

GERTRUDES CORÇÃO

Variabilidade Genética e Análise Filogenética em Roedores (Cricetidae) do Estado do Paraná

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Genética.

ORIENTADOR:
Lodércio Culpi

CURITIBA

1989

GERTRUDES CORÇÃO

VARIABILIDADE GENÉTICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM ROEDORES
(CRICETIDAE) DO ESTADO DO PARANÁ

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Genética.

Orientador:

Lodércio Culpi

CURITIBA

1989

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Lodércio Culpi, pela orientação deste trabalho.
- A Denise Machado Moreira, pelo auxílio no aprendizado das técnicas eletroforéticas.
- A estagiária Elizabeth Settim, pelo auxílio nas tipagens eletroforéticas.
- Ao Laboratório de Citogenética Animal da UFPR, pelo fornecimento dos dados citogenéticos.
- As alunas do Curso de Pós-Graduação em Zoologia da UFPR, Carmen Zotz e Cláudia M. Boeing, e ao professor Estefano Jablonnsky, da PUC, pela coleta dos roedores e fornecimento de dados taxonômicos.
- A SPVS (Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem) e ao Instituto Florestal do Paraná, também pela coleta dos roedores e fornecimento dos dados taxonômicos.
- Ao Sandro Bonatto, pelo inestimável auxílio na análise filogenética dos dados.
- Ao CNPq, à CAPES e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFPR, pela bolsa e pelos auxílios concedidos na elaboração deste projeto.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	v
	LISTA DE FIGURAS.....	vii
I	INTRODUÇÃO	
1.1	O uso da eletroforese na análise da variabilidade genética.....	1
1.2	Metodologias empregadas com dados eletroforéticos....	4
1.3	Variabilidade genética em populações naturais de roedores.....	8
1.4	Considerações gerais sobre cricetídeos sul-americanos	12
1.5	Objetivos.....	13
II	MATERIAL E MÉTODOS	
2.1	Caracterização da amostra.....	16
2.1.1	Informações sobre as espécies estudadas.....	16
	a)Akodon serrensis.....	16
	b)A. arviculoides.....	21
	c)A. aff. arviculoides.....	21
	d)Oxymycterus roberti e Oxymycterus sp.....	21
	e)Oryzomys delticola.....	22
	f)O. flavescens.....	23
	g)O. intermedius.....	23
2.2	Métodos de coleta.....	23
2.3	Sistemas estudados.....	24
2.3.1	Albumina - Alb.....	24
2.3.2	Hemoglobina - Hb.....	24
2.3.3	Transferrina - Trf.....	25

2.3.4	Isocitrato desidrogenase - Idh - E.C.1.1.1.42.....	25
2.3.5	Malato desidrogenase - Mdh - E.C.1.1.1.37.....	26
2.3.6	Fosfatase ácida - Acp - E.C.3.1.3.2.....	27
2.3.7	Superóxido dismutase - Sod - E.C.1.15.1.1.....	27
2.3.8	Leucine aminopeptidase - Lap - E.C.3.4.11.1.....	28
2.3.9	Fosfoglicose isomerase - Pgi - E.C.5.3.1.9.....	28
2.3.10	Glutamato oxaloacetato transaminase - Got - E.C.2.6.1.1.....	29
2.3.11	Fosfoglicodesidrogenase - Pgd - E.C.1.1.1.44.....	29
2.3.12	Glicose-6-fosfato desidrogenase - G6pd - E.C.1.1.1.44.	29
2.3.13	Fosfoglicomutase - Pgm - E.C.2.7.5.1.....	30
2.3.14	Esterase - Es - E.C.3.1.1.1.....	30
2.4	Métodos laboratoriais.....	31
2.4.1	Preparo do homogenado.....	31
2.4.2	Métodos eletroforéticos.....	31
2.4.3	Métodos de coloração.....	33
2.4.4	Análise da migração eletroforética.....	33
2.4.5	Métodos fotográficos.....	34
2.5	Procedimentos estatísticos.....	34
2.5.1	Análise da variabilidade genética da amostra.....	34
2.5.2	Análise filogenética.....	35
III	RESULTADOS	
3.1	Variabilidade genética da amostra.....	40
3.2	Análise filogenética.....	83
IV	DISCUSSÃO	
4.1	Variabilidade genética da amostra.....	107
4.2	Análise filogenética.....	112

4.2.1	Relações filogenéticas entre as espécies.....	112
4.2.2	Discussão dos diferentes métodos empregados.....	115
V	RESUMO E CONCLUSÕES.....	117
VI	SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	120
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
VIII	APÊNDICES.....	137

LISTAS DE TABELAS

Tabela	Pag
I.1	Variabilidade genética em cricetídeos norte-americanos 9
I.2	Variabilidade genética em cricetídeos sul-americanos 11
II.1	Caracterização dos animais coletados por tribo, gênero, espécie, local de coleta e sexo, no Estado do Paraná..... 18
II.2	Relação das espécies consideradas para o cálculo da heterozigosidade média por espécie (H)..... 36
III.1	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Alb, por espécie..... 41
III.2	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Trf, por espécie..... 43
III.3	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Hb, por espécie..... 46
III.4	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Es-10, por espécie..... 49
III.5	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Es-6, por espécie..... 51
III.6	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Pgd, por espécie..... 53
III.7	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Pgm-1, por espécie..... 56
III.8	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Pgm-2, por espécie..... 58
III.9	Distribuição dos fenótipos observados e frequências

	gênicas dos alelos do loco Pgm-3, por espécie.....	61
III.10	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Pgi, por espécie.....	63
III.11	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Got-1, por espécie.....	66
III.12	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Lap, por espécie.....	68
III.13	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Acp, por espécie.....	71
III.14	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Mdh-2, por espécie.....	74
III.15	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Idh-1, por espécie.....	76
III.16	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Sod, por espécie.....	79
III.17	Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco G6pd, por espécie.....	81
III.18	Valores de heterozigosidade média (\bar{H}), e proporção de locos polimórficos (P), por espécie, para as amostras de tamanho superior ou igual a 5.....	84
III.19	Matriz de dados GEGE.DAT.....	85
III.20	Matriz de dados ELETRO.DAT.....	93
III.21	Matriz de dados POA.DAT.....	95

LISTAS DE FIGURAS

Figura		Pag
I.1	Gráfico de área de frequência dos principais grupos da Ordem Rodentia, em relação aos outros mamíferos da América do Sul.....	14
I.2	Representação gráfica da porcentagem das espécies de cada tribo dos cricetídeos sul-americanos.....	15
II.1	Locais de coleta (municípios) das espécies estudadas no Estado do Paraná.....	17
III.1A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Alb.....	42
III.1B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Alb ^a , Alb ^b e Alb ^c , da esquerda para a direita, respectivamente	42
III.2A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Trf.....	44
III.2B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Trf ^a , Trf ^b e Trf ^{ab} da esquerda para a direita, respectivamente.....	44
III.3A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Hb.....	47
III.3B	Fotografia de um gel, mostrando os fenótipos Hb ^a , Hb ^b e Hb ^c da esquerda para a direita, respectivamente.....	47
III.4	Representação esquemática dos alelos observados no loco Es-1Ø.....	50

III.5A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Es-6.....	52
III.5B	Fotografia de um gel, mostrando entre os eletromorfos de migração mais rápida os fenótipos Es-6 ^a , Es-6 ^b , Es-6 ^c , da esquerda para a direita, respectivamente ..	52
III.6A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgd.....	54
III.6B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgd ^a , Pgd ^b , Pgd ^c e Pgd ^d da esquerda para a direita, respectivamente.....	54
III.7A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-1.....	57
III.7B	Fotografia de um gel, mostrando os fenótipos Pgm-1 ^a , Pgm-1 ^b , Pgm-1 ^c , da esquerda para a direita, respectivamente.....	57
III.8A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-2.....	59
III.8B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgm-2 ^a , Pgm-2 ^b , Pgm-2 ^c da esquerda para a direita, respectivamente, entre os eletromorfos de migração mais rápida.....	59
III.9A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-3.....	62
III.9B	Fotografia de um gel mostrando entre os eletromorfos de migração mais catódica, os fenótipos Pgm-3 ^a , Pgm-3 ^b e Pgm-3 ^c , da esquerda para a direita, respectivamente	62
III.10A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgi.....	64

III.10B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgi ^a , Pgi ^b , Pgi ^c e Pgi ^d , da esquerda para a direita respectivamente.....	64
III.11A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Got-1.....	67
III.11B	Fotografia de um gel mostrando na parte superior os fenótipos Got-1 ^a , Got-1 ^b e Got-1 ^c , da esquerda para a direita, respectivamente. E na inferior, o fenótipo Got-2 ^a	67
III.12A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Lap.....	69
III.12B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Lap ^a , Lap ^b e Lap ^c da esquerda para a direita, respectivamente...	69
III.13	Representação esquemática dos alelos observados no loco Acp.....	72
III.14A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Mdh-2.....	75
III.14B	Fotografia de um gel mostrando na parte superior o fenótipo Mdh-1 ^a , e na parte inferior, os fenótipos Mdh-2 ^a e Mdh-2 ^c da esquerda para a direita, respecti- vamente.....	75
III.15A	Representação esquemática dos alelos observados no loco Idh-1.....	77
III.15B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Idh-1 ^a , Idh-1 ^b e Idh-1 ^c , da esquerda para a direita, respecti- vamente.....	77
III.16	Representação esquemática dos alelos observados no loco Sod.....	80
III.17A	Representação esquemática dos alelos observados no loco G6pd.....	82

III.17B	Fotografia de um gel mostrando os fenótipos ^{ab} G6pd , ^b G6pd , ^c G6pd e ^d G6pd da esquerda para a direita, respectivamente.....	82
III.18	Cladograma de consenso GEGE 2.OUT, resultante de dados ordenados.....	86
III.19	Cladograma GEGE 41.OUT, resultante de ordenamento simples.....	86
III.20	Cladograma GEGE 4.OUT, resultante de ordenamento complexo.....	88
III.21	Cladograma GEGE 51.OUT, resultante de ordenamento simples.....	88
III.22	Cladograma GEGE 5.OUT, resultante de ordenamento complexo.....	89
III.23	Cladograma GEGE 21.OUT, resultante de dados não ordenados.....	89
III.24	Cladograma GEGE 6.OUT, resultante de ordenamento complexo.....	90
III.25	Cladograma GEGE 61.OUT, cladograma de consenso, resultante de ordenamento simples.....	90
III.26	Cladograma GEGE 71.OUT, cladograma de consenso resultante de ordenamento simples.....	90
III.27	Cladograma GEGE 7.OUT, resultante de ordenamento complexo.....	91
III.28	Cladograma de consenso geral, da matriz GEGE.DAT.....	91
III.29	Cladograma ELETRO 1.1 OUT, resultante de dados ordenados.....	94
III.30	Cladograma ELETRO 2.OUT, resultante de ordenamento complexo.....	94
III.31	Cladograma ELETRO 3.OUT, resultante tanto de	

	ordenamento simples como de ordenamento complexo.....	94
III.32	Fenograma obtido através da distância genética de Nei (Nei, 1972), a escala indica a distância genética entre as espécies.....	100
III.33	Fenograma obtido através da distância genética de Nei (Nei, 1978), a escala indica a distância genética entre as espécies.....	101
III.34	Fenograma obtido através da distância genética de Rogers (Rogers, 1972), a escala indica a distância genética entre as espécies.....	102
III.35	Fenograma obtido através da distância genética de Rogers modificada (Wright, 1978 citado por Rogers, 1986), a escala indica a distância genética entre as espécies.....	103
III.36	Cladograma obtido pelo método de Wagner com distância utilizando-se a distância genética de Rogers (Rogers, 1972), a escala indica distância das OTU da raiz.....	104
III.37	Cladograma obtido pelo método de Wagner com distância utilizando-se a distância de Rogers modificada (Wright, 1978 citado por Rogers, 1986), a escala indica distância das OTU da raiz.....	105

INTRODUÇÃO

1.1 O USO DA ELETROFORESE NA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A variabilidade genética em populações, foi primeiramente observada por Landsteiner em 1900, ao descobrir o primeiro polimorfismo humano, o grupo sanguíneo ABO.

Segundo Ayala (1983), a variação genética é o parâmetro fundamental no processo evolucionário, pois o potencial evolucionário está intimamente ligado à variação gênica de uma determinada população num determinado tempo.

Com o desenvolvimento da técnica da eletroforese em gel para a detecção da variabilidade proteica (Smithies, 1955) e de métodos de coloração específica, vários locos proteicos e enzimáticos puderam ser detectados e estudados. Assim, a variabilidade genética até então verificada somente por mutações recessivas, pode ser melhor estudada.

Em 1960, muitos sistemas enzimáticos e proteicos haviam sido descobertos e descritos em detalhes. Devido à necessidade de se demonstrar se tais sistemas até então estudados representavam uma variação atípica das enzimas e proteínas ou se eram exemplos de um fenômeno já estabelecido nas populações, realizaram-se estudos em populações naturais de *Drosophila* (Hubby & Lewontin (1966) e Lewontin & Hubby (1966)) e humanas, Harris (1966). Estes foram os primeiros trabalhos a introduzir a técnica da eletroforese em gel na genética de populações. O grau de variação gênica poderia ser estimada pelo número de locos

polimórficos na população e pela heterozigosidade média por loco (Lewontin & Hubby, 1966).

Em *Drosophila* constatou-se que 39% dos locos estudados eram polimórficos e a heterozigosidade média igual a 12% (Lewontin & Hubby, 1966). Em populações humanas, 20% dos locos eram polimórficos com uma heterozigosidade média de 6.7% (Harris & Hopkinson, 1972).

