina e conseqüente afiação dos dentes. Esse "afiamento" é bastante eficiente, sendo uma das características do enorme sucesso adaptativo dos roedores (WILSON e REEDER, 2005).

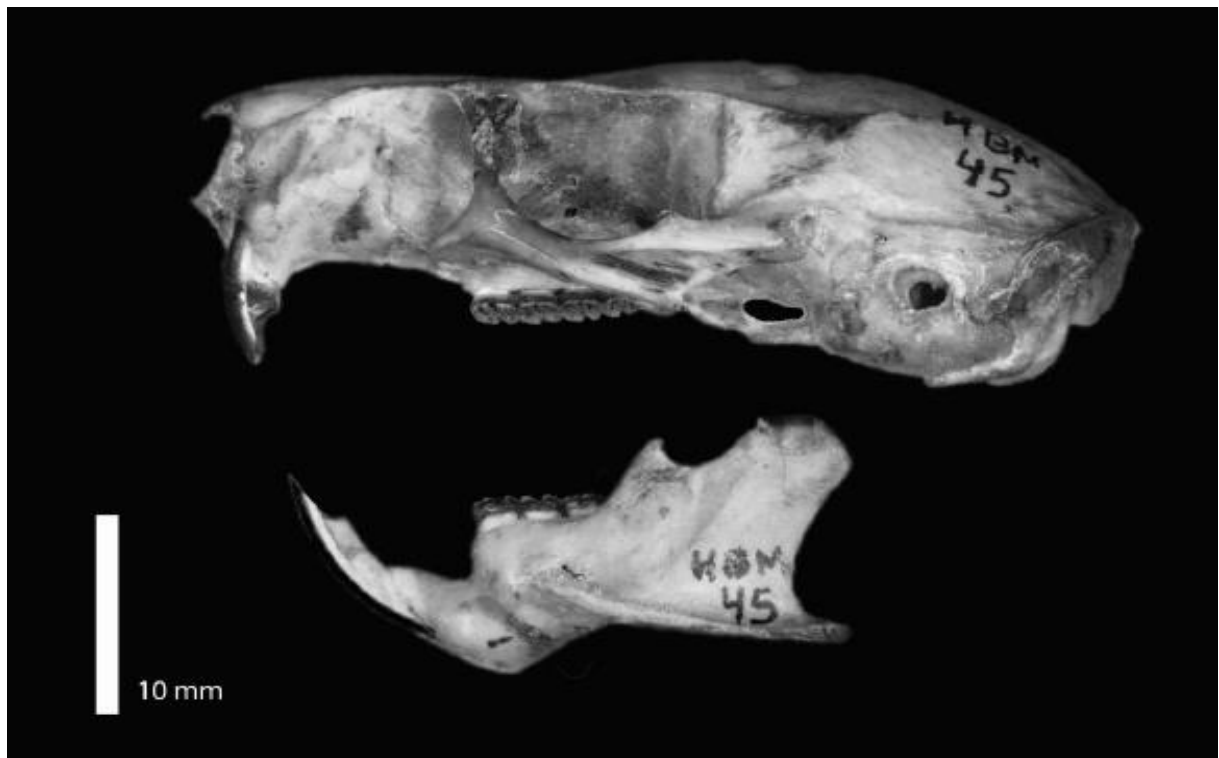


Figura 2 - Crânio de *Lonchothrix emiliae* mostrando as principais características dentárias dos roedores. Fonte: LEANDRO PEREZ GODOY (2015).

O tamanho corpóreo reduzido, ciclo reprodutivo, hábito alimentar predominantemente onívora e as adaptações ecomorfológicas que incluem as formas fossorial, terrestre, arborícola e semiaquática, apresentado pela maioria dos roedores, possibilitou a exploração de diversos habitats e nichos ecológicos, tendo ocorrência mundial com exceção da Antártica, Nova Zelândia e algumas ilhas oceânicas (EMMONS e FEER, 1997; SMITH e PATTON, 1999).

1.3 FAMÍLIA ECHIMYIDAE E SUBFAMÍLIA EUMYSOPINAE

A família Echimyidae é reconhecida como a mais diversa dentre o grupo de roedores histricognatos Sul-Americanos, sendo constituída por 25 gêneros e 93 espécies (PAGLIA *et al.*, 2012; EMMONS; LEITE; PATTON, 2015; BURGIN *et al.*, 2018). Os roedores desta família apresentam pelos modificados em forma de espinho (aristiformes), aporte corpóreo variando de pequeno a médio e adaptações ecomorfológicas escansorial, semi-fossorial, terrestre, arborícola e semiaquática (EMMONS e FEER, 1990, 1997; GALEWSKI *et al.*, 2005; WOODS e KILPATRICK, 2005).

O tamanho corpóreo reduzido, apresentado pelos equimídeos, contribuiu para a ampla distribuição no continente sul-americano, com ocorrência em todas as regiões neotropicais que vão desde áreas de florestas de várzea até áreas secas e abertas, tendo se adaptado antes da chegada dos roedores correspondentes das subordens Myomorpha (cricetídeos) e Sciuromorpha (esquilos) como competidores (GALEWSKI *et al.*, 2005; PATTERSON e VELAZCO, 2006; FABRE *et al.*, 2017).

Estudos biogeográficos realizados na região neotropical a definiu como a mais diversa, abrigando mais de 1600 espécies, incluindo os roedores (BURGIN *et al.*, 2018). Nesse sentido, a distribuição dos gêneros da família Echimyidae foi reconhecida em seis áreas dentro da região neotropical, com características que vão desde florestas úmidas a áreas abertas e secas (Figura 3) (MORRONE *et al.*, 2014; FABRE *et al.*, 2017).

Dados filogenéticos realizados na família Echimyidae buscaram elucidar as relações entre os gêneros, porém muitos estudos apontam altos índices de divergência nucleotídica intragenérica, levando questionamentos sobre a real composição e status taxonômicos de algumas espécies (PATTON *et al.*, 2000; ORLANDO *et al.*, 2003; UPHAM *et al.*, 2013; FABRE *et al.*, 2013; DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Atualmente, são reconhecidas três a quatro subfamílias, com duas sendo monofiléticas (Dactylomyinae e Myocastorinae), uma parafilética (Echimyinae) e uma parafilética ou polifilética (Eumysopinae) (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015).

Estudos recente realizada a partir de sequências de DNA mitocondrial confirmaram a proximidade filogenética entre equimídeos arborícolas, formando um grupo monofilético (FABRE *et al.*, 2013). Entretanto, a subfamília Eumysopinae (*Proechimys*, *Thrichomys*, *Trinomys*, *Carterodon*, *Clyomys*, *Euryzygomatomys*, *Mesomys*, *Lonchothrix* e *Phyllomys*), é questionada por alguns autores, pois já foram descritas politomias envolvendo as subfamílias

Dactylomyinae e Echimyinae (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015; FABRE *et al.*, 2013, 2017).

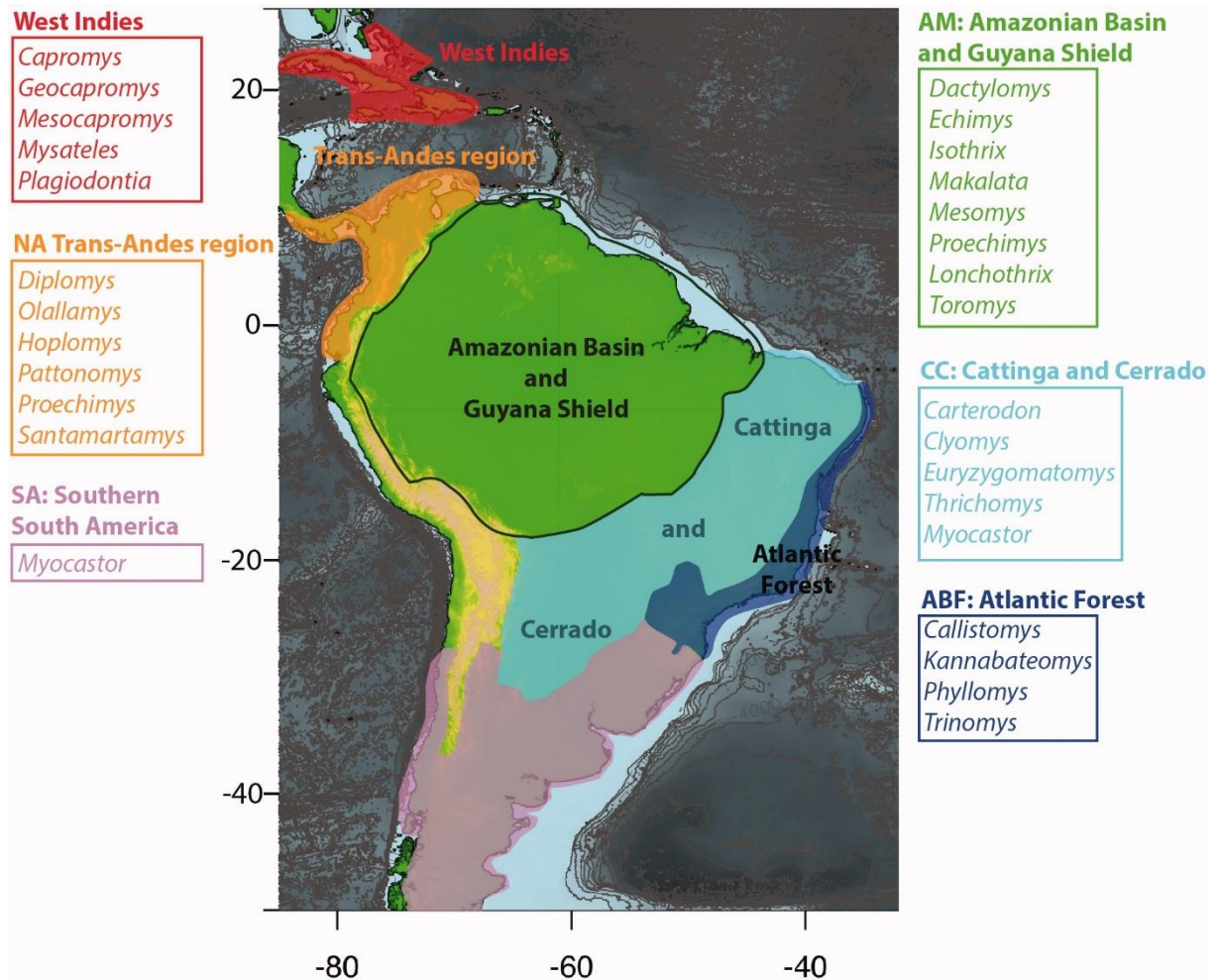


Figura 3 - Mapa de distribuição dos gêneros da família Echimyidae na região neotropical (FABRE *et al.*, 2017): West Indies (Índias Ocidentais), NA (Região dos Andes), SA (Região sul da América do Sul). AM (Bacia Amazônica e Escudo das Guianas), CC (Caatinga e Cerrado), ABF (Floresta Atlântica).

Os gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix* são frequentemente utilizados em análises filogenéticas, sendo constantemente apoiados como taxa-irmãos. Em contrapartida, poucos estudos descrevem a divergência intra e interespecífica envolvendo os taxa, o que leva a lacunas sobre o status taxonômico das espécies reconhecida para cada gênero (DA SILVA e PATTON, 1993; LARA *et al.*, 1996; PATTON *et al.*, 2000; LEITE e PATTON, 2002; BONVICINO *et al.*, 2003; ORLANDO *et al.*, 2003; GALEWSKI *et al.*, 2005; PATTERSON e VELAZCO, 2008; FABRE *et al.*, 2013, 2017; UPHAM e PATTERSON, 2015; DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

1.4 GÊNEROS *Mesomys* e *Lonchothrix* (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)

O gênero *Mesomys* é constituído pelas espécies *M. hispidus*, *M. stimulax*, *M. occultus* e *M. leniceps*. Apresentam modo de vida noturno e arborícola, cauda de tamanho semelhante ao corpo com tufo pincel na ponta podendo chegar a 20mm, apresentam pelos aristiformes com forma em espinho, dorso é castanho-avermelhado e o ventre varia de amarelo a alaranjado (Figura 4) (OLIVEIRA e BONVINCINO, 2006).



Figura 4 - Exemplar de *Mesomys stimulax* (Malcher *et al.*, 2021).

A distribuição do gênero com ocorrência na Amazônia brasileira (*M. hispidus*, *M. stimulax* e *M. occultus*), são reconhecidas distribuídas pela bacia amazônica, escudo das Guianas, até a parte oriental dos Andes *Mesomys hispidus* está amplamente distribuído, ocorrendo em simpatria com as outras três espécies: ao leste andino com *M. leniceps*, na porção central da Amazônia com *M. occultus* e no sul do rio Amazonas, com *M. stimulax* (Figura 5) (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015).

O gênero *Lonchothrix* (Echimyidae, Eumysopinae) é monotípico (*L. emiliae*), endêmico da Amazônia Brasileira, ocorre nos baixos Rios Madeira, Tapajós e Xingu, ao sul do Rio Amazonas, nos estados do Pará e Amazonas (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015) (Figura 5).

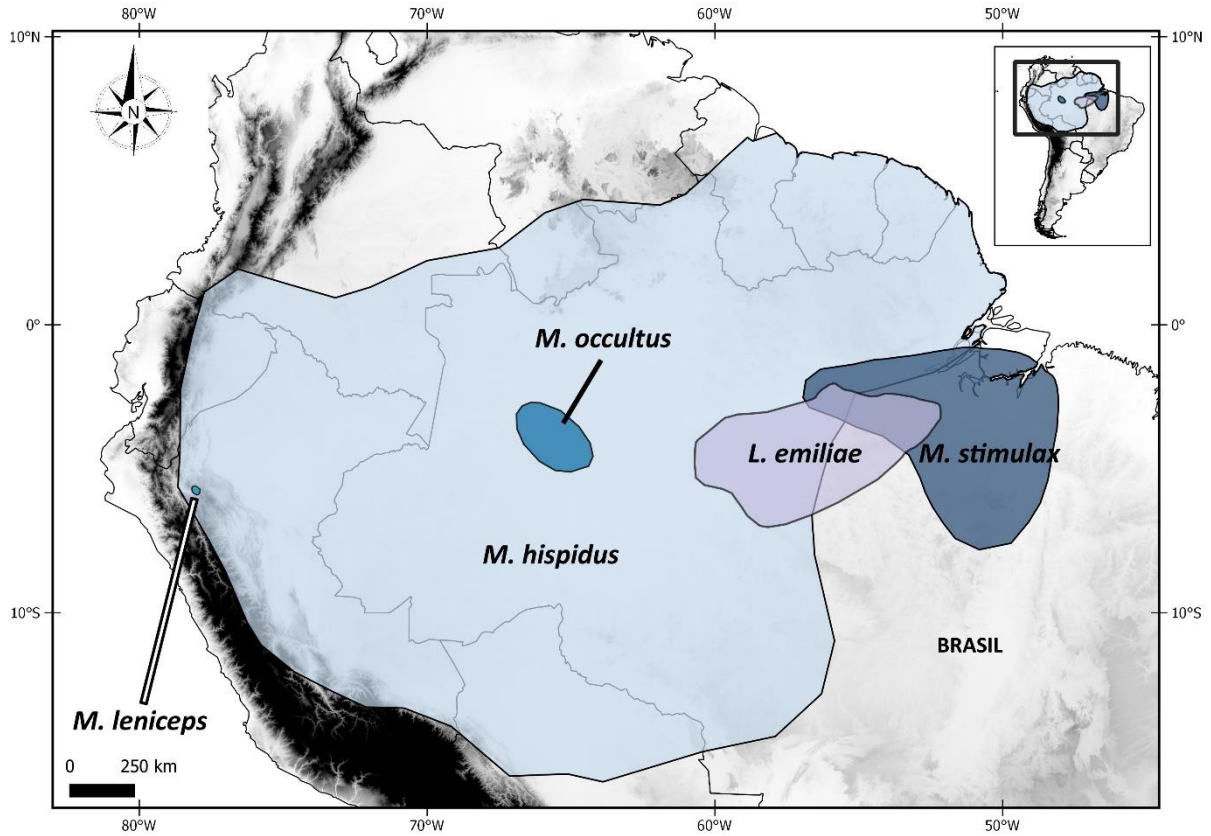


Figura 5 - Mapa da distribuição dos gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix*. Banco de dados obtido de IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2008) e DIVA (HIJMANS et al., 2004). Fonte: Presente trabalho.