Selander (1976), propôs que muitas populações naturais são polimórficas em 25 a 50% dos seus locos, e indivíduos destas apresentam heterozigosidade média de 5% a 15%. Em roedores, estes valores foram iguais a 20% e 5,4%, respectivamente.

A mutação é a fonte de toda esta variabilidade observada em populações naturais, podendo ser mantida ou alterada pela seleção natural, pela deriva genética e pela migração entre populações com frequências genicas diferentes.

Possíveis explicações para esta extraordinária variabilidade protéica originaram duas hipóteses, a seccionista e a neutralista. A primeira propõe que o polimorfismo observado em populações naturais é consequência da ação da seleção natural sobre novos mutantes constantemente gerados numa taxa muito baixa. A hipótese neutralista propõe que os polimorfismos são neutros, ou quase neutros, sendo sua frequência e distribuição consequência da deriva genética.

Hubby & Lewontin (1966) propuseram que para uma técnica fornecer informações precisas sobre heterozigosidade média por loco, deve satisfazer os seguintes requisitos:

- 1 - As diferenças fenotípicas causadas por substituições num único loco, devem ser detectadas num único indivíduo.
- 2 - A distinção entre variações de um loco e as variações de outro loco.
- 3 - As variações alélicas devem ser diferenciadas de outras variações alélicas.
- 4 - Os locos estudados devem ser uma amostra ao acaso do genoma.

A técnica da eletroforese em gel satisfaz, na maioria das vezes, os requisitos acima. Logo, é o método mais comumente empregado na análise da estrutura gênica de populações (Gottlieb, 1971).

Os resultados dos estudos eletroforéticos permitem uma série de análises como:

- 1 - Estimar quantitativamente a variabilidade genética de uma população ou de uma espécie.
- 2 - Estudar padrões geográficos ou temporais da variabilidade genética, que podem ser de grande importância para o entendimento dos processos evolucionários.
- 3 - Determinar graus de divergência genética entre diferentes níveis taxonômicos.

Em consequência disto, as informações obtidas através dos dados eletroforéticos fornecem uma importante contribuição à sistemática.

Avise (1974a) propõe que os dados eletroforéticos apresentam vantagens e desvantagens em relação à sistemática.

VANTAGENS : objetividade na determinação dos alelos e suas frequências, precisão, possibilidade de ponderação quando esta for necessária nas relações filogenéticas, inferência de

homologias à partir de analogias, verificação de similaridades relativas entre diferentes organismos.

DESVANTAGENS : é restrita a organismos vivos, apresenta dificuldades nas interpretações devido à sobreposição de bandas, não detecta substituições de aminoácidos que não alterem a carga elétrica, analisa somente proteínas hidrossolúveis, não fornece informações sobre o número de aminoácidos diferentes entre 2 eletromorfos.

Segundo Gorman & Renzi (1979), em estudos sistemáticos deve-se dar uma maior importância ao número de locos estudados do que ao tamanho da amostra. As estimativas de heterozigosidade e distância genética são mais severamente afetadas pelo número de locos estudados, o qual deve ser em torno de 20 ou mais.

1.2 METODOLOGIAS EMPREGADAS COM DADOS ELETROFORETICOS

O uso da eletroforese em gel para análise genética de populações naturais de roedores foi introduzido por volta de 1960. No início, foram descritos alguns padrões eletroforéticos para proteínas séricas e enzimas (Cohen, 1960; Dolezalová & Brada, 1968); Rasmussen e cols., 1968 e DeLorenzo & Ruddle, 1969).

Os estudos em populações iniciaram-se com estimativas do grau de polimorfismo, heterozigosidade média e variações geográficas dos padrões eletroforéticos (Selander & Yang, 1969; Selander e cols., 1971).

Posteriormente, foram adicionados às estimativas anteriormente citadas (heterozigosidade e proporção de locos

polimórficos) os coeficientes de similaridade e distância genética. Estes, com base nas frequências alélicas de um grande número de locos, comparam diferentes populações de uma mesma espécie ou espécies diferentes. Dentre estes, os mais encontrados entre estudos com roedores foram a distância genética de Nei (1972) e a de Rogers (1972). A primeira é dita uma distância não métrica, e é utilizada para medir o número de substituições eletroforeticamente detectadas por loco, as quais vem sendo acumuladas desde que as duas populações divergiram de um ancestral comum. A segunda é uma estimativa da distância geométrica média entre as frequências alélicas, baseia-se no Teorema de Pitágoras e os pontos que representam as OTUs devem estar dispostos num espaço euclédiano adequado, logo é dita uma distância métrica.

Estas estimativas (grau de polimorfismo, heterozigosidade média, variação geográfica, coeficiente de similaridade e distância genética) permitiram uma série de análises em populações naturais de roedores (Johnson e cols., 1972; Avise e cols., 1974a e 1974b; Kilpatrick & Zimmerman, 1976b; Patton e cols., 1981 e Hafner, 1982). Porém, estes estudos foram realizados visando uma análise estritamente fenética, não estabelecendo nenhuma relação de ancestralidade entre as espécies estudadas.

Com o desenvolvimento de novas técnicas de análise de dados, foi observado que os dados eletroforéticos também poderia ser utilizados na análise filogenética, através da qual partindo de relações filogenéticas estabelecidas entre os organismos, chega-se às classificações.

O método filogenético foi introduzido nos estudos sistemáticos por volta de 1950, surgindo então, a sistemática filogenética. Este método foi desenvolvido por Willi Hennig e baseia-se no fato de que o relacionamento filogenético, ou genealógico, entre os organismos, é revelado pela congruência entre os grupos justificados pelos caracteres derivados, as sinapomorfias. O cladograma seria uma solução mais compatível com os dados, isto é, a mais parcimoniosa (Hennig, 1966, citado por Wiley, 1981).

Wagner, em 1948 (citado por Wiley, 1981) sugeriu um método denominado parcimônia de Wagner, o qual foi utilizado posteriormente por Kluge & Farris (1969) na elaboração de um algoritmo que iria derivar a árvore mais parcimoniosa. Tal método considera como a melhor estimativa de relações filogenéticas entre membros de um grupo monofilético a que requer o menor número de transformações de caracteres (Wiley, 1981).

Farris (1972) propôs um novo método no qual se poderia utilizar a parcimônia de Wagner e dados de matrizes de distância. Este método pode ser utilizado com dados eletroforéticos transformando-os em matrizes de distância, com a distância de Nei (1972) e a de Rogers (1972). Posteriormente novos métodos de distância foram propostos (Rogers, 1984), porém, os dois primeiros são os mais utilizados.

Uma outra maneira de se utilizarem os dados eletroforéticos foi proposta por Mickevich & Mitter (1981 e 1983), a qual transforma os dados em caracteres quantitativos do tipo caráter/estado. Dentro desta, duas abordagens podem ser dadas, na primeira o alelo é o caráter, e os estados seriam presença ou

ausência destes. Na segunda, o loco seria o caráter, e o estado a combinação de alelos para aquele loco (Buth, 1984). A última abordagem foi considerada por Mickevich & Mitter (1981), como a mais válida para procedimentos filogenéticos.

Utilizando-se tais métodos filogenéticos, outro problema surgiu: o ordenamento dos dados. Como é difícil inferir sobre hipóteses que especificam qual estado de um caráter deve evoluir diretamente para quais outros estados, Mickevich & Mitter (1983) propuseram o modelo "minimum allele turnover" e o sistemático para solucionar este problema de ordenamento. O primeiro é mais adequado para um ordenamento inicial; neste, a relação de combinações de alelos é determinada pelo número de ganhos mais o número de perdas de alelos necessárias na transformação de um alelo em outro. Séries de transformações são feitas de uma tal maneira que minimizam o total de mudanças necessárias. O método sistemático resolve séries de transformações simultaneamente com o cladograma. Após a construção deste, com caracteres não ordenados, aplica-se o método de análise de séries de transformações (TSA), sugerido por Mickevich (1982), no qual o cladograma é que irá definir as seqüências de mudanças do estado de um caráter, ou seja, as séries de transformações.

Segundo Buth (1984), dados eletroforéticos são de grande valor para a sistemática, porém, apresentam várias limitações, dependendo do procedimento de análise. Como na análise filogenética, onde o ordenamento dos dados eletroforéticos é problemático, por ser vulnerável a homoplasias

Outra metodologia utilizada para medir a variabilidade genética em populações naturais é a análise de DNA. Dentre os métodos mais utilizados, pode-se citar o seqüenciamento de DNA, hibridização de DNA e análise direta de DNA nuclear e mitocondrial através de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. Ashley & Wills (1987) utilizaram polimorfismo de DNAm_t para analisar a variabilidade de uma população insular de *Peromyscus maniculatus* e observaram que esta análise é uma ferramenta útil para sugerir padrões de colonização e discernir histórias evolucionárias. Honeycutt e cols., (1987), utilizando DNAm_t para estabelecer relações filogenéticas entre espécies da Família Bathyergidae, comprovaram a utilidade desta metodologia em análises filogenéticas.

1.3 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE ROEDORES

O estudo da variabilidade genética em populações naturais de cricetideos iniciou-se com exemplares norte-americanos (Tabela I.1). Na América do Sul, foram realizados poucos estudos desta natureza, em alguns gêneros da família Cricetidae *Calomys* (Blanco & Gardenal, 1977; Gardenal e cols., 1980; Gardenal & Blanco, 1985), *Phyllotis* (Spotorno e Walker, 1983), *Akodon* (Apfelbaum & Blanco, 1984 e 1985; Hamel, 1985; Rieger e cols., 1988), *Oryzomys* (Hamel, 1985; Santos e cols., 1986), *Oxymycterus*, *Deltamys*, *Scapteromys* e *Nectomys* (Hamel, 1985) (Tabela I.2).

No Brasil, estudos de análise da variabilidade genética através da eletroforese em gel, em cricetideos, foram realizados somente em alguns gêneros , *Akodon* (Hamel, 1985;

TABELA I.1 - Variabilidade genética em cricetídeos norte-americanos

Gênero/ Espécie	Número de populações	Número de animais	Número de locos	P%	H _i	Referência
<i>Peromyscus attwateri</i>	01	04	20	5.0	12.0	2
<i>P. attwateri</i>	08	139	17	6.0	0.0-2.0	7
<i>P. boylii</i>	06	212	20	40.0	2.0	2
<i>P. boylii</i>	15	135	17	12.0	1.5	7
<i>P. californicus</i>	04	62	23	13.0-26.0	2.9-10.6	1
<i>P. californicus</i>	13	200	31	55.0	2.7-12.4	14
<i>P. caniceps</i>	01	03	23	4.3	1.1	1
<i>P. conanche</i>	02	21	25	30.0	7.0	6
<i>P. dickeyi</i>	01	10	23	2.0	0.0	1
<i>P. difficilis griseus</i>	02	14	25	22.0	8.0	6
<i>P. difficilis nasutus</i>	03	27	25	22.0	4.0	6
<i>P. difficilis</i>	02	20	23	0.0-4.0	2.7	3
<i>P. eremicus</i>	45	473	23	4.3-26.1	0.4-7.0	3
<i>P. eva</i>	01	06	23	3.0	0.0	3
<i>P. floridanus</i>	09	71	39	21.4	5.3	15
<i>P. gossypinus</i>	11	47	23	21.0	2.9	10
<i>P. gossypinus</i>	08	100	25	32.0	4.8	12
<i>P. guardia</i>	01	06	23	4.3	1.4	1
<i>P. interparientalis</i>	01	10	23	0.0	0.0	1
<i>P. leucopus</i>	06	116	20	32.1	7.5	4
<i>P. leucopus</i>	31	376	23	64.0	4.3	10
<i>P. leucopus</i>	09	-	23	-	13.0	9

TABELA I.1 - continuação

<i>Peromyscus leucopus</i>	21	394	25	56.0	5.1	12
<i>P. maniculatus</i>	18	716	23	10.0-28.6	9.1	3
<i>P. maniculatus</i>	12	376	14	57.0	3.0	11
<i>P. maniculatus</i>	09	190	23	41.0	1.6	9
<i>P. melanotis</i>	05	20	23	0.0-9.5	2.6	3
<i>P. merriani</i>	02	8	23	4.3	1.6	1
<i>P. pectoralis</i>	21	109	27	76.0	5.0	8
<i>P. polionotus</i>	05	-	39	29.4	8.2	15
<i>P. polionotus</i>	30	745	32	19.0	5.0	13
<i>P. sejugis</i>	02	31	23	4.3	1.7	1
<i>P. stephanis</i>	01	11	23	0.0	0.0	1
<i>P. truei</i>	02	17	25	22.0	4.0	6
<i>P. truei</i>	04	65	23	4.8-9.5	3.8	3
<i>Sigmodon arizonae</i>	53	50	23	58.0	2.9	5
<i>S. hispidus</i>	231	202	23	70.0	2.1	5

REFERENCIAS

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 - Avise e cols. (1974b) | 9 - Loudenslager (1978) |
| 2 - Avise e cols. (1974c) | 10 - Price & Kennedy (1980) |
| 3 - Avise e cols. (1979) | 11 - Price & Kennedy (1981) |
| 4 - Browne (1977) | 12 - Robbins e cols. (1985) |
| 5 - Johnson e cols. (1972) | 13 - Selander e cols. (1971) |
| 6 - Johnson & Packard (1974) | 14 - Smith (1979) |
| 7 - Kilpatrick & Zimmerman (1975) | 15 - Smith e cols. (1973) |
| 8 - Kilpatrick & Zimmerman (1976b) | 16 - Zimmerman e cols. (1975) |

TABELA 1.2 - Variabilidade genética em cricetídeos sul-americanos

Genero / Espécie	Número de populações	Número de animais	Número de locos	P%	H%	Referências
<i>Akodon aff. arviculoides</i>	04	11	16	19.0	2.0	4
<i>A. azarae</i>	04	16	16	31.0	5.0	4
<i>A. azarae</i>	03	43	18	17.0-30.0	10.0-12.0	2
<i>A. dolores</i>	06	193	19	28.0-40.0	14.0-19.0	2
<i>A. molinae</i>	01	76	23	29.0	13.0	1
<i>A. serrensis</i>	06	58	16	44.0	6.0	4
<i>Deltamys kempi</i>	02	19	16	39.0	6.0	4
<i>Oxymycterus rufus</i>	03	12	16	25.0	4.0	4
<i>Oryzomys delticola</i>	08	35	16	31.0	4.0	4
<i>O. flavescens</i>	05	14	16	25.0	6.0	4
<i>Scapteromys tumidus</i>	04	17	16	38.0	10.0	4
<i>Scapteromys sp</i>	03	26	16	25.0	6.0	4
<i>Calomys musculus</i>	01	52	22	72.7	19.0	3

REFERÊNCIAS

- 1 - Apfelbaum & Blanco (1984)
- 2 - Apfelbaum & Blanco (1985)
- 3 - Gardanal & Blanco (1985)
- 4 - Hanel (1985)

Rieger e cols., 1988), *Oryzomys* (Hamel, 1985; Santos e cols., 1986), *Oxymycterus*, *Deltamys*, *Scapteromys* e *Nectomys* (Hamel, 1985). Destes somente o trabalho de Hamel (1985), empregou uma metodologia filogenética para estabelecer relações de ancestralidade entre as espécies estudadas.