Lonchothrix emiliae apresenta modo de vida noturno e arborícola, e se alimentam de sementes. Possui caracteres morfológicos externos semelhantes aos roedores do gênero *Mesomys*, como pelos dorsais modificados em formato de espinho e coloração dorsal e ventral variando do castanho ao amarelo, diferindo no pincel caudal com tamanho maior que chega a 70mm, porém, a autotomia é comum nesses grupos (Figura 6) (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015).



Figura 6 - Exemplar de *Lonchothrix emiliae*. Fonte: LEONY DIAS DE OLIVEIRA (2019).

1.5 ESTUDOS CITOGENÉTICOS E FILOGENÉTICOS NOS GÊNEROS *Mesomys* e *Lonchothrix* (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)

Estudos citogenéticos apontam, *M. hispidus* com número diploide ($2n$) igual a 60 e número fundamental (NF) igual a 116, *M. stimulax* ($2n=60/NF=110, 116$) e *M. occultus* ($2n=42/NF=54$) (PATTON *et al.*, 2000; DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; MALCHER *et al.*, 2021). Recentes análises por bandeamentos cromossômicos B e C e FISH com sondas telomérica e de rDNA, demonstraram uma diversidade desconhecida para o gênero que contribuíram para o delineamento taxonômico das espécies e demonstrar as diferenças cariotípicas que atuaram na diversificação do gênero (DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019, MALCHER *et al.*, 2021).

Dias de Oliveira *et al.* (2019) realizaram análises por citogenética clássica e molecular em amostras provenientes do município de Juruti no estado do Amazonas e descreveram os primeiros dados de bandeamentos G e C para *M. hispidus* ($2n=60/NF=116$) e FISH telomérica com sinais distais e de rDNA 45S com marcação em um par cromossômico (Figura 7).

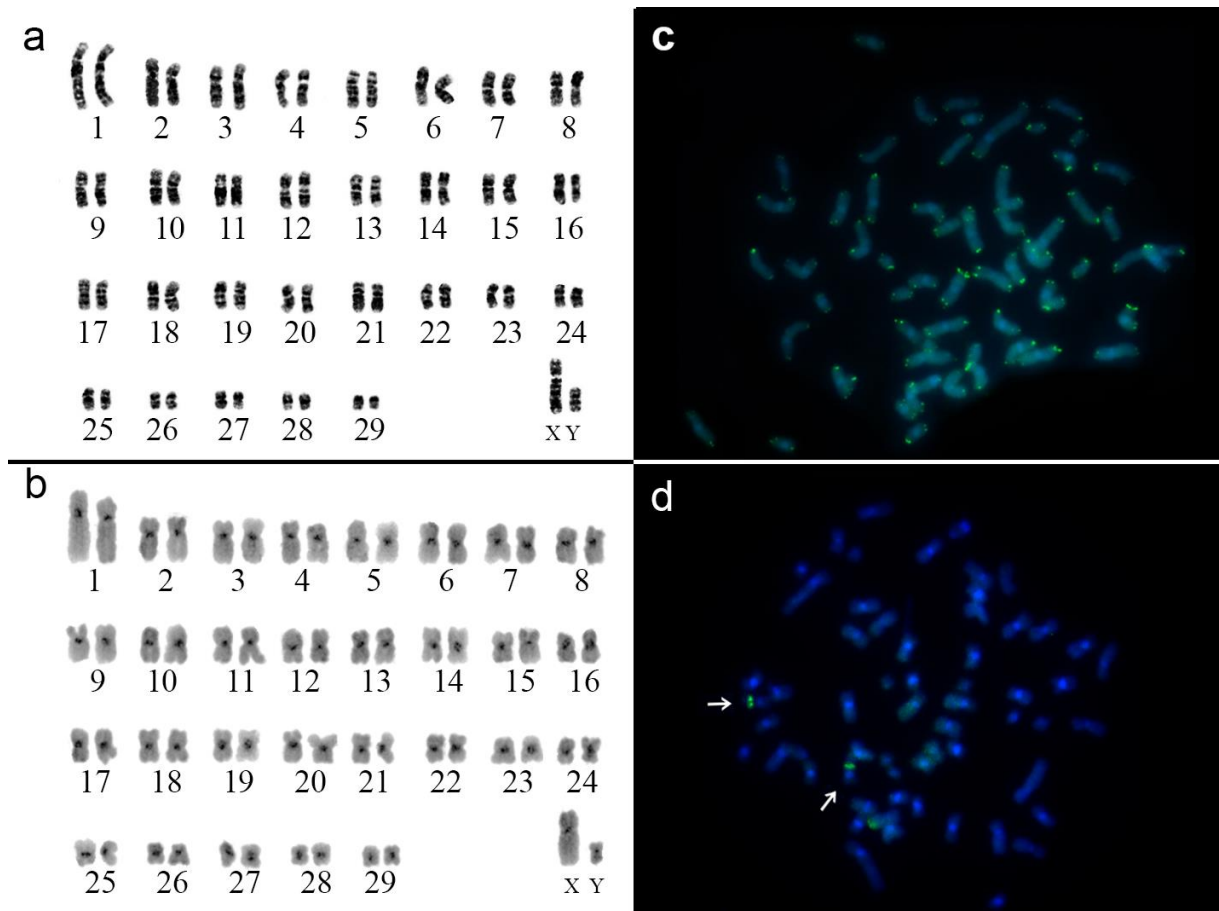


Figura 7 - Cariótipo de *M. hispidus* ($2n=60/NF=116$) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH telomérica; d) FISH rDNA 45S (DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Malcher *et al.* (2021), realizam análises por citogenética clássica e molecular em amostras provenientes do município de Marabá no estado do Pará e descreveram um novo cariótipo para *M. stimulax* com $2n=60/NF=110$, apresentando três pares cromossômicos com morfologia acrocêntrica, diferindo do descrito com NF igual a 116, o qual apresenta todos os cromossomos com dois braços, além disso, os dados de FISH telomérica apresentou marcação distal e de rDNA 18S apresentou sinal em um par cromossômico (Figura 8).

Os recentes estudos têm demonstrado o $2n$ conservado e uma grande variabilidade no NF das espécies do gênero *Mesomys*. As diferenças descritas podem ser decorrentes de rearranjos cromossômicos dos tipos fusão/fissão, translocações e inversões que já foram descritos em outros roedores, sendo os eventos mais comuns entre esses grupos (WHITE, 1973; MALCHER *et al.*, 2017; OLIVEIRA DA SILVA *et al.*, 2017).

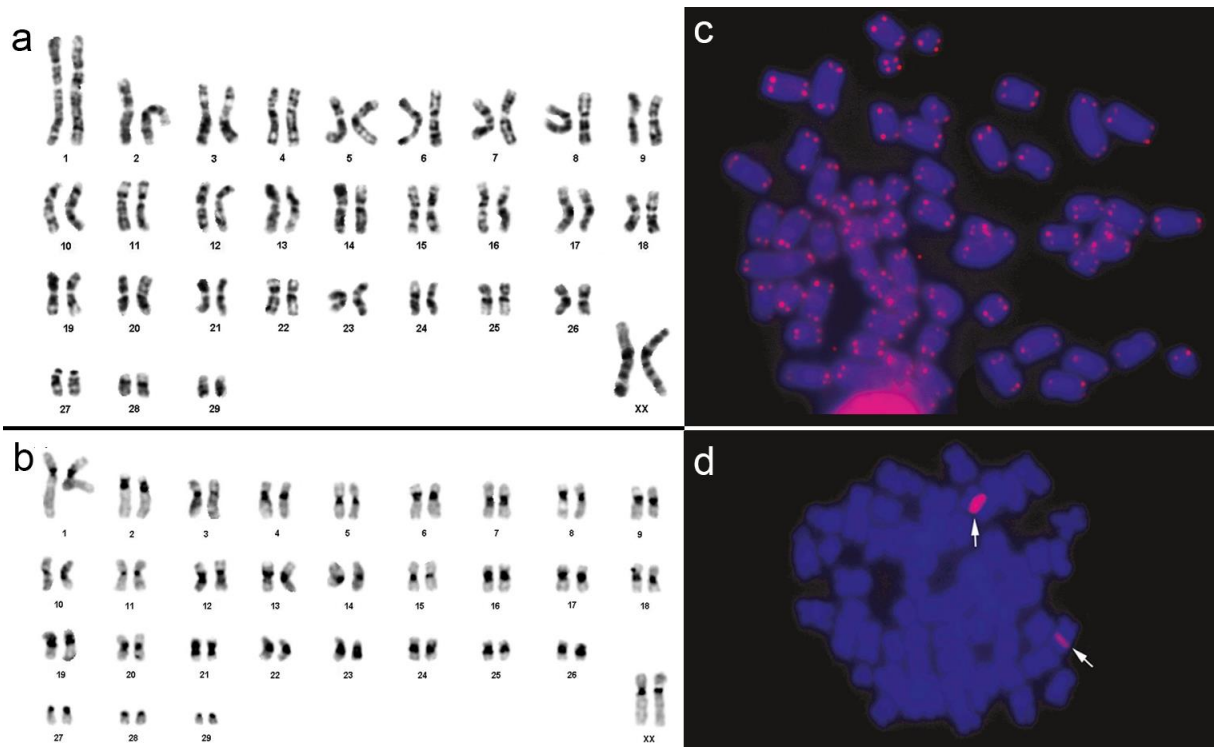


Figura 8 - Cariótipo de *M. stimulax* ($2n=60/NF=110$) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH telomérica; d) FISH rDNA 18S (MALCHER *et al.*, 2022).

Estudos recentes no gênero *Lonchothrix* (Echimyidae, Eumysopinae) corrigiram os dados citogenéticos que estavam descritos erroneamente com $2n=60/NF=116$ para amostras coletadas no Peru. Visto que não há informações de distribuição para essa localidade, este erro pode ter ocorrido devido as semelhanças morfológicas externas compartilhadas com o gênero *Mesomys*, principal causa de erros de identificação. Sendo assim, Dias de Oliveira *et al.* (2019), analisaram amostras diversas localidades da Amazônia brasileira por citogenética clássica e molecular e descreveram os primeiros dados cariotípicos para *L. emiliae* com $2n=64♀, 65♂/NF=124$ com sistema sexual múltiplo (XX/ XY_1Y_2), bandeamentos G e C, além de FISH com sondas de Telomérica que apresentaram sinais distais e intersticiais e de rDNA45S com marcação em um par cromossômico (Figura 9).

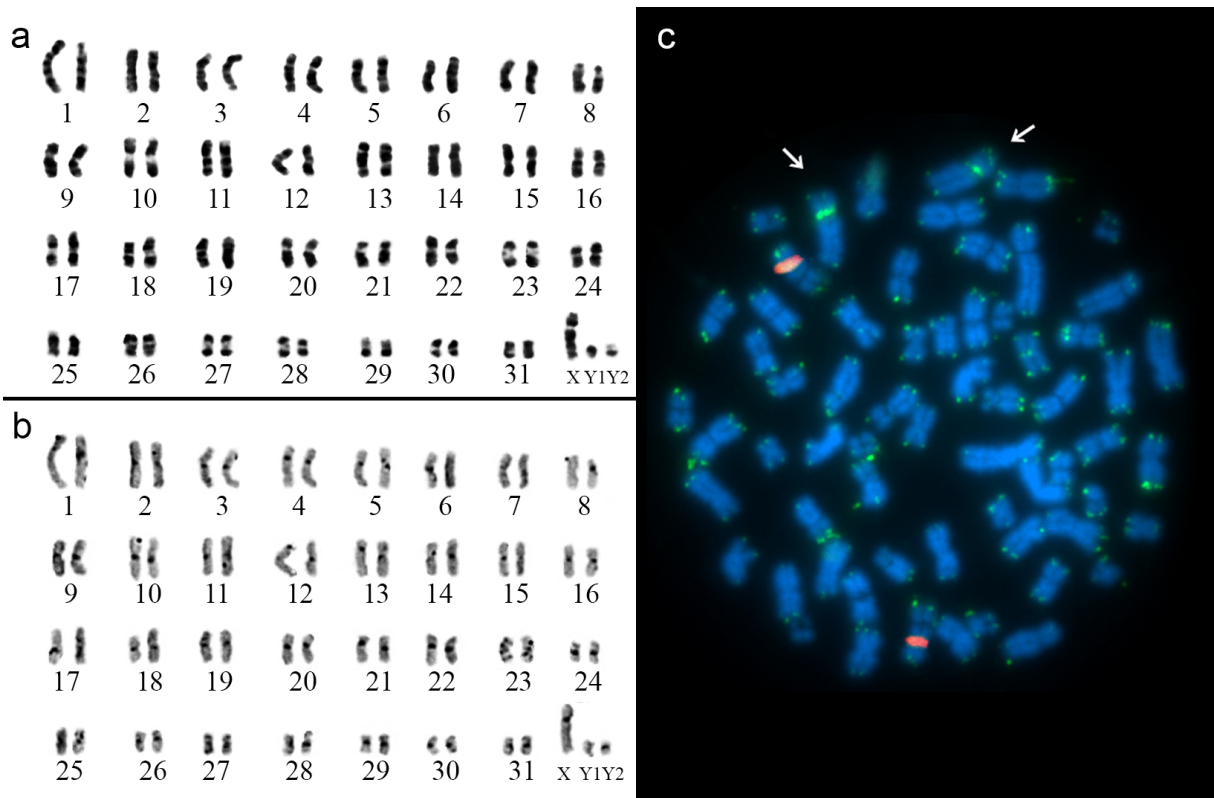


Figura 9 – Cariótipo de *L. emiliae* ($2n=64♀, 65♂/NF=124$) a) G-bandeado; b) C-bandeado; c) FISH Telomérica (FITC-verde) setas indicam marcação intersticial e rDNA45S (CY3-vermelho) (DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

1.6 A PROBLEMÁTICA DOS GÊNEROS *Mesomys* E *Lonchothrix* (ECHIMYIDAE, EUMYSOPINAE)

O bioma amazônico, reconhecido como o maior bioma neotropical, apresenta grande diversidade de habitats que refletem em uma elevada riqueza de espécies. Muitos estudos vêm sendo realizados para a melhor compreensão da história evolutiva e geográfica da região, os quais, foram determinantes para o reconhecimento das áreas de endemismo, caracterizadas como uma região de menor unidade geográfica com biota regional própria, que se estabeleceram ao longo do tempo (SILVA, 2005).