1.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS CRICETÍDEOS SUL-AMERICANOS

Wood, em 1955 (citado por Vaughan, 1972), baseando-se em diferenças na estrutura do crânio e em músculos masséter, dividiu a Ordem Rodentia em três subordens principais: Sciuromorpha, Myomorpha e Hystricomorpha, sendo que os Hystricomorpha sul-americanos foram designados Caviomorpha (Hershkovitz, 1972).

Os roedores compreendem 43% das espécies de mamíferos presentes na América do Sul (Wood em 1955, citado por Vaughan, 1972 e Reig, 1981 e 1984). O grupo Myomorpha compreende 21.9% deste total e os Caviomorpha, 19.1%. O primeiro grupo compreende a maior família, Cricetidae, que agrupa 55% das espécies de roedores sul-americanos, e 22% das espécies de mamíferos deste continente (Figura I.1). Dentro dos cricetídeos, a subfamília Sigmodontinae é a maior, agrupando quase todos os roedores sul-americanos. Está dividida em 7 tribos, Oryzomyini, Ichthyomyini, Akodontini, Scapteromyini, Phyllotini, Wiedomyini e Sigmodontini (Reig, 1981, 1984 e 1987), e entre estas, Oryzomyini compreende a maior porcentagem das espécies de roedores sul-americanos (Figura I.2).

A origem dos roedores sul-americanos ainda é discutida. Reig (1981 e 1984), sugeriu a hipótese de que os cricetídeos sul-americanos originaram-se a partir dos

norte-americanos. E a diversidade deste grupo teria ocorrido em diferentes áreas da Cordilheira dos Andes, em princípios do Mioceno. A tribo Oryzomyini é a mais primitiva e os Akodontini diferenciaram-se mais tarde nas regiões mais centrais dos Andes. Hershkovitz (1972), sugere que os roedores americanos tenham vindo da África para o continente americano.

1.3 OBJETIVOS

Verificando-se a escassez de trabalhos nesta área no Brasil e a completa ausência deste tipo de análise no Estado do Paraná, decidiu-se elaborar um projeto, o qual visa um maior conhecimento dos roedores da Família Cricetidae em nosso Estado.

Pretende-se determinar padrões eletroforéticos de 14 sistemas protéicos, codificados por 19 locos em roedores da Família Cricetidae, com os objetivos de:

- 1 - Analisar a variabilidade genética (protéica e enzimática) através de alterações na migração eletroforética.
- 2 - Estimar as freqüências gênicas dos alelos estudados e a partir destas, estimar o grau de polimorfismo e heterozigosidade média por espécie.
- 3 - Tentar estabelecer relações filogenéticas intra e interespecíficas entre as espécies estudadas.
- 4 - Comparar os resultados dos vários métodos filogenéticos empregados, verificando como se comportam os dados eletroforéticos em relação a este tipo de análise.

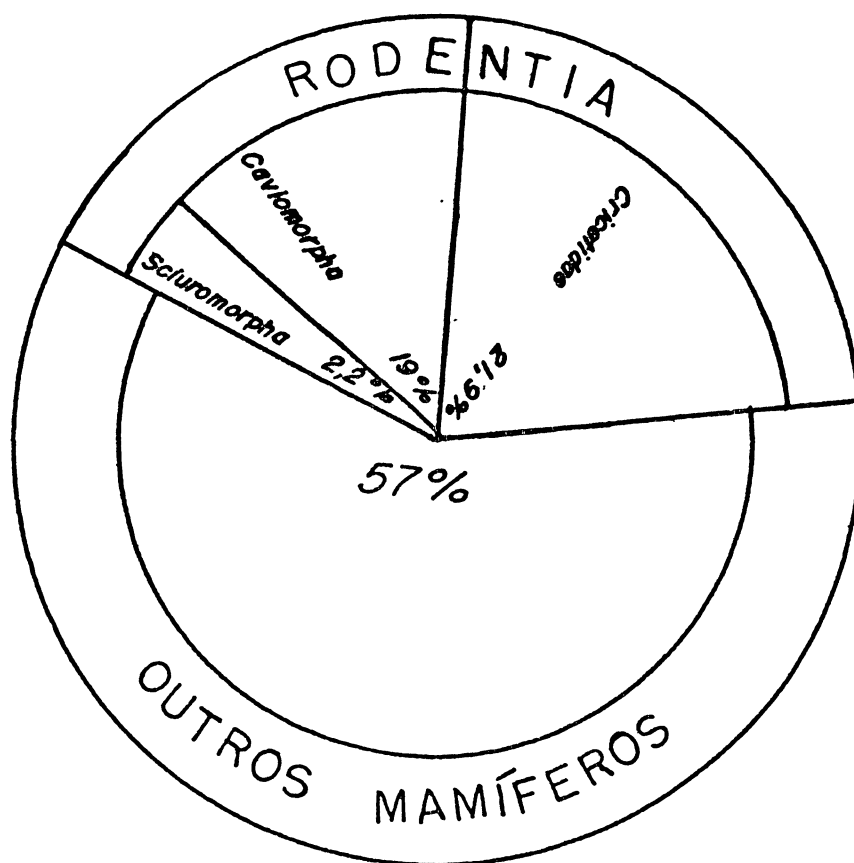


FIGURA I.1 - Gráfico de área da frequência dos principais grupos da ordem Rodentia, em relação aos outros mamíferos da América do Sul (Tirado de Reig, 1984, com modificações).

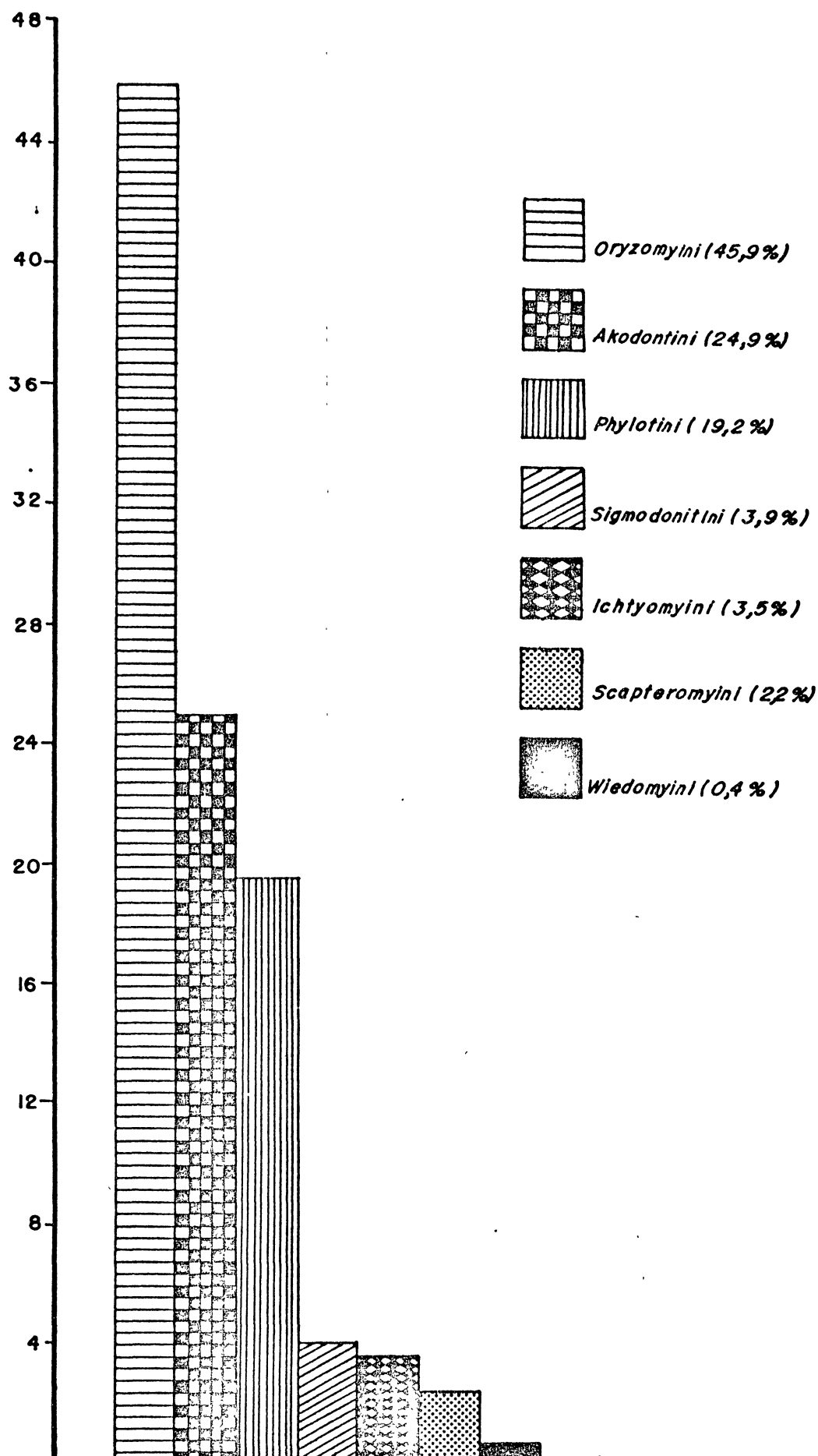


FIGURA I.2 - Representação gráfica da porcentagem das espécies de cada tribo dos cricetídeos sul-americanos.

II - MATERIAL E METODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram tipados 138 roedores distribuídos em 8 espécies e três gêneros pertencentes a duas tribos da Família Cricetidae. Os animais foram coletados em 9 locais situados em 8 municípios distintos do Estado do Paraná (Figura II.1). A relação dos locais de coleta e a caracterização dos animais por tribo, gênero, espécie, sexo e número de exemplares coletados está na Tabela II.1.

A identificação dos animais analisados foi baseada em dados morfológicos, cranianos e citogenéticos. Toda a amostra foi cariotipada no Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética da UFPR, sendo utilizado na citogenética o número de cromossomos da espécie ($2n$) e o número de braços (NA).

2.1.1 Informações sobre as espécies estudadas

a) *Akodon serrensis* ($2n=44$, $NA=44$; Sbalqueiro e cols., 1986)

Conhecido vulgarmente como rato oliváceo do Brasil (Cabrera & Yepes, 1960), apresenta superfície dorsal olivácea e superfície ventral de coloração ocrácea. A cauda apresenta comprimento quase igual ao do corpo (Zotz, 1985). São animais terrestres, preferencialmente herbívoros, preferindo locais de vegetação arbustiva e rasteira de solos mais secos. Distribuem-se no Sudeste e sul do Brasil (Sbalqueiro & cols., 1985).