Atualmente são descritas oito áreas de endemismo para vertebrados terrestres, sendo elas: Napo, Imeri, Guiana, Inambari, Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém. Estas são delimitadas por grandes rios amazônicos, sendo foco de estudos sobre distribuição, diversidade e especiação dos organismos que utilizam essas regiões como seu habitat, incluindo os roedores equimídeos da Amazônia (SILVA, 2005).

Neste cenário, pesquisadores questionam os limites geográfico e a área de simpatria apresentado por *M. hispidus* e *M. stimulax*, cuja distribuição de *M. stimulax* é definida do centro a leste da Amazônia, margem esquerda do rio Tapajós em direção a margem direita do rio Tocantins, nas áreas de endemismo Tapajós e Xingu, enquanto *M. hispidus* é amplamente distribuído pelo centro da Amazonia com limite até a margem direita do rio Tapajós, ocorrendo em simpatria com *M. stimulax* no sul do rio Amazonas (ORLANDO *et al.*, 2003; EMMONS; LEITE; PATTON, 2015). Entretanto, a compreensão da diversificação e dos limites geográficos dos roedores equimídeos ainda está deficiente devido aos poucos estudos referentes às questões biogeográficas.

A Amazônia, apesar de ser o bioma mais diversificado das Américas e, provavelmente, do Mundo, porém poucas informações se têm sobre sua real biodiversidade, devido às dificuldades de acesso e coleta em muitas regiões (VOSS e EMMONS, 1996). Nesse sentido, o modo de vida noturno e arborícola apresentado por *Mesomys* e *Lonchothrix* levam a uma dificuldade de coleta, causando baixa representatividade de amostras e conseqüentemente poucos estudos foram realizados nesses gêneros.

Além disso, os gêneros irmãos apresentam similaridade morfológicas externas como medidas corporais, coloração e tipo de pelagem, com poucos caracteres diagnósticos diferentes como os tufos pines caudais que variam de 20mm em *Mesomys* e chega até 70mm em *Lonchothrix*, porém a autotomia é comum entre os gêneros (EMMONS; LEITE; PATTON, 2015). Nesse sentido, há poucos estudos sobre essas taxa, o que dificulta a compreensão sobre a real distribuição, diversidade e história evolutiva (ORLANDO *et al.*, 2003; PATTON *et al.*, 2000; PATTON; PARDIÑAS; D'ELÍA, 2015).

Para estudar a biodiversidade, é importante usar diversos marcadores visando uma melhor definição dos taxa. Uma abordagem relevante, além da análise morfológica, é o uso da análise genética (citogenética e sequências de genes) como ferramenta auxiliar no delineamento taxonômico das espécies (WHITE, 1973).

Os cromossomos são estruturas com considerável estabilidade, onde espécies diferentes tendem a ter cariótipos diferentes. Segundo Robbins & Baker (1981), Patton & Sherwood (1983) e King (1993), os rearranjos cromossômicos mais comuns em roedores são do tipo fissão, fusão e inversões pericêntricas, os quais exercem importante papel na evolução cariotípica, no processo de isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, especiação.

As diferenças cariotípicas são devidas a mudanças na estrutura dos cromossomos levando a uma reorganização do genoma. Os rearranjos, cujas ocorrências podem ser detectadas pela análise comparativa dos cariótipos, são eventos relativamente raros e com taxa mínima de

homoplasia, o que torna a análise citogenética extremamente importante para o estudo da sistemática e da biodiversidade (WHITE, 1973).

Em muitos grupos, análises detalhadas de variações cromossômicas têm se mostrado úteis na resolução de problemas taxonômicos, que poderiam ser difíceis de serem esclarecidos baseando-se exclusivamente em caracteres morfológicos, como já foi observado em *Proechimys* (RODRIGUES DA COSTA *et al.*, 2016), *Neacomys* (OLIVEIRA DA SILVA *et al.*, 2017; 2019), *Oecomys* (MALCHER *et al.*, 2017) e *Lonchothrix* (DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Desse modo, a citogenética moderna, por meio das técnicas de bandeamentos e FISH, é fundamental para auxiliar na identificação taxonômica, permitindo estudos comparativos entre grupos que apresentam similaridades morfológicas (ROMANENKO *et al.*, 2012).

Os marcadores moleculares como gene citocromo B (Cytb) e citocromo C oxidase I (COI) são altamente utilizados em estudos filogenéticos como ferramenta auxiliar a fim de contribuir na identificação dos taxa e divergência nucleotídica, que ajudam na compreensão da história evolutiva do grupo. Deste modo, o uso da citogenética e dos marcadores moleculares são imprescindíveis para distinguir espécies distintas que possuem caracteres morfológicos semelhantes (espécies crípticas) (BICKFORD *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Investigar a distribuição de *Mesomys hispidus* e *Mesomys stimulax* e a diversidade cariotípica de amostras dos gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix* (Rodentia, Echimyidae, Eumysopinae) da Amazônia brasileira, auxiliando no delineamento taxonômico, na evolução cariotípica, nas relações filogenéticas e nos limites geográficos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar comparativamente os cariótipos de *Mesomys* e *Lonchothrix*, inferindo sobre os possíveis eventos de rearranjos cromossômicos, responsáveis pela diversidade cariotípica.
- Utilizar os marcadores moleculares (Cytb) e (COI) como DNA barcoding para a correta identificação taxonômica, descrever as divergências genéticas intra e interespecíficas e demonstrar as relações filogenéticas.
- Investigar os limites de distribuição geográfica das espécies *Mesomys hispidus* e *Mesomys stimulax* na Amazônia.

3 REFERÊNCIAS

1. Cody, M. L., Robert H. M., and Jared M. D. Ecology and evolution of communities. Harvard University Press, 1975.
2. Ab'Saber, A. N. "Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira." *Estudos avançados*, 16, (2002): 7-30.
3. Paglia, A. P., et al. "Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals." *Occasional papers in conservation biology*, 6, (2012): 1-82.
4. Da Silva, J. M., Novaes, F. C., and Oren, D. C. "Differentiation of Xiphocolaptes (Dendrocolaptidae) across the river Xingu, Brazilian Amazonia: recognition of a new phylogenetic species and biogeographic implications." *BULLETIN-BRITISH ORNITHOLOGISTS CLUB*, 122.3, (2002): 185-193.
5. Silva, J. M. C., Rylands, A. B. and Fonseca, G. A. B. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 124-131, (2005).
6. Patton J. L., Pardiñas, U. F. J., D'Elía, G. *Mammals of South America: Rodents*. Rio de Janeiro: RIMA, 2015.
7. Fabre P. H., Galewski T., Tilak M. K., Douzery E. J. P. Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zool Scripta*. 2012; 42: 117-134.
8. Upham, N. S., Ojala-Barbour, R., Brito M. J., Velazco, P. M., and Patterson, B. D. Transitions between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, 13, (2013): 191.
9. Fabre, P. H., Upham, N. S., Emmons, L. H., Justy, F., Leite, Y. L., Loss, A. C., Orlando, L., Tilak, M. K., Patterson, B. D., and Douzery, E. J. Mitogenomic phylogeny, diversification, and biogeography of South American spiny rats. *Molecular Biology and*

- Evolution, 34, (2016), (3): 613-633. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw261>
10. Patton JL, Silva MNF, Malcolm JR. Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. (2000), vol. 97, no. 25.
 11. Orlando L., Mauffrey J. F., Cuisin J., Patton J. L., Hanni C. and Catzefflis F. Napoleon Bonaparte, and the fate of an Amazonian rat: new data on the taxonomy of *Mesomys hispidus* (Rodentia: Echimyidae). *Mol Phylog Evol*. (2003): 113-120.
 12. Dias de Oliveira, L., Oliveira da Silva, W., Rodrigues da Costa, M. J., Sampaio, I., Pieczarka, J. C., & Nagamachi, C. Y. First cytogenetic information for *Lonchothrix emiliae* and taxonomic implications for the genus taxa *Lonchothrix* + *Mesomys* (Rodentia, Echimyidae, Eumysopinae). *PLoS ONE*, (2019), 14, (4): e0215239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215239>
 13. Malcher, S. M. et al. New karyotype for *Mesomys stimulax* (Rodentia, Echimyidae) from the Brazilian Amazon: A case for species complex? **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 12, p. 7125-7131, 2021.
 14. Corn P. S. Straight-line drift fences and pitfall traps. In: HEYER, W. R., M. et al. (Eds). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 109-117; 1994.
 15. Ford C. E. and Hamerton J. L. A colchicine, hypotonic – citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Staining Technology*. 1956; 31: 247-251.
 16. Sumner A. T., Evans H. J. and Buckland R. A. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nat New Biol*. (1971), 232: 31–32.
 17. Sumner A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res*. (1972) 75: 304-306.
 18. Daniels L. M. and Delany M. E. Molecular and cytogenetic organization of the 5S

- ribosomal DNA in chicken (*Gallus gallus*). *Chromosome Res.* (2003), 11:305–317.
19. Levan A., Fredga K. and Sandberg A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* (1964), 52: 201-220.
 20. Thompson, J. F. and Patrice M. M. "The properties and applications of single-molecule DNA sequencing." *Genome biology*, 12.2 (2011): 1-10.
 21. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* (1999), 41: 95–98.
 22. Darriba D., Taboada G. L., Doallo R. and Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics.* (2011), 27: 1164–1165.
 23. Xia X D. A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol.* (2013), 30: 1720–1728.
 24. Stamatakis, A. "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies." *Bioinformatics* 30.9 (2014): 1312-1313.
 25. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID:24132122.
 26. Nanda I., Schrama D., Feichtinger W., Haaf T., Scharl M. and Schmid M. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma.* (2002), 111(4): 215-227.
 27. Faria, R. and Arcadi N. "Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence." *Trends in ecology e evolution* 25.11 (2010): 660-669.
 28. Rocchi, M., Archidiacono, N., Schempp, W., Capozzi, O., & Stanyon, R. Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, (2012), 108, 59–67. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.101>
 29. Bates, J. M. "Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a

- vicariance model for a basic diversification pattern." *Divers. biológica e Cult. da Amaz* (2001): 119-137.
30. Moraes, L. J. C. L., et al. "Biotic and landscape evolution in an Amazonian contact zone: Insights from the herpetofauna of the Tapajós River Basin, Brazil." *Neotropical diversification: Patterns and processes*. Springer, Cham, (2020): 683-712.
31. Oliveira Da Silva W., Pieczarka J. C., Ferguson-Smith M. A., O'brien P. C. M., Mendes-Oliveira A. C., Sampaio I., et al. Chromosomal diversity and molecular divergence among three undescribed species of *Neacomys* (Rodentia, Sigmodontinae) separated by Amazonian rivers. *PLoS ONE*. 12: 1–19 (2017).
32. George, T. K. et al. Levantamento de mamíferos do Parna Tapajós. **Brasil Florestal**, v. 63, p. 33-41, (1988).
33. Gascon, C. et al. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13672-13677, (2000).
34. Ribas, C. C., et al. "A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279.1729 (2012): 681-689.
35. Baker R. J. and Bradley R. D. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J Mammal*. (2006), 87: 643–662.
36. Bradley R. D. and Baker R. J. A test of the genetic species concept: cytochrome-B sequences and mammals. *J Mammal*. (2001), 82: 960–973.

4 ARTIGO

O presente estudo foi submetido para a revista PlosOne.

1 **Análise da diversidade genética indica uma nova espécie para *Mesomys* e novas formas**
2 **cariotípicas para os gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix* (Rodentia, Echimyidae,**
3 ***Eumysopinae*) na Amazônia brasileira.**

4
5 Leony Dias de Oliveira¹, Willam Oliveira da Silva¹, Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹,
6 Jeferson Costa Carneiro², Iracilda Sampaio², Juliane Saldanha da Silva³, Rogério Vieira Rossi³,
7 Ana Cristina Mendes-Oliveira⁴, Julio Cesar Pieczarka¹, Cleusa Yoshiko Nagamachi¹

8
9 ¹Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Laboratório de Citogenética, ICB,
10 Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

11 ²Genômica e Biologia de Sistemas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

12 ³Laboratório de Mastozoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso,
13 Cuiabá, Brazil.

14 ⁴Laboratório de Zoologia e Ecologia de Vertebrados, ICB, Universidade Federal do Pará,
15 Belém, Pará, Brazil.

16
17 E-mails: LDO: diasleony@hotmail.com, WOS: willam_oliveira@hotmail.com, MJRC:
18 marlysonjrc@gmail.com, JCC: jeferson.carneiro@yahoo.com, IC: ira@ufpa.br, JSS:
19 jusaldanhasilva@gmail.com, RVR: rogerrossi@gmail.com, M-O:
20 cris.mastozoologia@gmail.com, JCP: juliopieczarka@gmail.com, CYN:
21 cleusanagamachi@gmail.com

22
23 ***Correspondence author:** Cleusa Yoshiko Nagamachi

24 Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Laboratório de Citogenética, Instituto de
25 Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

26 PCT Guamá, Terreno 11

27 66075-750 Belém – Pará, Brazil

28 E-mail: cleusanagamachi@gmail.com; cleusanagamachi@pq.cnpq.br

29

30 **Short Title:** Cytogenetic and molecular analysis of *Mesomys* and *Lonchothrix*

31

32 **Abstract**

33 Morphological, molecular and chromosomal studies in the genera *Lonchothrix* and *Mesomys*
34 have contributed to a better understanding of taxonomic design, phylogenetic relationships and
35 karyotypic patterns. Recent molecular investigations have shown an yet undescribed diversity,
36 suggesting that these taxa are even more diverse than previously assumed. Furthermore, the
37 limits of geographic distribution in the Amazon region for the species *M. hispidus* and *M.*
38 *stimulax* have been questioned by some authors. In this sense, the current study sought to
39 understand the karyotypic evolution and the geographic limits of the *Mesomys* and *Lonchothrix*
40 genera, based on classical and molecular cytogenetic analysis and through sequences of the
41 mitochondrial genes Cytochrome b (Cytb) and Cytochrome Oxidase - Subunit I (COI) from
42 different locations in the Brazilian Amazon. The species *M. stimulax* and *Mesomys sp. n*
43 presented $2n=60/FN=110$, while *M. hispidus* presented $2n=60/FN=112$ and *Lonchothrix*
44 *emiliae* presented $2n=66/FN=126$, both unpublished karyotypes for the genera. Phylogenetic
45 analysis confirmed *Mesomys* and *Lonchothrix* as sister genera and showed a high intraspecific
46 rate in *M. hispidus* and *Mesomys sp. n* from Itaituba, maybe related to a new lineage in
47 *Mesomys*.