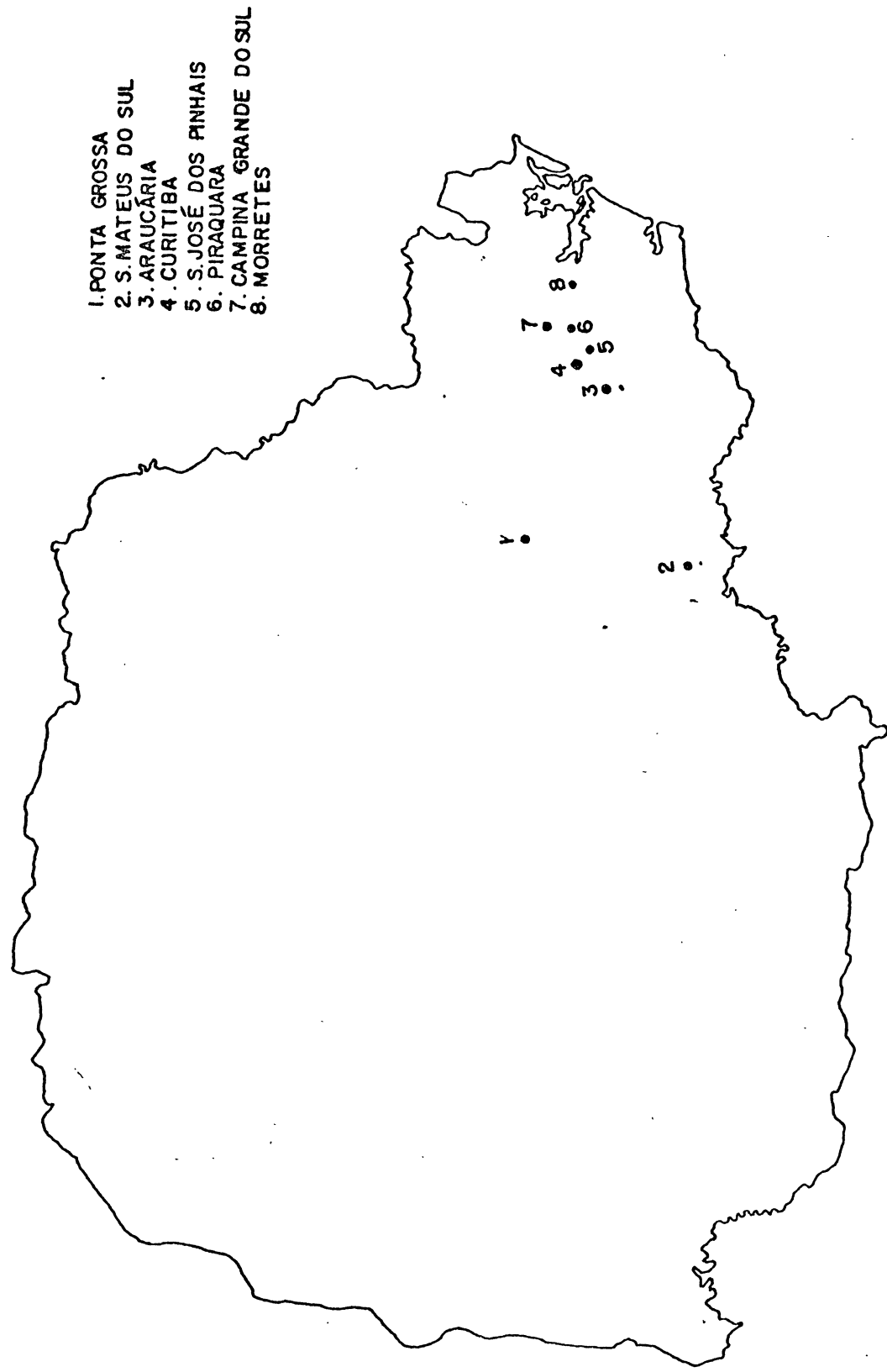


FIGURA II.1 - Locais de coleta (municípios) das espécies estudadas no Estado do Paraná

TABELA II.1 - Caracterização dos animais coletados por tribo, gênero, espécie, local de coleta e sexo, no Estado do Paraná.

Tribo/Espécie	Local de coleta (Município)	Número de animais coletados			Total
		Machos	Fêmeas	N. ident.	
Akodontini					
Akodon serrensis	Tomás Coelho (Araucária)	08	05	-	13
	Estação Experimental do Canguiri - E.E.C. do Setor de Ciências Agrárias UFPR (Piraquara)	12	08	06	26
	Setor de Ciências Biológicas (S.C.B.) - UFPR (Curitiba)	03	07	02	12
	São Mateus do Sul	01	-	-	01
	Campina Grande do Sul	01	02	-	03
Total					55
A. arviculoides	Parque do Marumbi (Morretes)	06	02	-	08
Total					08

TABELA II.1 - continuação

A. aff. arviculoides	Hidrelétrica Guaricana (São José dos Pinhais)	02	03	-	05
	Parque Marumbi (Morretes)	01	01	-	02
	São Mateus do Sul	04	02	-	06

Total					13

Oxymycterus roberti	Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR (Piraquara)	08	07	-	15

Total					15

Oxymycterus sp	Vila Velha (Ponta Grossa)	01	02	-	03
	Hidrelétrica Guaricana (São José dos Pinhais)	-	01	-	01
	São Mateus do Sul	-	01	-	01
	Parque Marumbi (Morretes)	-	01	-	01

Total					06

TABELA II.1 - continuação

Oryzomyini

Oryzomys delticola	Tomás Coelho (Araucária)	06	-	-	06
	Estação Experimental do Canguiri - Setor de Ciên- cias Agrárias - UFPR - E.E.C. (Piraquara)	02	02	01	05
	Setor de Ciências Bioló- gicas - S.C.B. - UFPR (Curitiba)	-	01	-	01
	São Mateus do Sul	02	02	-	04
	Parque Marumbi (Morretes)	-	02	-	02

Total					18

O. flavescens	Estação Experimental do Canguiri - Setor de Ciên- cias Agrárias - UFPR - E.E.C. (Piraquara)	01	05	-	06
	Vila Velha (Ponta Grossa)	03	02	-	05
	Setor de Ciências Bioló- gicas - S.C.B. - UFPR (Curitiba)	01	02	-	03

Total					14

O. intermedius	Hidrelétrica Guaricana (São José dos Pinhais)	03	01	-	04
	Parque Marumbi (Morretes)	04	01	-	05

Total					09

c) *A. arviculoides* ($2n=14,15$, $NA=18,19/21,23$; Bossle, comunicação pessoal, 1988).

Animais de coloração olivácea na superfície dorsal e de superfície ventral acinzentada. Habitam galerias naturalmente constituídas sob camada de folhas em decomposição. Podem ser encontrados em matas, capoeiras, capoeirões e também em terrenos de cultura de feijão ou milho.

Segundo Alho (1982), distribuem-se nas regiões nordeste, centro oeste, sudeste e sul do Brasil.

c) *A. aff. arviculoides* ($2n=24,25$; $NA=42$; Bossle, comunicação pessoal, 1988).

No presente trabalho assumiu-se que os exemplares do gênero *Akodon* com $2n=24,25$ coletados no Estado do Paraná, fossem denominados *A. aff. arviculoides* (Sbalqueiro e cols., 1987) os quais são cariotipicamente semelhantes ao *Akodon* sp (Kasahara & Yonenaga-Yassuda, 1982) coletado no Estado de São Paulo e ao *A. cursor* (Bueno e cols., 1987) coletado no Estado de Santa Catarina. Exemplares desta espécie também foram coletados no Estado do Rio Grande do Sul (Hamel, 1985 e Rieger e cols., 1988).

d) *Oxymycterus roberti* e *Oxymycterus* sp ($2n=54$, $NA=64$, Sbalqueiro e cols., 1986)

Neste trabalho, somente os exemplares do gênero *Oxymycterus* coletados no município de Piraquara, no Estado do Paraná, foram taxonomicamente classificados como *Oxymycterus roberti* (Zotz, 1985). e os outros exemplares, cuja identificação não foi possível, foram agrupados sob a denominação de *Oxymycterus* sp. Todos apresentavam $2n=54$, não sendo possível sua

distinção a nível citogenético.

Segundo Moojen (1952), o gênero *Oxymoterus* é uma forma modificada para hábitos fossoriais, e a característica que mais o diferencia dos demais gêneros é a presença do focinho longo.

Oxymycterus roberti possui coloração dorsal castanho escuro, sendo que esta se torna mais amarelada na região anterior e os lados do corpo são mais claros que o dorso. A coloração ventral é amarelo ocre, com a região do mento mais clara.

Exemplares coletados no município de Piraquara no Estado do Paraná, demonstraram preferência por locais de solo úmido pouco alagado com vegetação arbustiva, sendo este o primeiro registro da espécie no Paraná (Zotz, 1985). No Brasil, distribuem-se na Região Centro-Oeste e Sudeste (Alho, 1982).

e) *Oryzomys delticola* ($2n=62$, $NA=80,82$; Sbalqueiro e cols., 1986)

Vulgarmente conhecido como rato arbóreo, apresenta coloração pardo escura alaranjada e ventral branca acinzentada. Os lados do corpo apresentam coloração mais forte que o dorso, sendo que a separação entre o dorso e o ventre está bem definida. Possui cauda maior que o comprimento do corpo (Zotz, 1985).

Encontrados em florestas subtropicais com solo de vegetação escassa. Os exemplares coletados no município de Piraquara, habitavam ambientes secos ou úmidos, existindo porém uma preferência por locais muito alagados (Zotz, 1985). Distribuem-se desde o Nordeste brasileiro até o Paraná.

Os exemplares do gênero *Oryzomys* com $2n=62$, do presente estudo, foram denominados *Oryzomys delticola*, porém

segundo Langguth (comunicação pessoal, 1987), o nome correto é *O. nigripes*, por antiguidade.

f) *Oryzomys flavescens* ($2n=64,66$, $NA=66,68$; Sbalqueiro e cols., 1986)

Também conhecido como camundongo do mato (Silva, 1984), apresenta coloração dorsal marron amarelada, intercalada por pêlos pretos e coloração ventral branco amarelada.

São animais de hábitos noturnos e arborícolas, e constroem ninhos em pequenas covas. Podem ser encontrados em lavouras de arroz, pois adaptam-se às condições ambientais artificiais deste tipo de cultura. São preferencialmente herbívoros.

Os exemplares coletados no Paraná mostraram preferência por locais mais secos, (Zotz, 1985). Distribuem-se no Norte da Argentina e no Uruguai (Carvalho, 1983) e são comuns no Sul do Brasil (Vieira, 1953; Alho, 1982).

g) *Oryzomys intermedius* ($2n=80$, $NA=86$; Sbalqueiro e cols., 1986)

Segundo Moojen (1952), são de coloração bruno arruivado, tracejado de preto na linha dorsal e coloração ventral branco nítida. Apresentam hábitos noturnos e terrestres.

Podem ser encontrados nas matas litorâneas desde o Sul do Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul.

2.2 MÉTODOS DE COLETA

Os roedores foram capturados durante o período de 1983 e 1987. As armadilhas do tipo gaiola foram distribuídas nas

áreas delimitadas para coleta, utilizando-se como iscas principalmente rodelas de milho seco.

Após a coleta, os animais foram trazidos para o laboratório e sacrificados por inalação de éter sulfúrico, e tiveram retirados os órgãos necessários (coração, fígado e os rins), o músculo e o sangue. Os órgãos e o músculo eram lavados em solução salina, acondicionados em filme de PVC e envolvidos em papel alumínio, e estocados a -20°C . As hemácias, após serem separadas, eram glicerolizadas e também estocadas a -20°C , juntamente com o plasma.

2.3 SISTEMAS ESTUDADOS

Foram determinados 3 sistemas protéicos e 11 enzimáticos neste estudo, analisando-se um total de 19 locos.

2.3.1 Albumina - Alb

Atua na regulação osmótica, sendo responsável por 75% a 80% do efeito osmótico total das proteínas plasmáticas, e atua também no transporte de substâncias pouco solúveis de um tecido a outro.

Em roedores é codificada pelo loco autossômico Alb-1 (Selander e cols., 1971 e Brown & Welser, 1968). Apresentou-se polimórfica na maioria dos estudos realizados na família Cricetidae (Kilpatrick & Zimmerman, 1976b; Hamel, 1985 e Robbins, 1985).

2.3.2 Hemoglobina - Hb

Agente primário no transporte de oxigênio devido a sua capacidade única de combinação reversível com a molécula de O_2 . É também parte integrante da estrutura e função da célula vermelha do sangue.

Como em todos os vertebrados, é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Em roedores o polipeptídeo da cadeia alfa é codificado pelo loco Hb-1 e o da cadeia beta pelo loco Hb-2 (Patton e cols., 1981). Foram observados vários alelos autossômicos para estes locos.

Foi encontrado polimorfismo tanto no loco Hb-1 quanto no Hb-2, nas espécies de Cricetidae estudadas (Selander e cols., 1971; Avise e cols., 1974c, Kilpatrick & Zimmerman, 1976a e Apfelbaum & Blanco, 1984).

2.3.3 Transferrina - Trf

É uma beta globulina, cuja principal função é transportar ferro do plasma para as células receptoras da medula óssea (White, 1976).

Em roedores é codificada por um loco autossômico, o qual pode ser designado Trf (Cohen, 1960) ou Trf-1 (Selander e cols., 1971).

Apresentou-se polimórfico na maioria das espécies estudadas (Selander e cols., 1971; Avise e cols., 1974c e Loudenslager, 1978).

2.3.4 Isocitrato desidrogenase - Idh - E.C. 1.1.1.42

Catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato para ceto-glutarato. Ocorre em duas formas: a forma solúvel, a qual migra para o ânodo e a forma mitocondrial, que migra para o cátodo e é NADP-dependente.

Em roedores é codificada por dois locos autossômicos Idh-1 e Idh-2, responsáveis respectivamente pela forma solúvel e

pela forma mitocondrial.

O loco Idh-1 mostrou-se polimórfico na maioria dos estudos em cricetídeos (Mascarello & Shaw, 1973; Hamel, 1985). O loco Idh-2 somente foi descrito como polimórfico por Schmitt (1977), e nos demais estudos sua visualização foi sempre difícil. Por ser a enzima muito lábil, a estocagem dos tecidos leva à formação de bandas secundárias mais anódicas, o que está relacionado com um decréscimo de atividade de ambas as formas da enzima (Harris & Hopkinson, 1976).

2.3.5 Malato desidrogenase - Mdh - E.C. 1.1.1.37

Enzima do grupo das oxiredutases, que se apresenta sob duas formas, a enzima mitocondrial e a solúvel ou citoplasmática. A primeira catalisa a reação de oxidação do malato para oxaloacetato, e a segunda a reação reversa (Wilkinson, 1970). A forma solúvel migra anodicamente, e a mitocondrial catodicamente (Harris & Hopkinson, 1976).

É codificada por dois locos autossômicos, Mdh-1 para a enzima solúvel ou citoplasmática, e Mdh-2 para a forma mitocondrial. Na literatura, também podemos encontrar para estes dois locos, respectivamente, as designações Mor-1 e Mor-2 (Shows e cols., 1970), ou Mod-2 (Chapman e cols., 1971) para Mdh-2. Selander e cols. (1971) observaram uma terceira forma, a Mdh-3, que é solúvel ou citoplasmática e migra anodicamente.