48

49 **Keywords:** Hystricognathi rodents, FISH, Cytb, COI, chromosomal rearrangements,
50 Geographical distribution.

51

52 **Introdução**

53 Considerada como a maior floresta tropical, a Amazônia é detentora de uma elevada
54 diversidade de ecossistemas que possibilitam a vivência de elevada abundância e riqueza de
55 espécies. Nesse sentido, investigações vêm sendo realizadas quanto a interação dos organismos
56 com os ecossistemas Amazônicos. Estes estudos foram responsáveis pelo reconhecimento de
57 regiões geográficas que possuem como característica principal uma história evolutiva única [1,
58 2, 3].

59 As regiões são descritas como áreas de endemismo ou áreas endêmicas, são delimitadas
60 pelos grandes rios amazônicos e caracterizadas como uma unidade que reflete a história
61 evolutiva das espécies ali encontradas [4, 5]. De acordo com Silva et al. [5], atualmente são
62 reconhecidas oito áreas de endemismo para vertebrados terrestres, sendo elas: Napo, Imeri,
63 Guiana, Inambari, Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém.

64 Dentre os grupos de vertebrados terrestres, os roedores da família Echimyidae são
65 considerados os mais diversos dentre os hystricognatos sul-americanos, compreendendo 95
66 espécies agrupadas em 21 gêneros. Esta família está amplamente distribuída na floresta
67 amazônica, ocorrendo nas oito áreas de endemismo reconhecidas [6].

68 Investigações com fragmentos de genes mitocondriais (Cytb, COI) e nucleares (apoB,
69 IRBP, RAG1, vWF) realizados na família Echimyidae, demonstram um número incerto de
70 subfamílias, que variam de três a quatro, dependendo do autor e análises realizadas:
71 Dactylomyinae, Echimyinae, Eumysopinae e Myocastorinae [6, 7, 8, 9, 10]. A subfamília
72 Eumysopinae é representada por nove gêneros, sendo quatro terrestres (*Hoplomys*, *Proechimys*,
73 *Thrichomys* e *Trinomys*), três semifossoriais (*Carterodon*, *Clyomys* e *Euryzygomatomys*) e dois
74 arborícolas (*Mesomys* e *Lonchothrix*) [6].

75 Os gêneros irmãos *Mesomys* e *Lonchothrix* compartilham características ecológicas
76 como modo de vida noturno e arborícola, o que acarreta dificuldade de coleta e logo há poucos
77 estudos por conta da baixa representatividade em coleções. Além disso, a similaridade na
78 morfologia externa leva a erros de identificação entre as espécies, sendo o tufo caudal um
79 caráter diagnóstico, podendo chegar a 20mm em *Mesomys* e 70mm em *Lonchothrix* [6], porém
80 a autotomia caudal é comum nesse grupo de roedores [6].

81 O gênero *Mesomys* (*M. hispidus*, *M. stimulax*, *M. occultus* e *M. leniceps*) encontra-se
82 amplamente distribuído pela Amazônia brasileira e regiões das guianas até a parte oriental dos
83 Andes, enquanto *Lonchothrix* (*L. emiliae*) apresenta uma distribuição mais restrita, ocorrendo
84 no baixo rio Madeira, Tapajós e Xingu ao sul do rio Amazonas, leste da Amazônia brasileira.
85 Ressalta-se que *L. emiliae* ocorre em simpatria com *M. stimulax* e *M. hispidus* na região do
86 baixo Amazonas, nas áreas de endemismo Tapajós e Rondônia [6].

87 Além disso, a distribuição e a região de simpatria entre *M. hispidus* e *M. stimulax* tem
88 sido questionado por alguns autores que propõem a área de ocorrência de *M. stimulax* do centro
89 a leste da Amazônia, margem esquerda do rio Tapajós em direção a margem direita do rio
90 Tocantins, enquanto *M. hispidus* está amplamente distribuído pela Amazonia até a margem
91 direita do rio Tapajós, possivelmente ocorrendo em simpatria com *M. stimulax* no sul do rio
92 Amazonas [6, 11, 12].

93 Tendo em vista as dificuldades na identificação taxonômica, principalmente associada
94 a sobreposição de características ecológicas, morfológicas e regiões de simpatria, estudos
95 buscaram empregar diferentes ferramentas para um melhor delineamento dos taxa, associando
96 dados morfológicos [9, 10], análises moleculares [6, 7, 8, 9, 10] e cariotípicas [11, 12]. Orlando
97 et al. [10] analisaram sequências de Cytb e dados morfométricos de amostras de *M. hispidus* e
98 observaram uma alta divergência intraespecífica com a estruturação de diferentes clados,
99 associado com variação no tamanho crânio-dental, sugerindo tratar-se de um complexo de

100 espécies. Apesar dessa variação, alocou todas as formas detectadas provisoriamente dentro de
101 *M. hispidus*, mas sugeriu que estudos utilizando análises morfológicas, moleculares e
102 cromossômicas fossem realizados.

103 Recentemente, Dias de Oliveira et al. [11] investigaram amostras de *M. hispidus* e *L.*
104 *emiliae*, através de análises citogenéticas e de sequências de Cytb. Além de corroborar com
105 Orlando et al. [10] que *M. hispidus* apresenta alta divergência genética intraespecífica, Dias de
106 Oliveira et al. [11] descreveram pela primeira vez o cariótipo de *L. emiliae* com número diploide
107 $(2n) 64♀65♂$, e número fundamental autossômico (NF) de 124, sendo este distinto dos
108 cariótipos descritos na literatura para o gênero *Mesomys*, sendo reconhecidos para *M. occultus*
109 $(2n=42/NF=54)$ [9], *M. hispidus* $(2n=60/NF=116)$ [9, 11] e *M. stimulax* $(2n=60/NF=110, 116)$
110 [9, 12].

111 Considerando a diversidade genética subestimada e inconsistências nos limites
112 geográficos nos gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix*, investigamos se os novos citótipos
113 encontrados $(2n=60/NF=110,112)$ e $(2n=66/NF=126)$ estão associadas as espécies *L. emiliae*, *M.*
114 *stimulax* e *M. hispidus*, em suas respectivas áreas de distribuição conhecidas.

115 Diante disso, o presente estudo analisou amostras de *L. emiliae*, *M. hispidus* e *M.*
116 *stimulax* a partir da citogenética clássica e molecular, por meio dos bandeamentos
117 cromossômicos G e C e FISH com sondas teloméricas e de rDNA 18S, e as relações
118 filogenéticas destes gêneros irmãos por meio dos marcadores moleculares Cytb e COI. Aqui,
119 descrevemos os possíveis rearranjos cromossômicos que contribuíram para a evolução e
120 diversificação, além de investigarmos a distribuição das espécies *M. hispidus* e *M. stimulax* a
121 partir de nossas amostragens distribuídas na Amazônia brasileira, correlacionando com as áreas
122 de endemismo.

123

124 **Material e Métodos**

125 **Amostras**

126 Obtivemos cariótipos de uma fêmea de *M. hispidus* de Jacareacanga; um macho de *M.*
127 *stimulax* de Paragominas; um macho de *Mesomys* sp. n. de Itaituba; e uma fêmea de *L. emiliae*
128 de Juruti, todas as localidades são do estado do Pará, Brasil (Fig. 1). Os espécimes foram
129 capturados usando armadilhas de interceptação e queda [14].

130

131 **Figura 1:** Mapa com os pontos de coleta das amostras do gênero *Mesomys* e *Lonchothrix*
132 analisadas no presente estudo e na literatura. Presente estudo: *M. hispidus* (1 a 10), *M. stimulax*
133 (4, 11 e 12) e *Mesomys* sp. n. (13). Literatura e GenBank: *M. hispidus* (16 a 21), *M. stimulax*
134 (22 e 23), *M. occultus* (17); *L. emiliae* do presente estudo: 14 e 15. Literatura e GenBank: 16,
135 24 a 26. O código de acesso do GenBank ou o código do coletor estão após a numeração dos
136 locais. Informações mais detalhadas podem ser encontradas no Apêndice A.

137

138 **Análise Citogenética**

139 As preparações cromossômicas foram obtidas através da extração da medula óssea [15].
140 Posteriormente, as lâminas foram preparadas e submetidas a bandagem G [16] e banda C [17],
141 além de FISH (hibridizar *in situ* fluorescente) com sondas teloméricas e rDNA 18S [18], todas
142 as técnicas seguiram os protocolos estabelecidos com adaptações.

143 As lâminas contendo as preparações cromossômicas utilizadas nas técnicas de
144 citogenética clássica foram analisadas em microscópio Olympus BX41 e fotografadas com
145 câmera digital Cânon Powershot A95. Os cariótipos foram montados usando o software
146 Applied Spectral Imaging Karyotyping, considerando a morfologia e tamanho dos
147 cromossomos. Os cromossomos são separados em dois grupos: de um braço
148 (subtelocêntrico/telocêntrico) e de dois braços (metacêntrico/submetacêntrico). As lâminas

149 previamente hibridizadas foram capturadas usando o software Nis-Elements sob o microscópio
150 Nikon H550S.

151 A classificação foi feita de acordo com Levan et al. [19], que leva em conta o quociente
152 entre o comprimento do braço cromossômico mais longo (L) e o do menor (C), no valor da
153 relação L/C. As designações clássicas dos cromossomos como metacêntrico, submetacêntrico,
154 subteloicêntrico e telocêntrico devido à posição do centrômero, se este ocupa as posições
155 mediana, submediana, subterminal e terminal, respectivamente.

156

157 **Análise Molecular**

158 A análise molecular do presente estudo utilizou 19 amostras de tecidos dos gêneros
159 *Mesomys* e *Lonchothrix* para extração do DNA a fim de obter sequências dos genes
160 mitocondriais citocromo b (Cytb) e Citocromo Oxidase - Subunidade I (COI). Os dados foram
161 complementados com as sequências disponíveis no GenBank (Apêndice A; Fig. 1; Tabela 1).

162 A extração do DNA total foi realizada com o auxílio do Kit Wizard Genomic da
163 Promega, de acordo com o protocolo do fabricante. As PCRs foram padronizadas com 15 µl de
164 volume final, contendo ~30ng de DNA genômico; 2.4 µl de dNTPs (1.25mM); 1.5 µl de tampão
165 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl); 1 µl de MgCl₂ (25 mM); 1 µl de cada iniciador (0.2
166 µM) e 1 U de Taq DNA polimerase. Com exceção da temperatura de hibridação dos iniciadores,
167 as demais etapas do protocolo de amplificação foram idênticas para os dois marcadores, a
168 programação no termociclador teve as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5
169 min, com 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 s, hibridação, temperaturas por 40 s,
170 extensão de 72°C por 40 s, e extensão final de 72°C por 5 min. As amplificações dos produtos
171 de PCR foram purificadas com o auxílio de polietileno glicol (PEG) e álcool. Posteriormente,
172 foram conduzidas reações de sequências com o Kit BigDye (Applied Biosystems), e as amostras
173 foram sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems)

174 As sequências de DNA foram alinhadas no ClustalW [20] e editadas manualmente no
175 software BioEdit v. 7.2.5 [21]. Análises filogenéticas foram realizadas por máxima
176 verossimilhança (ML). A busca para o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi feita
177 com o software jModeltest 2.0.2 [22]. Teste de saturação de bases foram realizadas no
178 DAMBE5 [23]. A análise de ML foi realizada em RAxML v.8, a árvore mais verossímil foi
179 encontrada por 1.000 buscas e posteriormente foram realizadas 1.000 pseudoréplicas de
180 bootstrap [24]. No programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) foram
181 verificados os percentuais de divergência genética entre os táxons [25].

182

183 **Resultados**

184 **Citogenética Clássica e Molecular**

185 ***Mesomys* (Echimyidae, Eumysopinae)**

186 A amostra de *Mesomys hispidus* do município de Jacareacanga (localidade 1, Fig. 1)
187 apresentou o cariótipo com $2n=60/NF=112$, com 29 pares autossômicos, variando de grande a
188 pequeno, sendo os pares 1 a 27 meta/submetacêntricos, os pares 28 e 29 acrocêntricos e o par
189 sexual X submetacêntrico grande (Fig. 2a). A heterocromatina constitutiva (HC) está
190 distribuída na região centromérica de todos os cromossomos autossômicos e sexuais (Fig. 2b).

191

192 **Figura 2.** *Mesomys hispidus* ($2n=60/NF=112$). a) Bandeamento-G e b) Bandeamento-C.

193

194 A amostra de *Mesomys stimulax* do município de Paragominas (localidade 11, Fig. 1)
195 apresentou o cariótipo com $2n=60/NF=110$, com 29 pares autossômicos, variando de grande a
196 pequeno, sendo os pares 1 a 26 meta/submetacêntricos, os pares 27 a 29 acrocêntricos o sexual

197 X submetacêntrico grande e o Y, submetacêntrico pequeno (Fig. 3a). A HC está distribuída na
198 região centromérica de todos os cromossomos autossômicos e sexuais (Fig. 3b).

199 A amostra de *Mesomys* sp. n. do município de Itaituba (localidade 13, Fig 1), apresentou
200 o cariótipo com $2n=60/FN=110$, com 29 pares autossômicos, variando de grande a pequeno,
201 sendo os pares 1 a 26 meta/submetacêntricos, o par 27 subtlocêntrico, os pares 28 e 29
202 acrocêntricos o sexual X submetacêntrico grande e Y, metacêntrico pequeno. A HC está
203 distribuída na região proximal de todos os cromossomos autossômicos e sexuais (Fig. 3 c).

204

205 **Figura 3.** *Mesomys stimulax* ($2n=60/NF=110$): a) Bandeamento-G; b) Bandeamento-C; e *Mesomys*
206 sp. n. ($2n=60/NF=110$): c) Bandeamento-C.

207

208 Em ambas as espécies, *Mesomys hispidus* e *Mesomys stimulax*, as FISHs com sondas
209 teloméricas mostraram apenas sinais distais e as com sondas de rDNA 18S marcaram na região
210 intersticial de um par autossômico (Fig. 4).