O loco Mdh-1 mostrou-se polimórfico na maioria dos estudos em cricetídeos (Gardenal e cols., 1980; Apfelbaum & Blanco, 1984 e Johnson e cols., 1972), e Mdh-2 apresentou-se quase sempre monomórfico (Smith e cols., 1973; Gardenal & Blanco, 1985).

2.3.6 Fosfatase ácida - Acp - E.C. 3.1.3.2

Hidrolisa uma grande variedade de monoésteres de fosfato sob condições ácidas. Pode ser encontrada na forma monomérica, a qual se expressa nos eritrócitos, ou dimérica, encontrada nos tecidos (Bender e cols., 1985).

Em roedores, foram observadas as Acp-1 e Acp-2 de migração anódica, e a Acp-3 que migra para o cátodo, todas codificadas por locos autossômicos (Apfelbaum, 1983). Os locos também podem ser designados Fac-1, Fac-2 e Fac-3 (Apfelbaum, 1983) ou Fac-r e Fac-h, os quais designam a fosfatase ácida do rim e do fígado respectivamente (Gardenal & Blanco, 1985).

A enzima codificada pelo loco Acp-1 mostrou-se monomórfica em cricetídeos (Apfelbaum, 1983 e Hamel, 1985). As demais mostraram-se polimórficas na maioria das espécies estudadas (Apfelbaum & Blanco, 1984).

No presente estudo, analisamos somente a fosfatase ácida de migração anódica, a qual denominamos somente de Acp. A mesma apresentou características de degradação em quase toda a amostra, mostrando ser uma enzima muito lábil.

2.3.7 Superóxido dismutase - Sod - E.C. 1.15.1.1

Conhecida também como Indofenol oxidase (Ipo) e Tetrazolium oxidase (Tetra) (Harris & Hopkinson, 1976). Atua oxidando e evitando a redução de compostos de tetrazolium, produzindo assim regiões acromáticas (Mascarello & Shaw, 1973). Nichols & Ruddle (1973) e Mascarello & Shaw (1973), observaram duas formas desta enzima, uma que corava na região anódica e outra na região catódica, as quais foram designadas Tetra-1 ou

Ipo-A e Tetra-2 ou Ipo-B, respectivamente. Nos demais trabalhos, refere-se apenas à enzima com migração catódica, a qual apresenta designação Ipo-1 (Selander e cols., 1971) ou Sod (Smith e cols., 1973).

Na maioria dos estudos, esta enzima apresentou variação interespecífica, existindo também alguns trabalhos que demonstraram a existência de uma variação intraespecífica (Mascarello & Shaw, 1973 e Robbins e cols., 1985).

2.3.8 Leucina aminopeptidase - Lap - E.C. 3.4.11.1

Catalisa a hidrólise da L-leucil-beta-naftilamide, também denominada arilamidase. Em roedores, é controlada pelos locos Lap-1 e Lap-2, ambos autossômicos. O loco Lap-1 codifica enzimas presentes nas células vermelhas e nos tecidos (Womack, e cols., 1975) e Lap-2, enzimas do soro (Finlay & Huang, 1985).

Observou-se polimorfismo tanto para Lap-1 (Hamel, 1985) como para Lap-2 (Selander e cols., 1971) nas espécies de cricetídeos estudadas. No presente estudo, analisou-se somente o loco Lap-1.

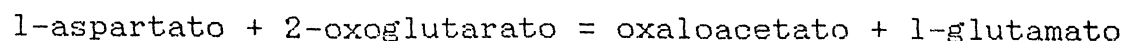
2.3.9 Fosfoglicose isomerase - Pgi - E.C.5.3.1.9

Enzima que catalisa a interconversão de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (DeLorenzo & Ruddle, 1969), atua também na regulação do metabolismo de carboidratos, nas vias glicolíticas e gluconeogênicas (Charles & Lee, 1980).

Em roedores é codificada pelo loco autossômico Pgi-1 ou Gpi-1 (Padua e cols., 1978). Verificou-se polimorfismo intra e interespecífico nas espécies de cricetídeos estudadas (Robbins e cols., 1985; Selander e cols., 1971 e Avise e cols., 1974c).

2.3.10 Glutamato oxaloacetato transaminase - Got - E.C.2.6.1.1

Catalisa a reação abaixo:



Ocorre na forma solúvel (citoplasmática) e mitocondrial, as quais migram para o cátodo e para o ânodo respectivamente, e são codificadas pelos locos autossômicos Got-1 e Got-2 (DeLorenzo & Ruddle, 1970). Esta enzima também recebe a denominação aspartato aminotransferase (Harris & Hopkinson, 1976).

O loco Got-1 mostrou polimorfismo em 70% dos estudos em cricetídeos e Got-2, em 40% dos estudos (Selander e cols., 1971; Avise e cols., 1974c; Apfelbaum, 1983 e Robbins e cols., 1985).

2.3.11 Fosfoglicodesidrogenase - Pgd - E.C.1.1.1.44

É uma oxiredutase que atua na oxidação do 6-fosfogliconato em ribulose-5-fosfato e dióxido de carbono. Codificada por um loco autossômico Pgd-1 (Chapman, 1975), apresentou variação na maioria das espécies de cricetídeos estudadas (Kilpatrick & Zimmerman, 1976b e Hamel, 1985).

2.3.12 Glucose-6-fosfato desidrogenase - G6pd - E.C.1.1.1.49

Ocorre em vários tecidos de mamíferos, principalmente no fígado. Catalisa a reação de oxidação da glicose-6-fosfato para 6-fosfogliconato. Em roedores ocorre em duas formas diferentes, uma com migração mais catódica, codificada por um loco autossômico G6pd-1, e outra de migração mais anódica, codificada por um loco ligado ao X, G6pd-2 (Nichols & Ruddle, 1973). No presente estudo, somente a forma ligada ao sexo foi

analisada, e o loco foi denominado G6pd.

Dos poucos estudos realizados com este marcador em cricetídeos, todos mostraram polimorfismo (Mascarello & Shaw, 1973; Avise e cols., 1974b e Hamel, 1985).

2.3.13 Fosfoglicomutase - Pgm - E.C.2.7.5.1

Enzima que atua na conversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato. Em roedores é codificada por três locos autossômicos, Pgm-1, Pgm-2 e Pgm-3. Existem discordâncias quanto à nomenclatura nos diversos estudos realizados: Selander e cols., (1971) optaram por uma nomenclatura relacionada com a ordem crescente da mobilidade anódica; Mascarello & Shaw (1973) utilizaram ordem decrescente de mobilidade anódica, sendo que, neste estudo, a Pgm-3 apresentou migração totalmente catódica; Nadeau e cols., (1981) denominaram de Pgm-2 o loco de migração mais catódica e Pgm-1, o de migração mais anódica, ficando Pgm-3 numa posição intermediária. No presente estudo optou-se pelo sistema adotado por Selander e cols., (1971).

Embora os trabalhos com cricetídeos não apresentem dados com relação aos três locos, a enzima mostrou-se polimórfica. Os estudos estão restritos ao loco Pgm-1, o qual foi na maioria da vezes polimórfico (Shows e cols., 1969 e Robbins e cols., 1985). Os locos Pgm-2 e Pgm-3 também foram analisados em algumas espécies de cricetídeos, onde mostraram variação somente em alguns estudos (Smith e cols., 1973 e Johnson & Packard, 1974).

2.3.14 Esterase - Es - E.C. 3.1.1.1

Enzima encontrada em tecidos e no soro, catalisa a quebra de ligações ésteres. É controlada por diversos locos e a enzima apresenta uma grande variação na especificidade por

substratos. Em roedores foram estudados mais de 20 locos sendo que grande parte deles apresentaram-se polimórficos na maioria dos estudos com cricetideos (Smith e cols., 1973 e Apfelbaum & Blanco, 1984).

No presente estudo foram analisados o loco Es-6, cuja enzima tem como substrato o acetato de alfa-naftil (Bender e cols., 1982) e o Es-10, cuja enzima tem como substrato o acetato de 4-metilumbeliferil (Peters & Nash, 1976 e Womack & Sharp, 1976). Este último é homólogo à Esterase D encontrada no homem (Womack & Sharp, 1976).

2.4 METODOS LABORATORIAIS

2.4.1 Preparo do homogenado

O órgão utilizado no presente estudo foi o fígado, o qual foi descongelado, lavado em solução salina, secado e pesado em papel alumínio. O homogenado foi preparado no homegeneizador com um volume de água destilada equivalente ao dobro da massa do tecido, adicionando-se a este gotas de mercaptoetanol a 2%, em proporção ao volume de água. Em seguida, foi centrifugado a 2000 rpm, por 10 minutos e somente o sobrenadante foi utilizado. Do sangue, dependendo do sistema tipado, era utilizado o plasma (para as proteínas séricas) ou as hemácias (para as proteínas eritrocitárias).

2.4.2 Métodos eletroforéticos

Na determinação dos sistemas, foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal em gel de amido de fécula de batata hidrolisado, sob refrigeração. A hidrólise do amido foi feita no próprio laboratório de Polimorfismo do Departamento de Genética

da Universidade Federal do Paraná, utilizando-se ácido clorídrico e acetona na proporção de 1:100 (Smithies, 1955).

Para Acp, Idh, Mdh e Sod foi empregado o tampão citrato / fosfato pH 6.3, conforme o método descrito por Harris & Hopkinson (1976) para Acp. A migração foi de 6 volts/cm durante 17 horas.

Para Es-6 e Pgm, empregou-se o tampão tris / maleato pH 7.4, conforme a técnica sugerida por Selander e cols., (1971). As condições de migração foram semelhantes às dos sistemas anteriores.

Os sistemas Lap, Pgi e Got foram estudados utilizando-se o tampão fosfato pH 6.7, descrito por Selander e cols., (1971), com migração de 13 volts /cm durante 17 horas.

Os eletromorfos de G6pd, Pgd e Es-10 foram separados empregando-se o tampão fosfato pH 7.0, de acordo com o descrito por Harris & Hopkinson (1976) para Pgd. Aplicando-se 13 volts / cm durante 18 horas.

As proteínas séricas Alb e Trf foram determinadas pelo sistema descontínuo de Bowman & Bearn(1965), tampão borato / hidróxido de lítio pH 8.1 e tampão tris / citrato pH 8.4, com migração de 28 volts / cm durante 7 horas.

Para a Hb, foi empregado o sistema descontínuo descrito por Selander e cols., (1971), tampão Borato pH 8.2 para as cubas e tampão tris / HCl pH 8.5, para o gel, aplicando-se 10 volts / cm durante 7 horas.

As aplicações foram feitas com papel Whatmann 3 MM, com exceção de Hb e Es-6, nas quais foi utilizado papel filtro

qualitativo, por causa da alta concentração destas enzimas nas hêmácias e no fígado, respectivamente. Para os três locos de Pgm e em alguns casos de fenótipos duvidosos de Got-2, a quantidade de papéis foi triplicada, uma vez que se encontram em baixas concentrações.

2.4.3 Métodos de coloração

Os sistemas Acp, Es, Got, Idh, Mdh e Pgi foram corados de acordo com as técnicas descritas por Harris & Hopkinson (1976), com algumas modificações. A enzima Sod, foi visualizada após a leitura de Mdh, expondo-se o gel a luz.

Para Lap, Pgd, G6pd e Pgm utilizaram-se os métodos de revelação descritos por Selander e cols. (1971), com algumas modificações.

As proteínas Alb, Hb e Trf foram coradas com solução de amido black (metanol, água e ácido acético na proporção de 50:50:10 por volume).

2.4.4 Análise da migração eletroforética

Para a interpretação dos eletroferogramas, as bandas foram medidas pela parte superior do gel. A migração relativa foi calculada em função dos eletromorfos de *Rattus norvegicus*, o qual foi aplicado sempre como padrão em cada gel. Para verificar se todos os eletromorfos representavam uma real variabilidade no loco, estes eram repetidos numa mesma placa eletroforética, e os que apresentavam a mesma migração eram considerados como sendo o mesmo alelo, excluindo assim possíveis variações na aplicação e nas condições eletroforéticas.

A denominação dos diferentes alelos de cada loco foi

dada através de letras minúsculas, designando-se de a sempre o alelo que determina a forma enzimática de migração mais lenta e assim por diante.

As placas eletroforéticas foram registradas em desenhos esquemáticos em papel milimetrado.

2.4.5 Métodos fotográficos

As placas eletroforéticas foram fotografadas utilizando-se filme Panatomic X. Com exceção das placas de Es-10 e Acp, onde a leitura era feita com UV.

Na revelação do filme utilizou-se Revelador D-19 e Fixador Kodak, e para as cópias, Revelador e Fixador Kodak. As cópias foram feitas em papel Kodabromide F-3.

2.5 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

2.5.1 Análise da variabilidade genética da amostra

As frequências gênicas foram calculadas por contagem direta.

A heterozigosidade por loco foi calculada pela fórmula : $h = 1 - \sum x_i^2$ (Nei, 1972).

onde x_i é a frequência do enésimo alelo de um loco. E a heterozigosidade média por espécie foi obtida por :

$$\bar{H} = \frac{\sum h}{N} \pm \text{s.e.}, \text{ onde s.e.} = \sqrt{\frac{(h - \bar{H})^2}{N(N-1)}}$$

onde N é o número de locos analisados (Nei, 1972).

A proporção de locos polimórficos para cada espécie foi obtida dividindo-se o número de locos polimórficos na espécie pelo total de locos analisados.

Para o cálculo da heterozigosidade média, as amostras foram reunidas por espécie, agrupando-se os locais com 5 ou mais exemplares (Apendice 1). A relação de espécies estudadas, locais de coleta e número de animais analisados estão na Tabela II.2.