211

212 **Figura 4.** *Mesomys hispidus* a) FISH telomérica b) rDNA 18S; *Mesomys stimulax* c) FISH
213 telomérica d) FISH rDNA 18S.

214

215 ***Lonchothrix* (Echimyidae, Eumysopinae)**

216 A amostra de *Lonchothrix emiliae* do município de Juruti (localidade 14, Fig. 5)
217 apresentou o cariótipo com $2n=66/NF=126$, com 32 pares autossômicos, variando de grande a
218 pequeno, sendo os pares de 1 a 31 meta/submetacêntricos, o par 32 é acrocêntrico e o sexual X,
219 submetacêntrico grande (Fig. 5b).

220

221 **Figura 5.** *Lonchothrix emiliae* ($2n=66/NF=126$): a) Bandeamento-G; b) Bandeamento-C.

222

223 A FISH com sondas teloméricas mostrou sinais distais em todos os cromossomos e
224 sinais intersticiais em dois pares autossômicos; a sondas de rDNA 18S mostrou sinal intersticial
225 em apenas um par autossômico (Fig. 6).

226

227 **Figure 6.** *Lonchothrix emiliae* (2n=66/NF=126): a) FISH Telomérica; b) rDNA 18S.

228

229 **Filogenia Molecular**

230 A análise filogenética de máxima verossimilhança recuperou uma topologia com altos
231 valores de apoio (bootstrap) para a maioria dos nós. A relação irmã entre os gêneros
232 *Lonchothrix* e *Mesomys* foi recuperada com 99% de bootstrap. A amostra proveniente do
233 município de Itaituba, não correspondeu a nenhum clado conhecido do gênero *Mesomys*, e
234 formou um ramo com 97% de suporte, sugerindo que esta seja uma nova espécie para o gênero.

235

236 **Figura 7.** Árvore de máxima verossimilhança das amostras do presente trabalho e os
237 disponíveis no GenBank para os gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix*, baseada nas sequências
238 concatenadas de genes mitocondriais (COI e Cytb).

239

240 A análise filogenética feita a partir do gene mitocondrial do citocromo b (Cytb) mostrou
241 divergência intergenérica de $15 \pm 24\%$ entre os táxons analisados (Tabela 2). A distância
242 intergenérica menor foi de 15% para o grupo *L. emiliae* + *M. stimulax* e a maior foi de 24%
243 para o grupo *M. occultus* + *Isothrix sinnamariensis*. A maior distância intragenérica foi de 14%
244 para o grupo *M. hispidus* + *M. occultus*. A divergência de nucleotídeo médio intraespecífico
245 para cada espécie foi <5%, com exceção de *M. hispidus* que apresentou 5%. *Mesomys* sp. n.

246 apresentou divergência intragenérica de 8% para *M. hispidus*, 7% para *M. stimulax* e 12% para
 247 *M. occultus*.
 248

249 **Tabela 2: Estimativas de distância-P para o gene Citocromo b (Cytb) entre os clados monofiléticos**
 250 **recuperados na análise filogenética. VI = variação intraespecífica. As pontuações em negrito representam**
 251 **os valores mais baixos e mais altos de divergência interespecífica e intraespecífica para as diferentes espécies**
 252 **analisadas.**
 253

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	VI (%)
[1] <i>L. emiliae</i>												0,03
[2] <i>M. hispidus</i>	0,18											0,05
[3] <i>M. stimulax</i>	0,15	0,09										0,04
[4] <i>Mesomys sp n</i>	0,16	0,08	0,07									0
[5] <i>M. occultus</i>	0,16	0,14	0,12	0,12								0
[6] <i>E. spinosus</i>	0,17	0,21	0,19	0,19	0,21							0
[7] <i>D. dactylinus</i>	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,18						0
[8] <i>C. laticeps</i>	0,21	0,21	0,20	0,20	0,23	0,16	0,19					0
[9] <i>H. gymnurus</i>	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,19				0
[10] <i>I. sinnamariensis</i>	0,18	0,23	0,22	0,23	0,24	0,22	0,19	0,22	0,21			0
[11] <i>Makalata sp</i>	0,20	0,22	0,21	0,21	0,21	0,19	0,19	0,21	0,22	0,21		0

254

255 A análise filogenética feita a partir do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase -
 256 Subunidade I (COI) mostrou divergência intergenérica de $12 \pm 22\%$ entre os táxons analisados
 257 (Tabela 3). A menor distância intergenérica foi de 12% para o grupo *L. emiliae* + *Mesomys sp.*
 258 n. e a maior foi de 22% para os grupos *Mesomys sp. n.* + *Carterodon sulcidens* e
 259 *Euryzygomatomys spinosus* + *C. sulcidens*. A divergência de nucleotídeo médio intraespecífico
 260 para cada espécie foi <5%, com exceção de *M. hispidus* que apresentou (9%). *Mesomys sp. n.*
 261 apresentou divergência interespecífica 11% para *M. hispidus* e 9% para *M. stimulax*.

262

263 Tabela 3: Estimativas de distância-P para o gene Citocromo C Oxidase - Subunidade I (CO1) entre os clados
 264 monofiléticos recuperados na análise filogenética. VI = variação intraespecífica. As pontuações em negrito
 265 representam os valores mais baixos e mais altos de divergência interespecífica e intraespecífica para as
 266 diferentes espécies analisadas.
 267

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	VI (%)
[1] <i>L. emiliae</i>												0,04
[2] <i>M. hispidus</i>	0,14											0,09
[3] <i>M. stimulax</i>	0,14	0,11										0,04
[4] <i>Mesomys sp n</i>	0,12	0,11	0,09									0
[5] <i>E. spinosus</i>	0,18	0,20	0,20	0,18								0
[6] <i>C. sulcidens</i>	0,20	0,21	0,21	0,22	0,22							0
[7] <i>D. dactylinus</i>	0,18	0,21	0,19	0,17	0,17	0,20						0
[8] <i>C. laticeps</i>	0,19	0,19	0,17	0,19	0,15	0,21	0,18					0
[9] <i>H. gymnurus</i>	0,16	0,20	0,20	0,19	0,17	0,21	0,17	0,17				0
[10] <i>I. sinnamariensis</i>	0,17	0,19	0,18	0,18	0,17	0,22	0,16	0,18	0,17			0
[11] <i>Makalata sp</i>	0,14	0,18	0,19	0,16	0,20	0,20	0,17	0,19	0,18	0,20		0

268

269 **Discussão**

270 **Análise Molecular**

271 A análise molecular mostrou alto apoio (bootstrap) para os gêneros amostrados da
 272 família Echimyidae (*Lonchothrix*, *Mesomys*, *Carterodon*, *Clyomys*, *Euryzygomatomys*,
 273 *Hoplomys*, *Dactylomys*, *Isothrix* e *Makalata*), corroborando com os dados filogenéticos para a
 274 monofilia do grupo [7, 8]. Além disso, os gêneros *Lonchothrix* e *Mesomys* saíram com apoio
 275 de 99% de bootstrap na análise de máxima verossimilhança (ML) dos marcadores moleculares
 276 Cytb e COI, reforçando o status de irmandade deste clado.

277 Nossas amostras de *M. hispidus*, *M. stimulax* e *L. emiliae* foram devidamente associadas as
278 sequenciais disponíveis no GenBank para os genes Cytb e COI, confirmando a identidade de
279 cada espécie a partir do DNA barcoding. Entretanto, uma nova linhagem para o gênero
280 *Mesomys* foi recobrada.

281 Estudos prévios de ML com base no gene mitocondrial Cytb recobraram um apoio de
282 100% diferindo *M. occultus* em relação às espécies irmãs *M. hispidus* + *M. stimulax* [9, 10],
283 enquanto essas espécies irmãs ramificaram com 72% [9] e acima de 75% [10]. *M. occultus* se
284 apresentou distinto das demais espécies de *Mesomys* com 100% de bootstrap a partir da análise
285 de ML utilizando os marcadores concatenados Cytb + COI similar ao encontrado por outros
286 autores [9, 10], também recobramos um valor de bootstrap de 94% para a ramificação de *M.*
287 *hispidus* + *M. stimulax*. Adicionalmente, recobramos uma espécie irmã do agrupamento *M.*
288 *hispidus* + *M. stimulax*, divergindo em um ramo com 97% de apoio para a amostra proveniente
289 da área de endemismo Tapajós, no município de Itaituba-PA no qual descrevemos pela primeira
290 vez o surgimento desse ramo [9, 10, 11].

291 A divergência interespecífica baseada no gene mitocondrial Cytb entre as espécies de
292 *Mesomys* e esta nova linhagem detectada foi de 12% em relação a *M. occultus*, 8% para *M.*
293 *hispidus* e de 7% para *M. stimulax*, enquanto os valores recobrados para o gene mitocondrial
294 COI foram 11% em relação a *M. hispidus* e 9% para *M. stimulax*. De acordo com a variação
295 intraespecífica para as espécies analisadas, *L. emiliae* foi a que apresentou menor taxa, com 3%
296 em ambos os genes (Cytb e COI), seguida de *M. stimulax* com 4% também em ambos os
297 marcadores, e *M. hispidus* foi a que apresentou maior divergência nucleotídica intraespecífica
298 com 5% para Cytb e 9% para COI. A elevada divergência intraespecífica encontrada em *M.*
299 *hispidus* corrobora com outros estudos, onde foram descritos clados com divergência
300 nucleotídica de 7,2%, sendo três amplamente distribuídos e três geograficamente isolados na
301 região amazônica [9, 10, 11]. Além disso, é postulado que valores acima de 5% de divergência

302 nucleotídica para genes mitocondriais em roedores são indicativos de possíveis espécies
303 crípticas [25, 26]. Nesse sentido, questionamos o status taxonômico da espécie *Mesomys*
304 *hispidus*, que pode ser constituída de um complexo de espécies [9, 10]. Adicionalmente, a
305 divergência interespecífica de 7-12% (Cytb) e 9-11% (COI) da nova linhagem em relação aos
306 outros taxa de *Mesomys* indica que deve se tratar de uma espécie ainda não descrita para o
307 gênero, aqui denominada como *Mesomys* sp. nov.

308

309 **Análise Cariotípica de *Mesomys* e *Lonchothrix***

310 Os dados do presente trabalho apresentam um novo citótipo para *Mesomys hispidus*
311 possuindo $2n=60/FN=112$, proveniente do município de Jacareacanga-PA (localidade 1, fig. 1).
312 Esta amostra possui dois pares acrocêntricos (28 e 29), o que difere dos cariótipos descritos na
313 literatura para *M. hispidus* de Juruti-PA (localidade 16, fig. 1) [11] e *M. hispidus* do alto rio
314 Juruá [9] que apresentam todos os pares cromossômicos com morfologia de dois braços
315 ($2n=60/NF=116$). A conservação do $2n = 60$, com variação no $NF = 112$ e 116 pode ser
316 decorrente de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica, sendo uma das variações
317 cromossômicas comuns em roedores [27, 28, 29].

318 *Mesomys stimulax* com $2n=60/FN=110$ proveniente do município de Paragominas-PA
319 (localidade 11, fig. 1), corrobora com o número diploide ($2n = 60$) e números de braços
320 autossômicos ($NF=110$) descrito por Malcher et al. [12] (localidade 22, fig. 1), porém, apresenta
321 variação de HC, o qual é restrito na região centromérica, enquanto *M. stimulax* [12] apresenta
322 blocos de HC na região centromérica, região proximal e alguns pares são quase todos
323 heterocromáticos.

324 A amostra de *Mesomys* sp. n. proveniente do município de Itaituba-PA (localidade 13,
325 fig. 1) apresenta o $2n = 60$ e $NF=110$ do cariótipo descrito para *M. stimulax* de Paragominas-
326 PA (localidade 11, fig. 1) e Marabá-PA (localidade 22, fig. 1) [12], entretanto difere na

327 morfologia cromossômica, apresentando um grande par cromossômico subtelocêntrico,
328 enquanto as outras populações apresentam três pequenos pares acrocêntricos.

329 A análise comparativa por bandeamento C também revelou um padrão de distribuição
330 proximal da HC nos cromossomos autossomos e sexuais, similar ao descrito para *M. stimulax*
331 de Marabá-PA (localidade 22, fig. 1) em alguns pares, entretanto diferente de *M. stimulax* da
332 população de Paragominas-PA (localidade 11, fig. 1) em que o padrão de HC está restrito a
333 região centromérica [11, 12].

334 Nossos dados de FISH com sonda telomérica e de rDNA 18S para *M. hispidus*
335 (localidade 1, fig. 1) e *M. stimulax* (localidade 11, fig. 1) corroborou com o descrito na literatura
336 para populações de *M. hispidus* de Juruti-PA (localidade 16, fig. 1) e de *M. stimulax* de Marabá-
337 PA (localidade 22, fig. 1), apresentando sinais teloméricos distais e sinal de rDNA 18S em um
338 par cromossômico [11, 12].

339 Apresentamos um novo citótipo para *Lonchothrix emiliae* proveniente de Juruti-PA
340 (localidade 14, fig. 1) com $2n=66/NF=126$ ocorrendo em simpatria com a forma *L. emiliae*
341 $2n=64♀/65♂/NF=124$ provenientes de Juruti-PA e Parintins-AM (localidades 16 e 24; fig.)
342 [11], diferindo o $2n$ e NF pela presença de um par cromossômico de morfologia
343 submetacêntrica pequeno adicional e sistema sexual simples. Além disso, nossos dados de FISH
344 com sondas teloméricas para *L. emiliae* (localidade 14, fig. 1) diferiu dos dados disponíveis na
345 literatura, apresentando quatro sinais intersticiais teloméricos em dois pares cromossômicos,
346 enquanto *L. emiliae* (localidades 16 e 24; fig.) apresentou dois sinais em um par cromossômico.
347 A FISH com sonda rDNA 18S corroborou com os dados disponíveis na literatura apresentando
348 dois sinais em um par cromossômico [11].

349

350 **Distribuição Geográfica de *Mesomys***

351 O gênero *Mesomys* (Echimyidae, Eumysopinae), está amplamente distribuído pela
352 Amazônia e pelas oito áreas de endemismo. *Mesomys occultus* ocorre na área de endemismo
353 Napo, *M. hispidus* está distribuído por seis áreas de endemismo, com exceção de Belém e
354 Xingu; e *M. stimulax* possui distribuição nas áreas de endemismo Xingu, Tapajós, Rondônia,
355 Belém e Guianas [6, 11, 12].

356 No que diz respeito a distribuição e a simpatria entre as espécies *M. hispidus* e *M.*
357 *stimulax*, estudos descrevem *M. hispidus* com limites de ocorrência até a margem esquerda do
358 rio Tapajós em direção à oeste da Amazônia e *M. stimulax* limitado ao leste do Rio Xingu em
359 direção a leste da Amazônia [6]. Entretanto, nossos dados moleculares mostram espécimes de
360 *M. hispidus* com ocorrência na margem direita do rio Tapajós e sul do afluente Teles Pires e
361 ilha do Marajó, leste da Amazônia e espécimes de *M. stimulax* com ocorrência no sentido oeste
362 da Amazônia, no alto rio Madeira e margem esquerda do rio Juruena nas áreas de endemismo
363 Inambari e Rondônia, respectivamente. Dessa forma, propomos a ampliação da distribuição
364 dessas espécies para estas localidades não reconhecidas até o momento (Fig. 8).

365

366 **Figura 8.** Proposta de ampliação da distribuição geográfica para as espécies *M. hispidus* e *M.*
367 *stimulax*.

368

369 Propomos que as diferenças cariotípicas e filogenéticas encontradas em *Mesomys* sp. n.
370 ($2n=60/NF=110$), esteja relacionada com a barreira imposta pelo rio Tapajós [30, 31, 32].
371 Tendo em vista que este foi peça chave na diversificação de populações de diversos táxons de
372 vertebrados que ocorrem em margens opostas, atuando como barreira geográfica na região do
373 interflúvio Tapajós-Xingu (área de endemismo Tapajós) e Tapajós-Madeira (área de
374 endemismo Rondônia), impedindo o fluxo gênico entre as populações [31, 33].

375 De acordo com Oliveira da Silva et al [33] que analisaram populações do gênero
376 *Neacomys* (Rodentia, Sigmodontinae) a qual apresentaram diferenças cariotípicas e
377 moleculares entre as áreas de endemismo Rondônia, Tapajós e Xingu, demonstraram a
378 importância da hipótese dos rios como barreira atuando, também sobre os pequenos mamíferos
379 não voadores. Entretanto, mais análises são necessárias para validar essa nova linhagem de
380 *Mesomys*.

381

382 **Conclusões**

383 Descrevemos dois novos citótipos, um para *M. stimulax* de Jacareacanga com forma
384 cariotípica $2n=60/NF=112$ e um para *L. emiliae* de Juruti com forma cariotípica
385 $2n=66/NF=126$, ambos inéditos para os gêneros. Nossos dados filogenéticos revelam uma nova
386 linhagem para o gênero *Mesomys* para uma amostra do município de Itaituba-PA, área de
387 endemismo do Tapajós, em simpatria com as espécies *M. hispidus* e *M. stimulax*. Além disso,
388 *M. hispidus* apresentou alto grau de divergência intraespecífica, confirmando que se trata de
389 um complexo de espécies. E sugerimos expandir a distribuição de ocorrência de *M. hispidus*
390 para a margem direita do rio Tapajós, ao sul do afluyente Teles Pires e ilha de Marajó no leste
391 da Amazônia; e *M. stimulax* para o oeste da Amazônia, no alto rio Madeira e nas margens do
392 rio Juruena nas áreas de endemismo de Inambari e Rondônia, respectivamente

393

394 **Contribuições dos autores**

395 LDO coletou as amostras, colaborou em todos os dados citogenéticos, realizou a revisão
396 bibliográfica e redigiu o artigo. WOS colaborou em todos os procedimentos e análises
397 citogenéticas. O MRJC coletou parte das amostras, colaborou com dados citogenéticos e
398 moleculares. JCC realizou parte da análise molecular. JSS realizou parte da análise molecular.

399 IS e RVR auxiliaram na análise molecular. JCP auxiliou na análise dos dados e redação do
400 artigo e discutiu os dados. CYN auxiliou na concepção do estudo e participou do
401 desenvolvimento de técnicas laboratoriais e coordenou a redação deste artigo. Todos os autores
402 revisaram o artigo, leram e aprovaram o manuscrito final.

403

404 **Reconhecimentos**

405 As coletas de amostras foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da
406 Biodiversidade (ICMBio) e Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Pará (SEMA-PA).

407

408 **Referências**

- 409 1. Cody ML, Robert HM, Jared MD. Ecology and evolution of communities. Harvard
410 University Press, 1975.
- 411 2. Ab'Saber AN. "Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira." Estudos
412 avançados, 16, (2002): 7-30.
- 413 3. Paglia AP, Fonseca GA, Rylands AB, Hermann G, Aguiar LM, Chiarello AG, Patton JL.
414 "Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian
415 Mammals." Occasional papers in conservation biology, 6, (2012): 1-82.
- 416 4. Da Silva JM, Novaes FC, Oren DC. "Differentiation of Xiphocolaptes (Dendrocolaptidae)
417 across the river Xingu, Brazilian Amazonia: recognition of a new phylogenetic species and
418 biogeographic implications." BULLETIN-BRITISH ORNITHOLOGISTS CLUB, 122.3,
419 (2002): 185-193.
- 420 5. Silva JMC, Rylands AB. and Fonseca, G. A. B. O destino das áreas de endemismo da
421 Amazônia. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 124-131, (2005).
- 422 6. Patton JL, Pardiñas UFJ, D'Elía G. Mammals of South America: Rodents. Rio de Janeiro:

- 423 RIMA, 2015.
- 424 7. Fabre PH, Galewski T, Tilak MK, Douzery EJP. Diversification of South American spiny
425 rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zool Scripta*. 2012; 42: 117-134.
- 426 8. Fabre PH, Upham NS, Emmons LH, Justy F, Leite YL, Loss AC, Orlando L, Tilak MK,
427 Patterson BD, Douzery EJ. Mitogenomic phylogeny, diversification, and biogeography of
428 South American spiny rats. *Molecular Biology and Evolution*, 34, (2016), (3): 613-633.
429 <https://doi.org/10.1093/molbev/msw261>
- 430 9. Patton JL, Silva MNF, Malcolm JR. Mammals of the Rio Juruá and the Evolutionary and
431 ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural
432 History*. (2000), vol. 97, no. 25.
- 433 10. Orlando L, Mauffrey JF, Cuisin J, Patton JL, Hanni C., Catzeflis F. Napoleon Bonaparte,
434 and the fate of an Amazonian rat: new data on the taxonomy of *Mesomys hispidus*
435 (Rodentia: Echimyidae). *Mol Phylog Evol*. (2003): 113-120.
- 436 11. Dias de Oliveira L, Oliveira da Silva W, Rodrigues da Costa MJ, Sampaio I, Pieczarka JC,
437 Nagamachi, CY. First cytogenetic information for *Lonchothrix emiliae* and taxonomic
438 implications for the genus taxa *Lonchothrix* + *Mesomys* (Rodentia, Echimyidae,
439 Eumysopinae). *PLoS ONE*, (2019), 14, (4): e0215239.
440 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215239>
- 441 12. Malcher SM, Pieczarka JC, Pereira AL, Amaral PJS, Rossi RV, Saldanha J, Nagamachi,
442 CY. New karyotype for *Mesomys stimulax* (Rodentia, Echimyidae) from the Brazilian
443 Amazon: A case for species complex? ***Ecology and Evolution***, v. 11, n. 12, p. 7125-7131,
444 2021.
- 445 13. Corn PS. Straight-line drift fences and pitfall traps. In: HEYER, W. R., M. et al. (Eds).
446 *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*.
447 Smithsonian Institution Press, Washington, pp 109-117; 1994.

- 448 14. Ford CE, Hamerton JL. A colchicine, hypotonic – citrate, squash sequence for mammalian
449 chromosomes. *Staining Technology*. 1956; 31: 247-251.
- 450 15. Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA. New technique for distinguishing between human
451 chromosomes. *Nat New Biol*. (1971), 232: 31–32.
- 452 16. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell*
453 *Res*. (1972) 75: 304-306.
- 454 17. Daniels LM, Delany ME. Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal
455 DNA in chicken (*Gallus gallus*). *Chromosome Res*. (2003), 11:305–317.
- 456 18. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on
457 chromosomes. *Hereditas*. (1964), 52: 201-220.
- 458 19. Thompson JF, Patrice MM. "The properties and applications of single-molecule DNA
459 sequencing." *Genome biology*, 12.2 (2011): 1-10.
- 460 20. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis pro-
461 gram for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. (1999), 41: 95–98.
- 462 21. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models
463 of protein evolution. *Bioinformatics*. (2011), 27: 1164–1165.
- 464 22. Xia XD. A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and
465 evolution. *Mol Biol Evol*. (2013), 30: 1720–1728.
- 466 23. Stamatakis A. "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of
467 large phylogenies." *Bioinformatics* 30.9 (2014): 1312-1313.
- 468 24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary
469 Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725–2729.
470 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID:24132122.
- 471 25. Baker RJ, Bradley RD. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J Mammal*.
472 (2006), 87: 643–662.

- 473 26. Bradley RD, Baker RJ. A test of the genetic species concept: cytochrome-B sequences and
474 mammals. *J Mammal.* (2001), 82: 960–973.
- 475 27. Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M. Distribution of
476 telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma.* (2002), 111(4):
477 215-227.
- 478 28. Faria R, Arcadi N. "Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of
479 evidence." *Trends in ecology e evolution* 25.11 (2010): 660-669.
- 480 29. Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi O, Stanyon R. Centromere repositioning
481 in mammals. *Heredity*, (2012), 108, 59–67. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.101>
- 482 30. Bates JM. "Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a
483 vicariance model for a basic diversification pattern." *Divers. biológica e Cult. da Amaz*
484 (2001): 119-137.
- 485 31. Moraes LJCL, Ribas CC, Pavan D, Werneck FP. "Biotic and landscape evolution in an
486 Amazonian contact zone: Insights from the herpetofauna of the Tapajós River Basin,
487 Brazil." *Neotropical diversification: Patterns and processes.* Springer, Cham, (2020): 683-
488 712.
- 489 32. Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, Da Silva MN, Bogart JP, Loughheed SC, Boag PT.
490 Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. **Proceedings of**
491 **the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13672-13677, (2000).
- 492 33. Oliveira Da Silva W, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, O'brien PCM, Mendes-Oliveira
493 AC, Sampaio I, Carneiro JC, Nagamachi CY. Chromosomal diversity and molecular
494 divergence among three undescribed species of *Neacomys* (Rodentia, Sigmodontinae)
495 separated by Amazonian rivers. *PLoS ONE.* 12: 1–19 (2017).

FIGURAS

Figura 1 - Mapa com os pontos de coleta das amostras do gênero *Mesomys* analisadas no presente estudo e da literatura. Presente estudo: *M. hispidus* (1 a 10), *M. stimulax* (4, 11 e 12) e *Mesomys* sp n (13). Literatura e GenBank: *M. hispidus* (16 a 21), *M. stimulax* (22 e 23), *M. occultus* (17); *L. emiliae* do presente estudo: 14 e 15. Literatura e GenBank: 16, 24 a 26. Código de acesso do GenBank ou código do coletor estão após a numeração das localidades. Informações mais detalhadas encontram-se no Apêndice A.

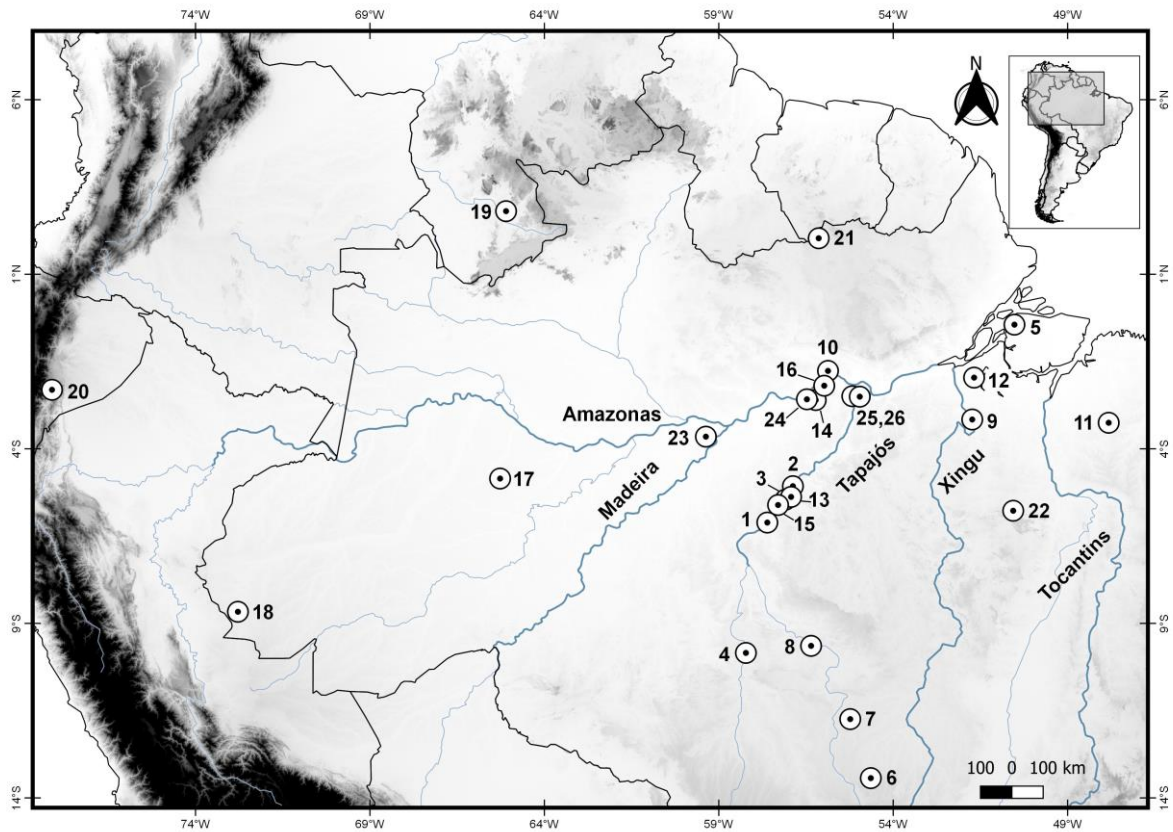


Figura 2 - *Mesomys hispidus* ($2n=60/NF=112$). a) Bandeamento-G e b) Bandeamento-C.