2.5.2 Análise filogenética

Para a análise filogenética, os dados foram agrupados por espécie, sendo utilizados os totais para cada espécie, conforme Tabela II.1. Dois tipos de análises foram feitas, uma considerando-se todos os indivíduos estudados e outra somente com os indivíduos que só foram tipados para todos os locos, descartando-se aqueles que por problemas técnicos não puderam ser tipados para um ou mais locos. Os dados separados por espécie e por loco utilizados nesta análise estão nos Apêndices 2 e 3.

Os dados eletroforéticos foram transformados em dados do tipo caráter/estado, sendo o loco considerado como caráter e a combinação de alelos como estado (Mickevich & Mitter, 1981). A partir destes, foram feitas duas abordagens: uma considerando-se os dados como não ordenados, ou seja, a partir dos dados fez-se uma matriz de dados sem nenhum ordenamento; a segunda abordagem tratou os dados como ordenados, onde se fez um ordenamento *a priori* dos estados pelo método "minimum allele turnover" (MAT), segundo Mickevich & Mitter (1983), o qual ordena os estados minimizando o número total de mudanças alélicas. O método consiste de uma rede de Prim, conectando os dados pela distância Manhattan entre eles, computada pela presença ou ausência dos alelos. Para este foi elaborado um programa de computador. Após o ordenamento *a priori*,

TABELA II.2 - Relação das espécies consideradas para o cálculo da heterozigosidade média por espécie (\bar{H}).

Tribo/Espécie	Local de coleta	Total
Akodontini		
<i>Akodon serrensis</i>	Tomás Coelho (Araucária) (13)	51
	E.E.C (Piraquara) (26)	
	S.C.B (Curitiba) (12)	
<i>A. aff. arviculoides</i>	Hidrelétrica Guaricana (5)	11
	(São José dos Pinhais)	
	São Mateus do Sul (6)	
<i>A. arviculoides</i>	Parque Marumbi (8)	8
	(Morretes)	
<i>Oxymycterus roberti</i>	IAPAR (Piraquara) (15)	15
Oryzomyini		
<i>Oryzomys delticola</i>	Tomás Coelho (6)	11
	(Araucária)	
	E.E.C. (Piraquara) (5)	
<i>O. flavescens</i>	E.E.C. (Piraquara) (6)	11
	Vila Velha (5)	
	(Ponta Grossa)	
<i>O. intermedius</i>	Parque Marumbi (5)	5
	(Morretes)	

os dados foram analisados utilizando-se o sistema PAUP(V.2.4.1) de Swofford (1985), o qual infere filogenias baseando-se na parcimônia de Wagner, a qual busca o cladograma com o menor número possível de transformações de estados dos caracteres. Este programa tem a facilidade de tratar caracteres ordenados e não ordenados, situação considerada no presente estudo.

Após a construção do primeiro cladograma tanto para dados ordenados (com ordenamento a priori) como para dados não ordenados, foi aplicada a análise de séries de transformações (TSA), sugerida por Mickevich (1982). Este método otimiza simultaneamente o ordenamento dos estados e do cladograma. Nele, as seqüências de mudanças de estado de um caráter, ou seja, as séries de transformações, são definidas pela sua relação com a seqüência de eventos cladogenéticos no cladograma. É importante salientar que só devemos aceitar uma transformação se os estados dos caracteres compartilham um evento cladogenético. O método em si, consiste em elaborar um cladograma inicial e, a partir deste, calcular as séries de transformações para cada caráter. Com esta nova série de caracteres transformados elaborase um cladograma, se este for semelhante ao primeiro, o procedimento termina neste passo. Este será o cladograma considerado estável, e o ordenamento obtido através deste TSA, será o que melhor reflete o verdadeiro ordenamento revelado pelo cladograma. Se este cladograma não for semelhante ao primeiro segue-se o mesmo procedimento até que o cladograma seja idêntico ao anterior.

Tanto para os dados ordenados como para os dados não ordenados, foram feitas duas abordagens após o TSA, denominadas ordenamento simples e ordenamento complexo. Estas abordagens

diferem do método sugerido por Mickevich (1982), porém fez-se necessário este procedimento devido à falta de informações sobre como proceder perante alguns casos que não apresentavam resolução e não podiam ser totalmente eliminados, o que acarretaria perda de dados. Portanto estes dois tipos de análise podem ser considerados como uma proposta do presente estudo para um melhor aproveitamento dos dados. O ordenamento simples consiste em utilizar somente os caracteres cujo o ordenamento não tem necessidade de criação de estados intermediários, considerando-os como ordenados, e os caracteres restantes como não ordenados. No ordenamento complexo, utilizaram-se também os dados cujo ordenamento necessitava da criação de novos estados; e os que apresentavam resolução abígua, segundo o TSA, eram colocados como não ordenados.

Se após qualquer tipo de ordenamento (simples ou complexo), surgisse mais de um cladograma, era feito o cladograma de consenso, o qual reflete as informações consensuais entre as diferentes classificações. Para isto foi utilizado o programa CONTREE de Swoford (1985) e CONSENSE de Felsenstein (1987), e este cladograma era utilizado para o TSA seguinte.

Também foram utilizados os métodos de distância, os quais trabalham com matrizes de distância entre os grupos estudados. Estas foram calculadas a partir de dados de frequência utilizando-se somente aqueles indivíduos que foram tipados para todos os locos (Apêndice 3). Para esta análise utilizou-se o pacote BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1981). Neste pacote, empregaram-se as distâncias de Nei (1972 e 1978), de Rogers (1972) e de Rogers modificada (Wright em 1978, citado por Rogers,

1986) Para o agrupamento dos dados, na análise fenética, foi utilizado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average), o qual, para a comparação dos pares de espécie, utiliza a média do coeficiente de similaridade.

Utilizando o mesmo pacote BIOSYS-1, fez-se outro tipo de análise filogenética, empregando-se a metodologia de Wagner com distância (Farris, 1972). Para este foram utilizadas somente as distâncias de Rogers (1972) e a de Rogers modificada (Wright em 1978, citado por Rogers, 1986), as quais são métricas e estimam a distância geométrica média entre as frequências gênicas. Como as distâncias de Nei (1972 e 1978) não são métricas, ou seja, a disposição dos pontos que representam as OTUs não estão num espaço euclidiano adequado, seus resultados não podem ser utilizados na reconstrução de filogenias.

Nos métodos filogenéticos, utilizando-se tanto a parcimônia de Wagner como os métodos de distância, foi utilizada a tribo Oryzomyini como grupo de fora, ou outgroup. O outgroup é necessário para se eleger os caracteres primitivos e derivados. Os Oryzomyini apresentavam o menor número de espécies e pelas informações morfológicas, esperava-se, de antemão, uma separação entre as tribos estudadas.

Nas análises filogenéticas e fenéticas, as espécies foram tratadas como OTUs (Operational Taxonomic Unit), ou unidades taxonômicas operacionais. As designações das respectivas OTUs para cada espécie estão nas matrizes de dados utilizadas nestes tipos de análises, Tabelas III.19, III.20 e III.21.

III - RESULTADOS

III.1 VARIABILIDADE GENÉTICA DA AMOSTRA

Os locos Got-2 e Mdh-1 mostraram-se monomórficos em todas as espécies estudadas, sendo que apenas Got-2^a e Mdh-1^a foram encontrados.

A albumina apresentou uma variação intra e interespecífica. Foram observados três alelos, Alb^a, Alb^b e Alb^c (Tabela III.1 e Figura III.1). As espécies *Akodon serrensis*, *A. aff. arviculoides*, *Oryzomys delticola* e *O. flavescens* apresentaram os três alelos. Os exemplares de *A. arviculoides* apresentaram os alelos Alb^a e Alb^c, *Oxymycterus roberti* mostrou-se monomórfico para Alb^b, sendo esta a única espécie que não apresentou variabilidade intraespecífica; *Oxymycterus* sp apresentou os alelos Alb^b e Alb^c, e *Oryzomys intermedius*, os alelos Alb^a e Alb^b. Somente foram verificados casos de heterozigose para *A. serrensis*, que apresentou um exemplar de fenótipo Alb^a/Alb^b, e para *Oryzomys delticola*, que apresentou um exemplar Alb^a/Alb^c. A frequência de Alb^a oscilou entre 0.17 ± 0.08 (*O. flavescens*) e 0.70 ± 0.08 (*O. delticola*); Alb^b variou de 0.17 ± 0.08 (*A. aff. arviculoides*) a 0.83 ± 0.11 ; (*Oxymycterus* sp) e Alb^c, de 0.10 ± 0.05 (*O. delticola*) a 0.75 ± 0.11 (*A. arviculoides*).

No sistema da transferrina foram encontrados quatro alelos Trf^a, Trf^b, Trf^c e Trf^d (Tabela III.2 e Figura III.2A e 2B).

TABELA III.1 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Alb, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados					Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	AB	AC		a	b	c
Akodontini									
<i>Akodon serrensis</i>	10	36	8	1	-	55	0.19	0.66	0.15
<i>A. aff. arviculoides</i>	3	2	7	-	-	12	0.25	0.17	0.58
<i>A. arviculoides</i>	2	-	6	-	-	8	0.25	0.00	0.75
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	14	-	-	-	14	0.00	1.00	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	-	5	1	-	-	6	0.00	0.83	0.17
Oryzomyini									
<i>Oryzomys delticola</i>	10	3	1	-	1	15	0.70	0.20	0.10
<i>O. intermedius</i>	6	3	-	-	-	9	0.67	0.33	0.00
<i>O. flavescens</i>	2	5	5	-	-	12	0.17	0.42	0.41

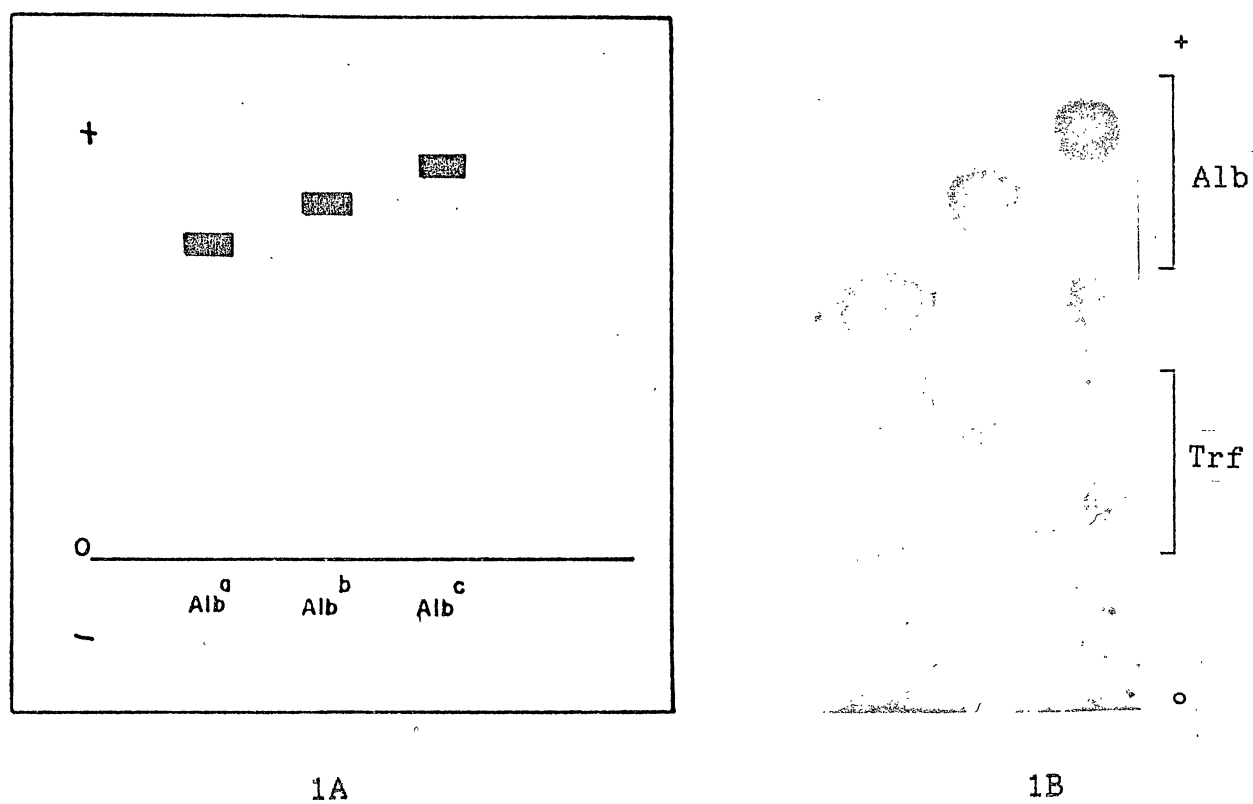
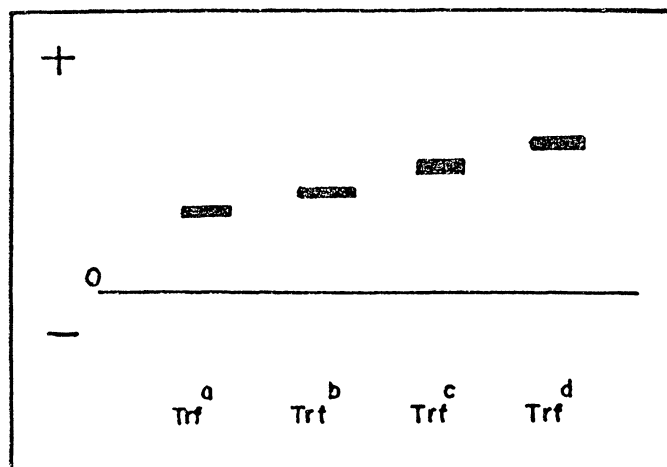