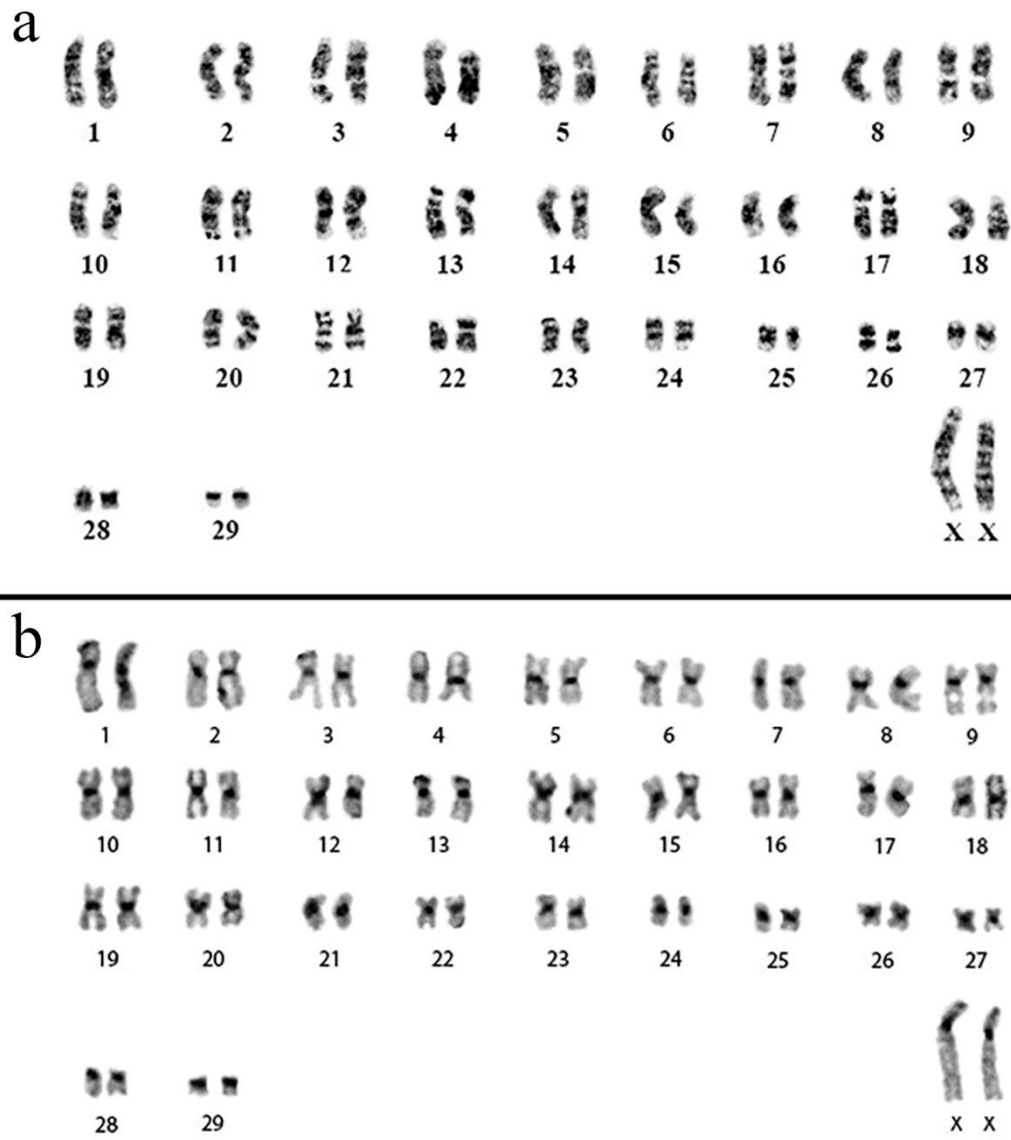


Figura 3 - *Mesomys stimulax* ($2n=60/NF=110$). a) Bandeamento-G e b) Bandeamento-C; *Mesomys* sp. n. c) Bandeamento-C proximal.

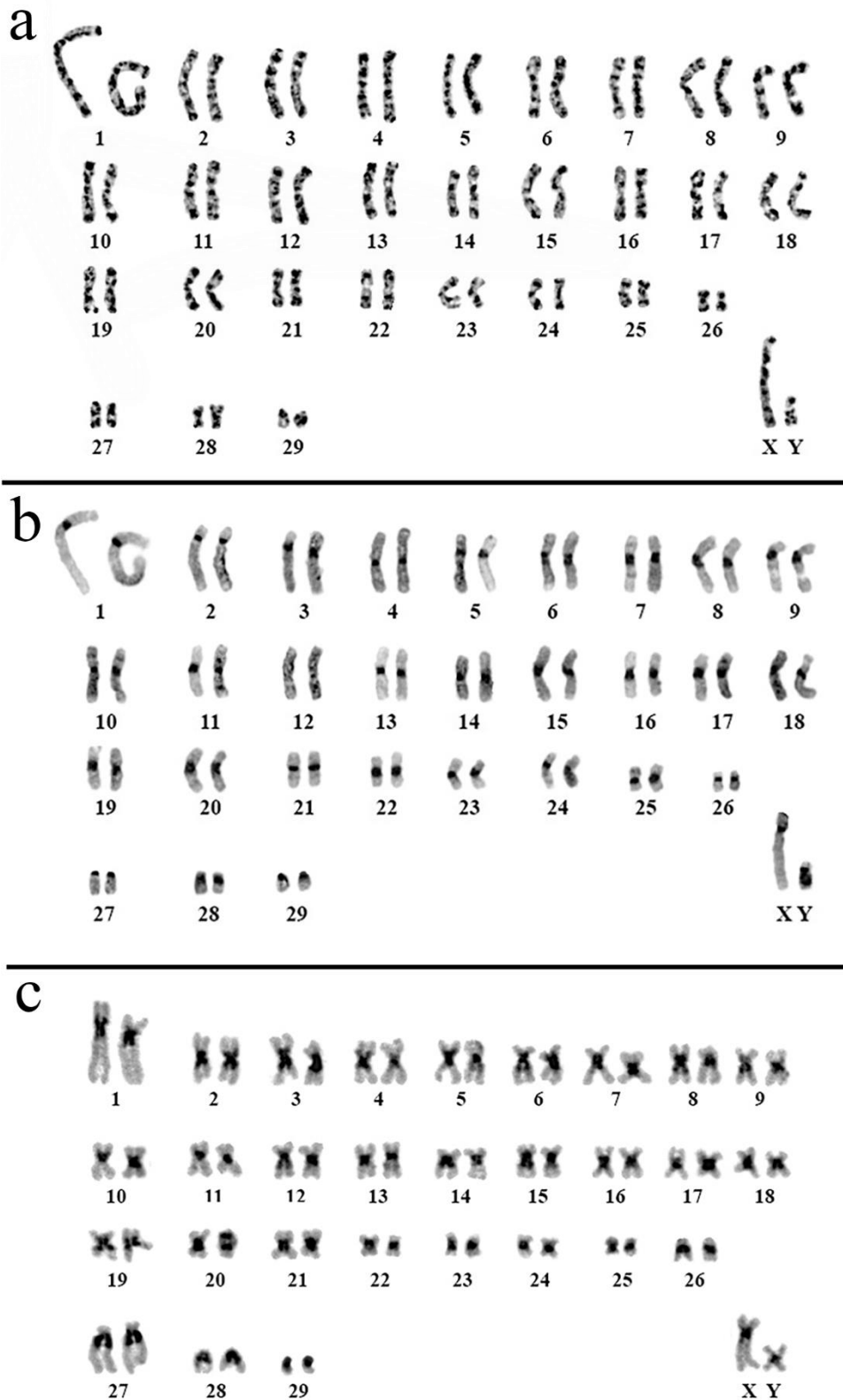


Figura 4 - *Mesomys hispidus* ($2n=60/NF=112$). a) FISH telomérica b) FISH rDNA 18S; *Mesomys stimulax* ($2n=60/NF=110$). c) FISH telomérica e d) FISH rDNA 18S.

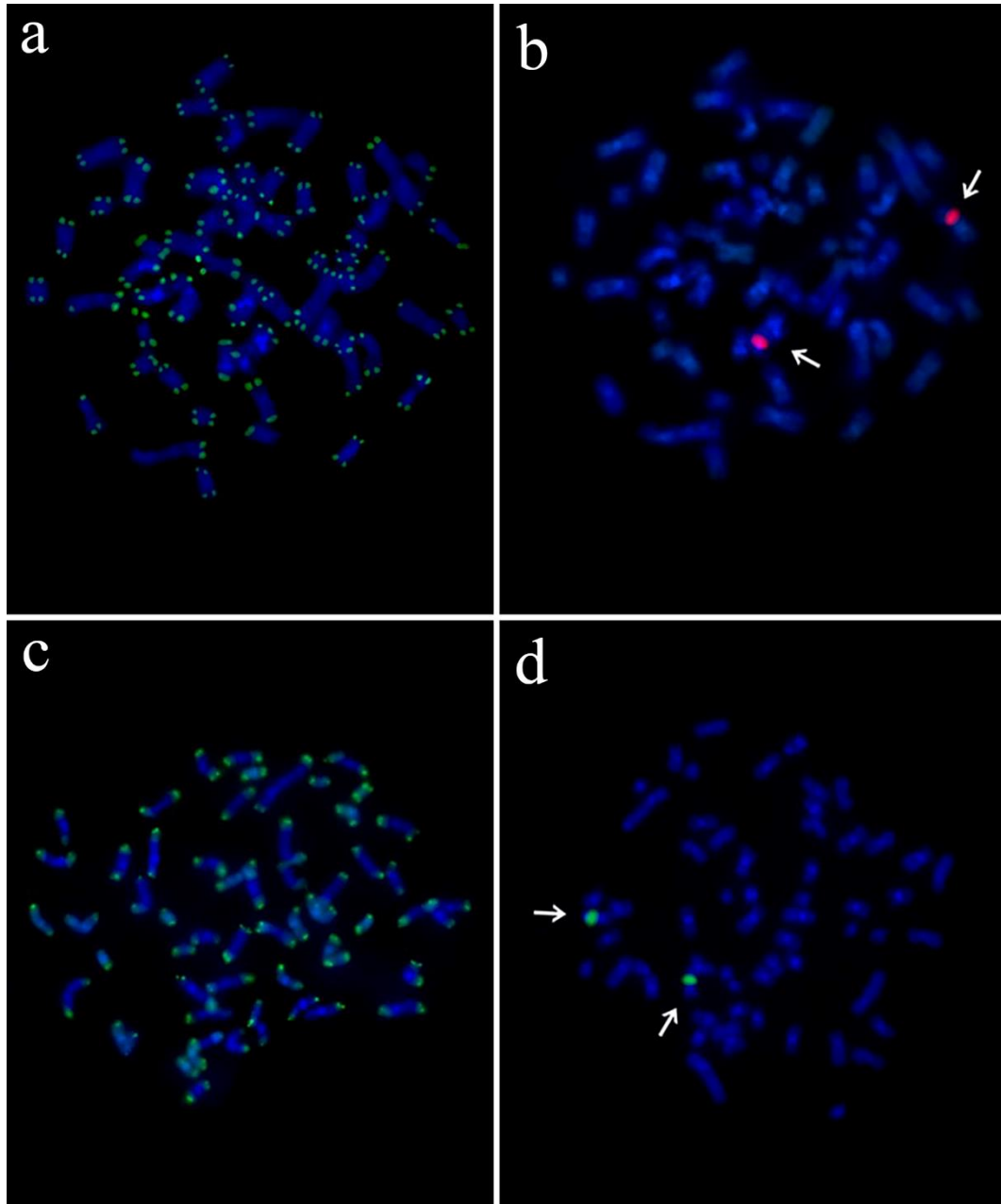


Figura 5 - *Lonchothrix emiliae* ($2n=66/NF=126$). a) Bandeamento-G e b) Bandeamento-C.

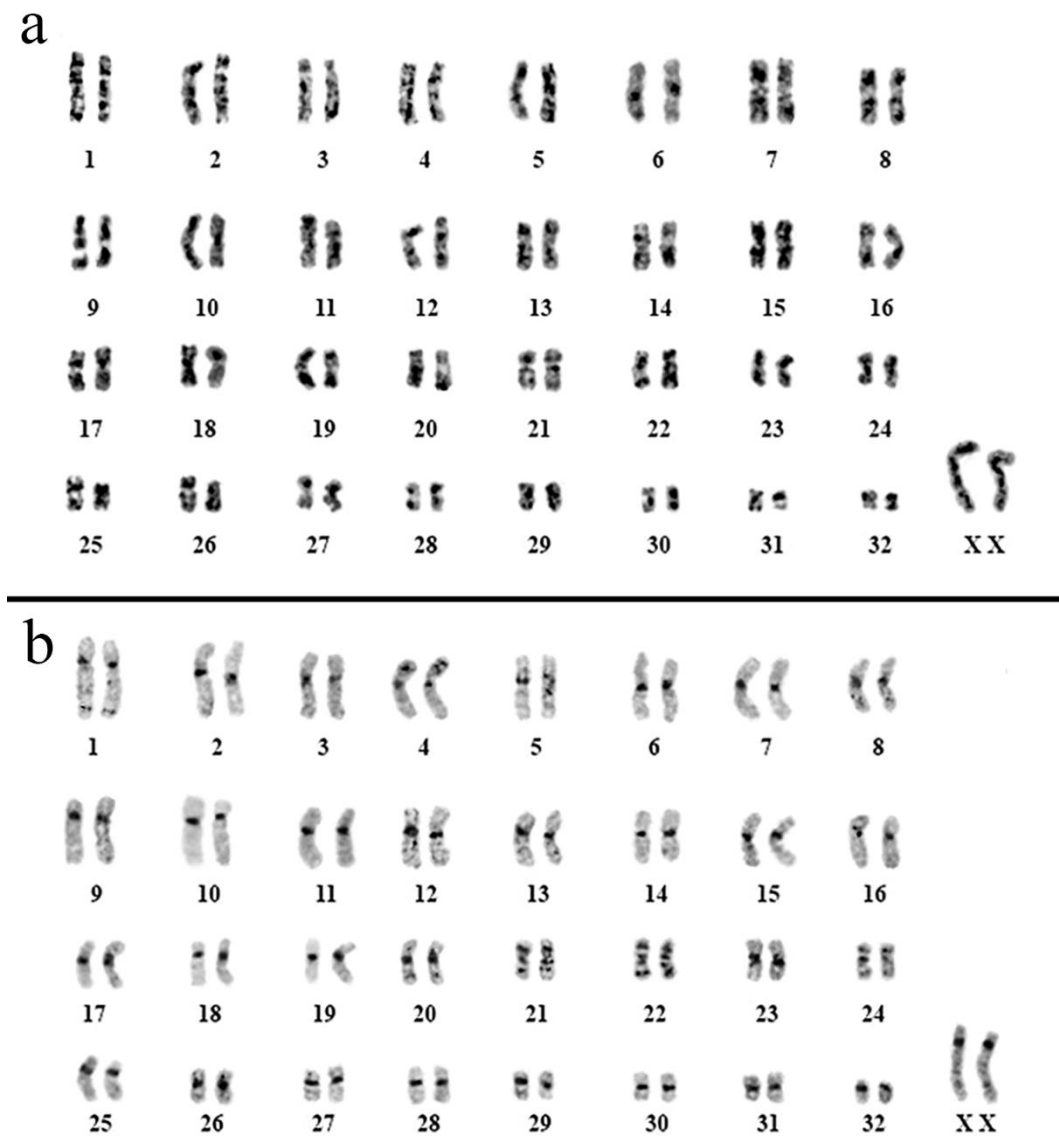


Figura 6 - *Lonchothrix emiliae* ($2n=66/NF=126$). a) FISH Telomérica e b) rDNA 18s.