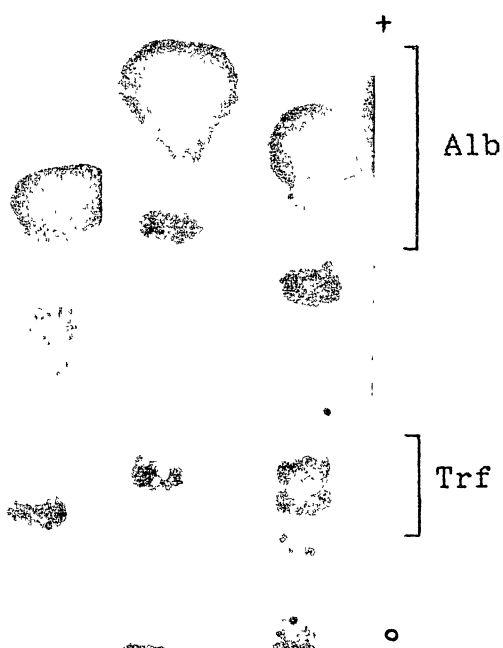
FIGURA III.1A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Alb. 1B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Alb^a, Alb^b e Alb^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

TABELA III.2 Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Trf, por espécie

Tribo/Espécie	Fenótipos observados										Total	Frequências gênicas			
	AA	BB	CC	DD	AB	AC	AD	BC	BD	CD		a	b	c	d
Akodontini															
<i>Akodon serrensis</i>	4	14	16	1	-	-	2	16	-	2	55	0.10	0.40	0.45	0.05
<i>A. aff. arviculoides</i>	3	3	2	-	1	-	-	-	-	3	12	0.30	0.29	0.29	0.12
<i>A. arviculoides</i>	1	1	2	-	2	-	-	-	2	-	8	0.25	0.38	0.25	0.12
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	2	5	4	-	-	-	1	-	-	12	0.00	0.21	0.46	0.33
<i>Oxymycterus sp</i>	1	-	1	1	-	1	-	-	-	1	5	0.30	0.00	0.40	0.30
Oryzomyini															
<i>Oryzomys delticola</i>	3	1	5	-	-	-	1	3	-	-	13	0.27	0.19	0.50	0.04
<i>O. intermedius</i>	1	-	5	-	-	1	1	1	-	-	9	0.22	0.05	0.68	0.05
<i>O. flavescens</i>	3	3	7	-	-	-	-	-	-	-	13	0.23	0.23	0.54	0.00



2A



2B

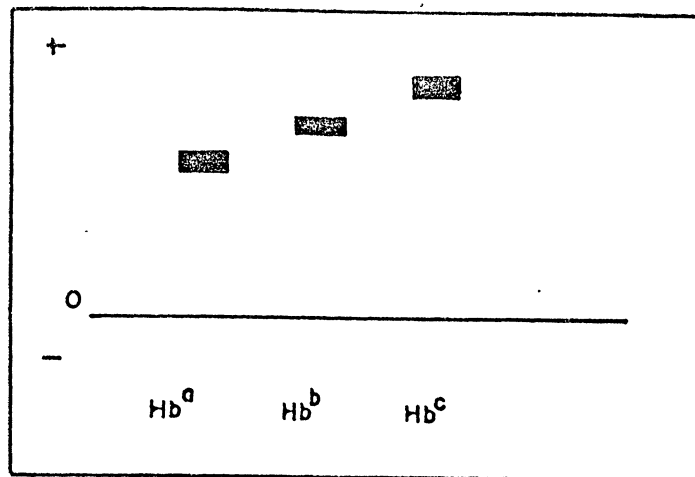
FIGURA III.2A - Representação esquemática dos alelos do loco Trf .
 2B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Trf^a , Trf^{ab} ,
 e Trf^b , da esquerda para a direita, respectivamente.

No gênero *Akodon* observou-se a presença dos quatro alelos e um grande número de heterozigotos. Em *Akodon serrensis*, encontraram-se os fenótipos $\text{Trf}^a/\text{Trf}^d$, $\text{Trf}^b/\text{Trf}^c$ e $\text{Trf}^c/\text{Trf}^d$; em *A. aff. arviculoides* $\text{Trf}^a/\text{Trf}^b$ e $\text{Trf}^c/\text{Trf}^d$; e em *A. arviculoides*, $\text{Trf}^a/\text{Trf}^b$ e $\text{Trf}^b/\text{Trf}^d$. Em *Oxymycterus roberti* podem-se observar os alelos Trf^b , Trf^c e Trf^d , sendo encontrado um heterozigoto $\text{Trf}^b/\text{Trf}^c$, e *Oxymycterus* sp apresentou os alelos Trf^a , Trf^c e Trf^d , e os heterozigotos $\text{Trf}^a/\text{Trf}^c$ e $\text{Trf}^c/\text{Trf}^d$. Em *Oryzomys delticola* e *O. intermedius* foram observados os quatro alelos e os heterozigotos $\text{Trf}^a/\text{Trf}^d$ e $\text{Trf}^a/\text{Trf}^c$, respectivamente. Somente *O. flavescens* apresentou os alelos Trf^a , Trf^b e Trf^c e nenhum heterozigoto. Neste loco, a frequência do alelo Trf^a variou de 0.10 ± 0.03 (*A. serrensis*) a 0.30 ± 0.09 (*A. aff. arviculoides*) ou 0.30 ± 0.15 (*Oxymycterus* sp). O alelo Trf^b oscilou entre 0.05 ± 0.05 (*Oryzomys intermedius*) e 0.48 ± 0.05 (*A. serrensis*); Trf^c de 0.25 ± 0.10 (*A. arviculoides*) a 0.68 ± 0.11 (*O. intermedius*); e Trf^d , de 0.04 ± 0.04 (*O. delticola*) a 0.33 ± 0.09 (*Oxymycterus roberti*).

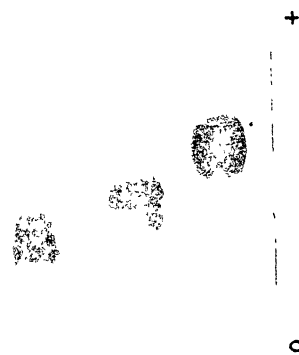
O loco da hemoglobina apresentou três alelos, Hb^a , Hb^b e Hb^c (Tabela III.3 e Figura III.3A e 3B), os quais se distribuem de maneira diferente entre as espécies estudadas. *A. aff. arviculoides* foi a única espécie do gênero a apresentar os 3 alelos; *A. serrensis* e *A. arviculoides* apresentaram somente Hb^b e Hb^c , e o heterozigoto Hb^b/Hb^c . Em *Oxymycterus roberti* e *Oxymycterus* sp, observaram-se os três alelos e heterozigotos Hb^b/Hb^c e Hb^a/Hb^b somente em *O. roberti*. *Oryzomys intermedius* e *O. flavescens*, apresentaram também alelos Hb^a , Hb^b e Hb^c . Foi

TABELA III.3 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Hb, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados						Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	AB	AC	BC		a	b	c
<i>Akodon serrensis</i>	-	46	9	-	-	-	55	0.00	0.84	0.16
<i>A. aff. arviculoides</i>	1	7	3	-	-	2	13	0.08	0.62	0.30
<i>A. arviculoides</i>	-	6	-	-	-	2	8	0.00	0.87	0.13
<i>Oxymycterus roberti</i>	3	4	-	2	-	3	12	0.33	0.54	0.13
<i>Oxymycterus sp</i>	3	2	1	-	-	-	6	0.50	0.33	0.17
Oryzomyini										
<i>Oryzomys delticola</i>	-	6	6	-	-	3	15	0.00	0.50	0.50
<i>O. intermedius</i>	-	3	3	-	1	1	8	0.06	0.44	0.50
<i>O. flavescens</i>	5	4	-	3	-	2	14	0.47	0.46	0.07



3A



3B

FIGURA III.3A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Hb. 3B - Fotografia de um gel, mostrando os fenótipos Hb^a, Hb^b e Hb^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

também observado um exemplar Hb^a/Hb^o e um Hb^b/Hb^o , em *O. intermedius* e tres Hb^b/Hb^c em *O. delticola*. Em *O. flavescens* encontraram-se exemplares Hb^a e Hb^b , e heterozigotos Hb^a/Hb^b e Hb^b/Hb^c . Nos três gêneros estudados, a freqüência de Hb^a oscilou entre 0.06 ± 0.06 (*O. intermedius*) a 0.50 ± 0.14 (*Oxymycterus* sp); Hb^b variou desde 0.33 ± 0.14 (*Oxymycterus* sp) a 0.87 ± 0.08 (*A. arviculoides*), e Hb^c desde 0.07 ± 0.05 (*Oryzomys flavescens*) a 0.50 ± 0.09 (*O. delticola*).

No sistema de Esterase-10 foram observados três alelos, $Es-10^a$, $Es-10^b$ e $Es-10^c$ (Tabela III.4 e Figura III.4), os quais se distribuíram de uma maneira irregular nos três gêneros estudados. Em *Akodon*, somente *A. serrensis* apresentou os três alelos, *A. aff. arviculoides* apresentou $Es-10^a$ e $Es-10^b$, e *A. arviculoides* mostrou-se monomórfica para $Es-10^a$. Em *A. serrensis* observaram-se heterozigotos $Es-10^a/Es-10^b$, $Es-10^a/Es-10^c$ e $Es-10^b/Es-10^c$, e em *A. aff. arviculoides* $Es-10^a/Es-10^b$. Tanto em *Oxymycterus roberti* como *Oxymycterus* sp, detectaram-se os alelos $Es-10^a$ e $Es-10^b$, e heterozigotos $Es-10^b/Es-10^a$. Nos *Oryzomyini*, cada espécie apresentou um perfil de alelos diferente; *Oryzomys delticola* apresentou os alelos $Es-10^a$, $Es-10^b$ e $Es-10^c$; *O. intermedius*, $Es-10^a$ e $Es-10^b$, e *O. flavescens*, $Es-10^b$ e $Es-10^c$. A variação dos alelos neste sistema foi a seguinte: $Es-10^a$ variou de 0.12 ± 0.06 (*A. aff. arviculoides*) a 0.78 ± 0.09 (*O. intermedius*); $Es-10^b$ oscilou entre 0.22 ± 0.09 (*O. intermedius*) a 0.88 ± 0.06 (*A. aff. arviculoides*); e $Es-10^c$, entre 0.17 ± 0.04 (*A. serrensis*) a 0.46 ± 0.08 (*O. flavescens*).

O loco *Es-6* mostrou-se polimórfico em quase todas as espécies estudadas, foram detectados três alelos $Es-6^a$, $Es-6^b$ e

TABELA III.4 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Es-10, por espécie

Tribo/Espécie	Fenótipos observados						Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	AB	AC	BC		a	b	c
Akodontini										
<i>Akodon serrensis</i>	10	2	2	26	11	4	55	0.52	0.31	0.17
<i>A. aff. arviculoides</i>	-	10	-	3	-	-	13	0.12	0.88	0.00
<i>A. arviculoides</i>	8	-	-	-	-	-	8	1.00	0.00	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	2	5	-	6	-	-	13	0.38	0.62	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	4	1	-	1	-	-	6	0.75	0.25	0.00
Oryzomyini										
<i>Oryzomys delticola</i>	1	6	-	3	1	5	16	0.19	0.63	0.18
<i>O. intermedius</i>	7	2	-	-	-	-	9	0.78	0.22	0.00
<i>O. flavescens</i>	-	1	-	-	-	12	13	0.00	0.54	0.46

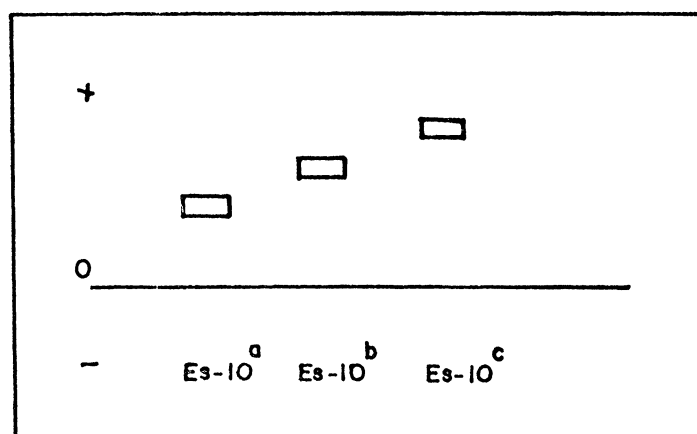
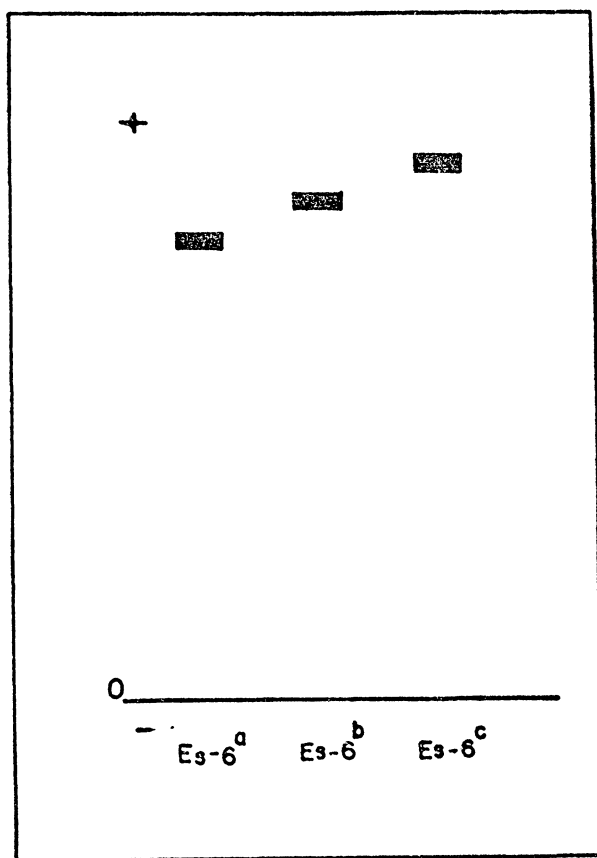


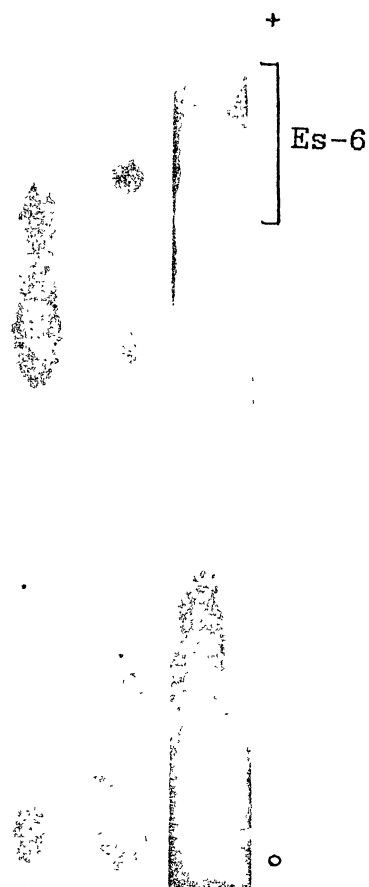
FIGURA III.4 - Representação esquemática dos alelos observados no loco Es-10.