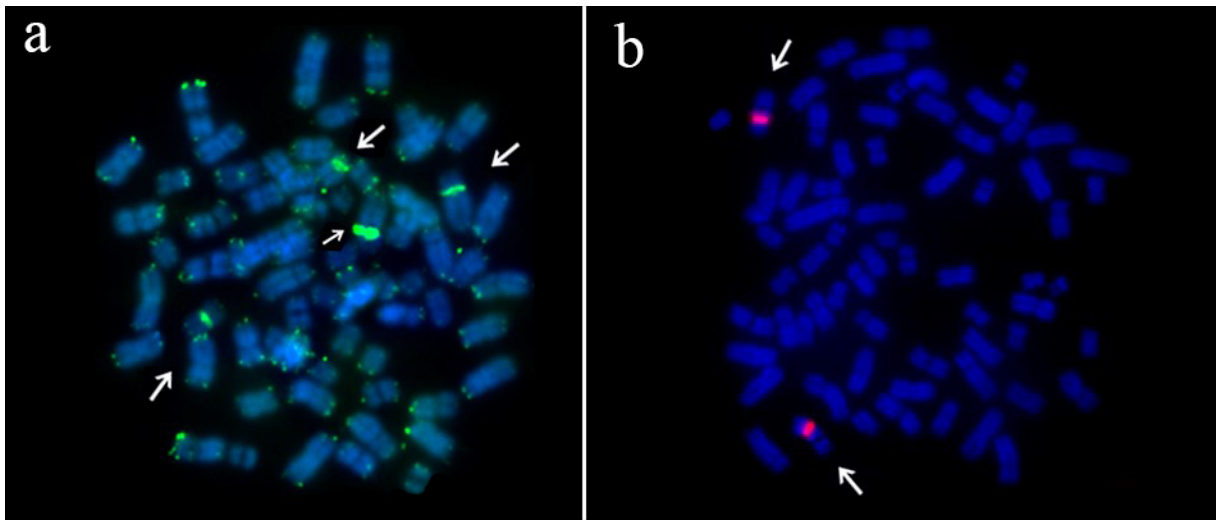


Figura 7 - Árvore de máxima verossimilhança das amostras dos gêneros *Mesomys* e *Lonchothrix*, baseada sequências de genes mitocondriais concatenados (Cytb e COI).

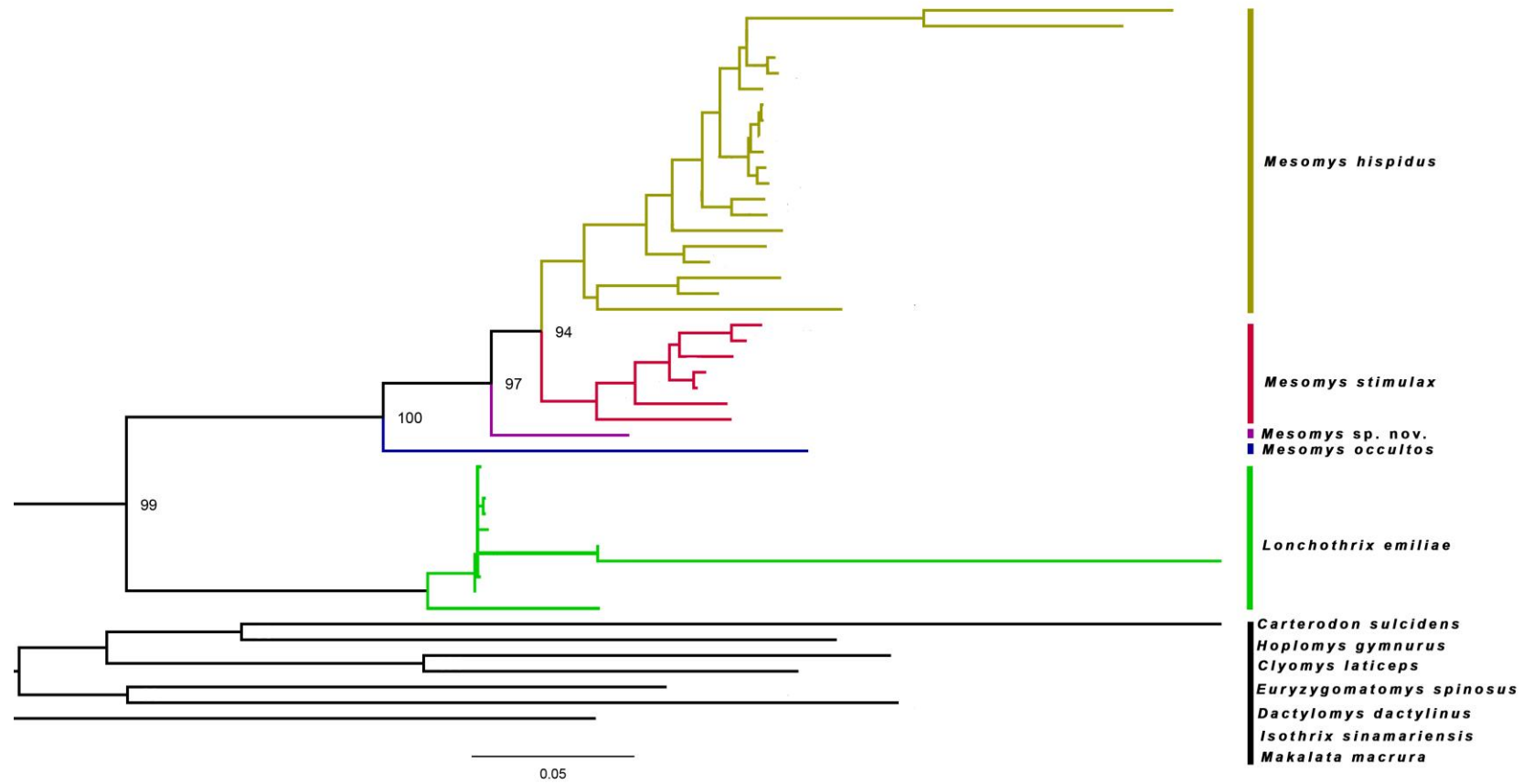


Figura 8 – Proposta de ampliação da distribuição geográfica para as espécies *M. hispidus* e *M. stimulax*.

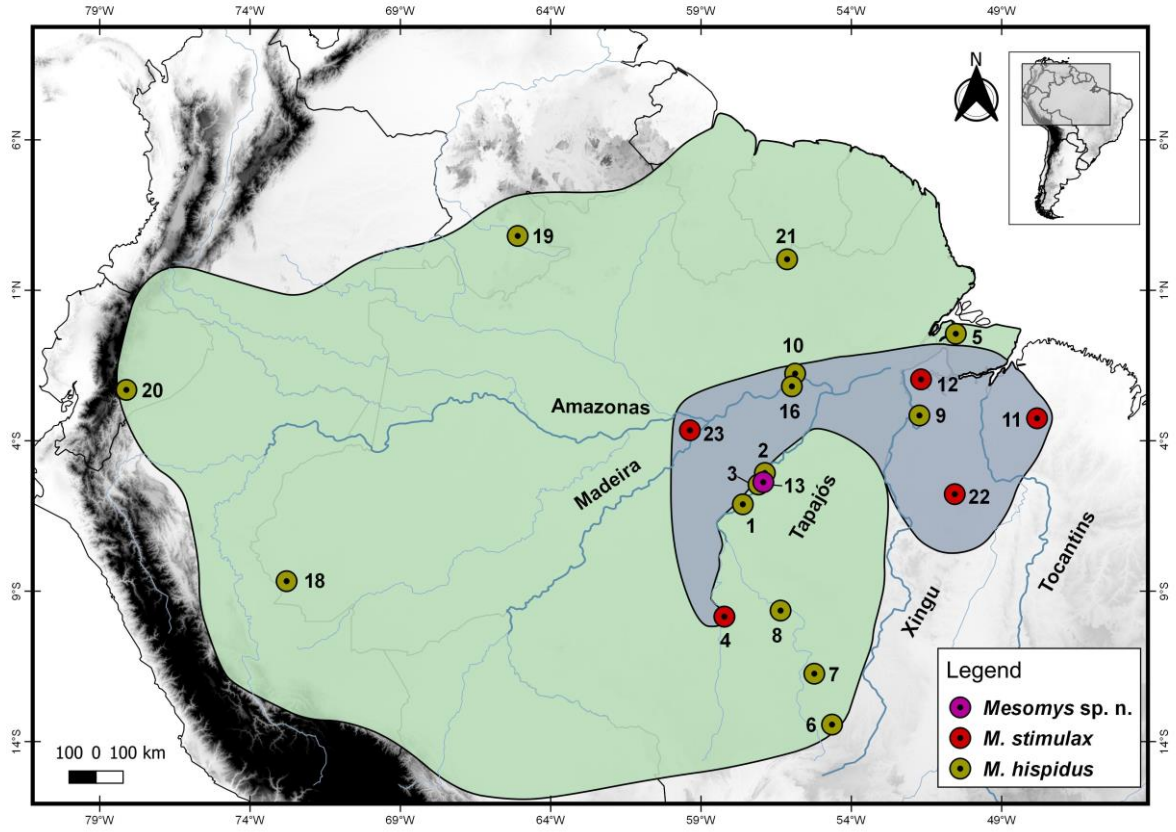


Tabela S1. Lista de espécimes incluídos na análise molecular do gene Citocromo b (Cytb) e COI no presente estudo. Para cada amostra, são fornecidos o número/voucher do GenBank, a localidade e a referência.

Espécies	GenBank	Citogenética	Cytb	COI	Latitude	Longitude	Localidade	Referência
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	06°6'39.14"S	57°36'19.88"W	[1] BR: PA, Jacareacanga	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		2n=60/NF=112	X		06°6'39.14"S	57°36'19.88"W	[1] BR: PA, Jacareacanga	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	05°04'07.04"S	56°52'19.09"W	[2] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	05°27'12.7"S	57°05'6.3"W	[3] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-		X	09°50'43.3"S	58°13'10.6"W	[4] BR: MT, Cotriguaçu	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	09°50'43.3"S	58°13'10.6"W	[4] BR: MT, Cotriguaçu	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	00° 26' 29"S	50° 31' 14"W	[5] BR: PA, Afuá, Ilha do Marajó	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	765075	8528378	[6] BR: MT, Nova Ubiratã	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X	X	11°44'30.94"S	55°13'42.98"W	[7] BR: MT, Sinop	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X		9°38'36.5"S	56°21'02.6"W	[8] BR: MT, Paranaíta	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		-	X		3°09'29.7"S	51°43'49.7"W	[9] BR: PA, Vitória do Xingu	Presente estudo

<i>M. hispidus</i>		-	X		1°45'57"S	55°51'57"W	[10] BR: PA, Oriximiná	Presente estudo
<i>M. stimulax</i>		2n=60/NF=110	X	X	3°15'7.43"S	47°49'6.54"W	[11] BR: PA, Paragominas	Presente estudo
<i>M. stimulax</i>		-	X	X	09°50'43.3"S	58°13'10.6"W	[4] BR: MT, Cotriguaçu	Presente estudo
<i>M. stimulax</i>		-		X	1°57'29.79"S	51°40'36.40"W	[12] BR: PA, Caxiuanã	Presente estudo
<i>Mesomys sp. n.</i>		2n=60/NF=110	X	X	05°22'31.60"S	56°55'25.60"W	[13] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>L. emiliae</i>		2n=66/NF=126	X	X	2°36'3.679"S	56°13'3.656"W	[14] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>L. emiliae</i>		-	X	X	2°36'3.679"S	56°13'3.656"W	[14] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>L. emiliae</i>		-	X	X	05°36'28.36"S	57°17'49.07"W	[15] BR: PA, Itaituba	Presente estudo
<i>M. hispidus</i>		2n=60/NF=116	X	X	02°11'26.3"S	55°58'27.2"W	[16] BR: PA, Juruti	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>M. hispidus</i>		2n=60/NF=116	X		02°11'26.3"S	55°58'27.2"W	[16] BR: PA, Juruti	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>M. hispidus</i>	L23379	-	X		4°51'S	65°16'W	[17] BR: AM, Coari	Da Silva e Patton (1993)
<i>M. hispidus</i>	L23366	-	X		8°40'S	72°47'W	[18] BR: AC, Porto Walter	Da Silva e Patton (1993)
<i>M. hispidus</i>	L23371	-	X		2°48'36.51"N	65°5'44.81"W	[19] VEN: Amazonas	Da Silva e Patton (1993)
<i>M. hispidus</i>	KF590696	-	X		2°18'27.00"S	78°6'50.39"W	[20] EQU: Morona Santiago	Upham et al. (2013)
<i>M. hispidus</i>	KU892788	-	X	X	2°02'03.2"N	56°07'57.9"W	[21] SUR: Sipaliwine	Fabre et al. (2016)

<i>M. hispidus</i>	KU892787	-	X	X	-	-	ND	Fabre et al. (2016)
<i>M. stimulax</i>		2n=60/NF=110	X	X	05°46'21"S	50°33'21"W	[22] BR: PA, Marabá	Malcher et al. (2021)
<i>M. stimulax</i>	L23389	-	X		3°39'S	59°22'W	[23] BR: AM, Altazes	Da Silva e Patton (1993)
<i>M. stimulax</i>	L23392	-	X		3°39'S	59°22'W	[23] BR: AM, Altazes	Da Silva e Patton (1993)
<i>M. stimulax</i>	KJ742667	-	X		-	-	ND	Upham e Petterson (2014)
<i>M. occultus</i>	L23382	-	X		4°51'S	65°16'W	[17] BR: AM, Coari	Da Silva e Patton (1993)
<i>L. emiliae</i>		2n=64♀/65♂/NF=124	X		02°34'45.7"S	56°28'14.4"W	[24] BR: AM, Parintins	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>L. emiliae</i>		2n=64♀/65♂/NF=124	X		02°34'45.7"S	56°28'14.4"W	[24] BR: AM, Parintins	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>L. emiliae</i>		2n=64♀/65♂/NF=124	X		02°11'26.3"S	55°58'27.2"W	[16] BR: PA, Juruti	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>L. emiliae</i>		2n=64♀/65♂/NF=124	X		02°11'26.3"S	55°58'27.2"W	[16] BR: PA, Juruti	Dias de Oliveira et al. (2019)
<i>L. emiliae</i>		-	X		2°29'28.5"S	55°10'08.5"W	[25] BR: PA, Santarém	Patterson e Velazco (2008)
<i>L. emiliae</i>		-	X	X	2°29'28.5"S	55°10'08.5"W	[25] BR: PA, Santarém	Fabre et al. (2016)
<i>L. emiliae</i>		-	X		2°30'15.22"S	54°57'16.96"W	[26] BR: PA, Santarém	Leite e Patton (2002)