TABELA III.5 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Es-6, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados						Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	AB	AC	BC		a	b	c
Akodontini										
<i>Akodon serrensis</i>	9	24	2	16	2	1	54	0.33	0.60	0.07
<i>A. aff. arviculoides</i>	1	4	4	3	-	1	13	0.19	0.46	0.35
<i>A. arviculoides</i>	-	2	5	1	-	-	8	0.06	0.31	0.63
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	-	11	-	3	-	14	0.10	0.00	0.90
<i>Oxymycterus sp</i>	4	-	1	-	1	-	6	0.75	0.00	0.25
Oryzomyini										
<i>Oryzomys delticola</i>	-	15	-	3	-	-	18	0.08	0.92	0.00
<i>O. intermedius</i>	3	-	-	6	-	-	9	0.67	0.33	0.00
<i>O. flavescens</i>	-	14	-	-	-	-	14	0.00	1.00	0.00



5A

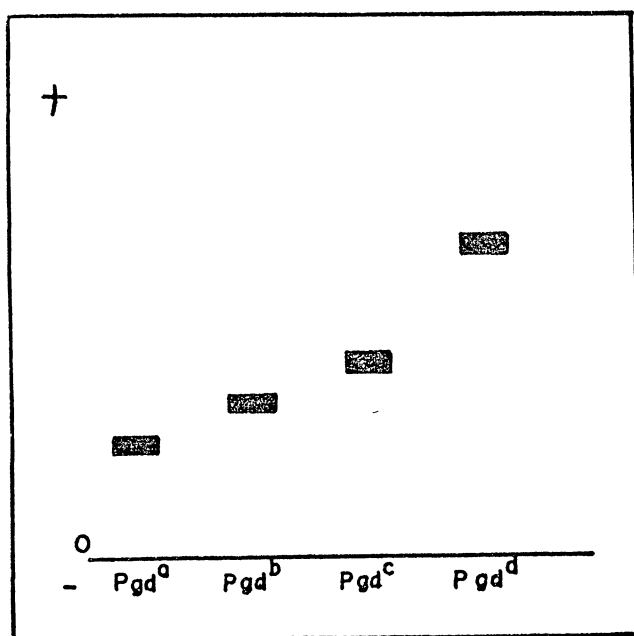


5B

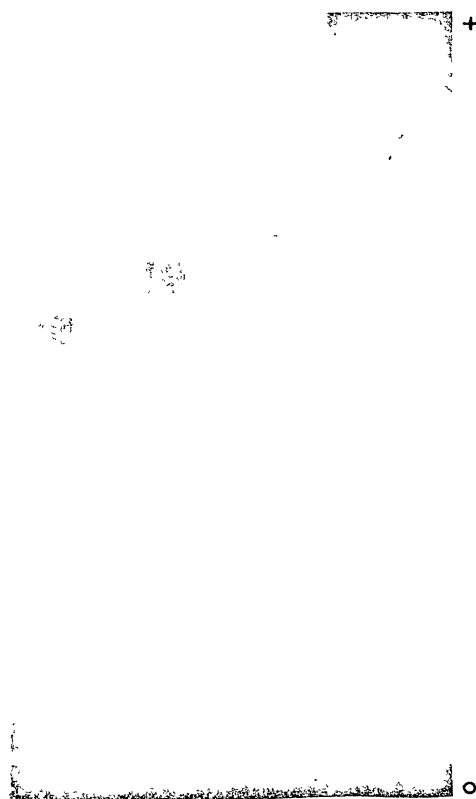
FIGURA 5A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Es-6. 5B - Fotografia de um gel, mostrando entre os eletromorfos de migração mais rápida, os fenótipos Es-6^a, Es-6^b, e Es-6^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

TABELA III.6 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Pgd, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados							Total	Freqüências gênicas			
	AA	BB	CC	DD	AB	AD	BC		a	b	c	d
Akodontini												
<i>Akodon serrensis</i>	-	22	11	16	-	-	2	51	0.00	0.45	0.24	0.31
<i>A. aff. arviculoides</i>	6	4	-	-	2	1	-	13	0.58	0.38	0.00	0.04
<i>A. arviculoides</i>	-	6	1	-	-	-	1	8	0.00	0.81	0.19	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	4	5	3	-	-	1	13	0.00	0.35	0.42	0.23
<i>Oxymycterus sp</i>	-	4	2	-	-	-	-	6	0.00	0.67	0.33	0.00
Oryzomyini												
<i>Oryzomys delticola</i>	-	12	1	-	-	-	1	14	0.00	0.89	0.11	0.00
<i>O. intermedius</i>	-	6	2	1	-	-	-	9	0.00	0.67	0.22	0.11
<i>O. flavescens</i>	-	3	4	6	-	-	-	13	0.00	0.23	0.31	0.46



6A



6B

FIGURA III.6A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgd. 6B - Fotografia de um gel, mostrando os fenótipos Pgd^a , Pgd^b , Pgd^c e Pgd^d , da esquerda para a direita, respectivamente.

somente encontrado entre os *Oryzomys intermedius* e *O. flavescens* e um heterozigoto Pgd^b / Pgd^c foi encontrado entre os *O. delticola*. A variação encontrada neste sistema foi a seguinte: o alelo Pgd^b oscilou de 0.23 ± 0.08 (*O. flavescens*) a 0.89 ± 0.06 (*O. delticola*); Pgd^c variou de 0.11 ± 0.06 (*O. delticola*) a 0.42 ± 0.10 (*Oxymycterus roberti*), e Pgd^d , de 0.04 ± 0.04 (*A. aff. arviculoides*) e 0.46 ± 0.10 (*O. flavescens*).

O loco *Pgm-1* apresentou muita variabilidade interespecífica e pouca intra-específica. Foram detectados os alelos $Pgm-1^a$, $Pgm-1^b$ e $Pgm-1^c$ (Tabela III.7 e Figura III.7A e 7B). Nos exemplares do gênero *Akodon* somente foi observado o alelo $Pgm-1^a$. Em *Oxymycterus* foram visualizados $Pgm-1^a$ e $Pgm-1^b$, e nos *Oryzomyini*, $Pgm-1^c$ e um indivíduo heterozigoto $Pgm-1^b / Pgm-1^c$. Foi observada pouca variação gênica, uma vez que a maioria das espécies mostrou-se monomórfica para um determinado alelo. A frequência de $Pgm-1^a$ variou de 0.15 ± 0.07 (*Oxymycterus roberti*) a 0.38 ± 0.12 (*Oxymycterus sp.*), $Pgm-1^b$ oscilou entre 0.05 ± 0.05 (*O. intermedius*) e 0.85 ± 0.07 (*Oxymycterus roberti*) e $Pgm-1^c$ não apresentou variação, pois foi somente observado em *O. intermedius*.

Observou-se uma grande variação no sistema *Pgm-2*, três alelos foram detectados, $Pgm-2^a$, $Pgm-2^b$ e $Pgm-2^c$ (Tabela III.8 e Figura III.8A e 8B). Os *Akodontini* apresentaram três alelos, porém $Pgm-2^a$ só estava presente em *Akodon serrensis* e *A. aff. arviculoides*, nos demais somente se verificaram os alelos $Pgm-2^b$ e $Pgm-2^c$, foram também observados heterozigotos $Pgm-2^b / Pgm-2^c$ em *A. serrensis*, *A. arviculoides* e *Oxymycterus roberti*. Nos *Oryzomyini*, observou-se somente $Pgm-2^b$ e $Pgm-2^c$, e nas 3 espécies estudadas verificamos presença de heterozigotos $Pgm-2^b / Pgm-2^c$.

TABELA III.7 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Pgm-1, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados				Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	BC		a	b	c
Akodontini								
<i>Akodon serrensis</i>	55	-	-	-	55	1.00	0.00	0.00
<i>A. aff. arviculoides</i>	13	-	-	-	13	1.00	0.00	0.00
<i>A. arviculoides</i>	8	-	-	-	8	1.00	0.00	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	2	11	-	-	13	0.15	0.85	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	3	5	-	-	8	0.38	0.62	0.00
Oryzomyini								
<i>Oryzomys delticola</i>	-	-	18	-	18	0.00	0.00	1.00
<i>O. intermedius</i>	-	-	8	1	9	0.00	0.05	0.95
<i>O. flavescens</i>	-	-	14	-	14	0.00	0.00	1.00

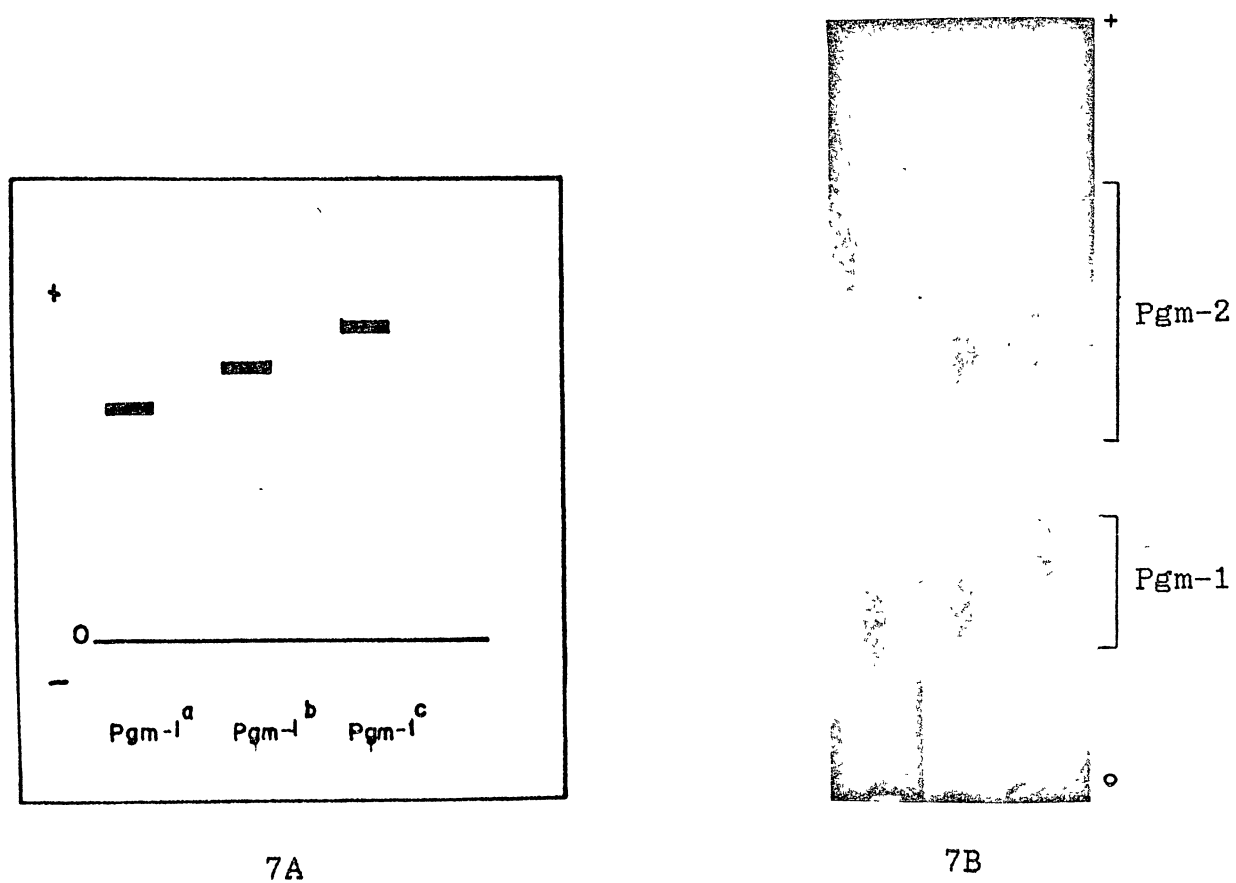


FIGURA III.7A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-1. 7B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgm-1^a, Pgm-1^b e Pgm-1^c da esquerda para a direita respectivamente.

TABELA III.8 Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Pgm-2, por espécie

Tribo/Espécie	Fenótipos observados				Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB ₁	CC	BC		a	b	c
Akodontini								
<i>Akodon serrensis</i>	14	16	18	5	53	0.26	0.35	0.39
<i>A. aff. arviculoides</i>	3	2	8	-	13	0.23	0.15	0.62
<i>A. arviculoides</i>	-	2	5	1	8	0.00	0.31	0.69
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	3	2	8	13	0.00	0.54	0.46
<i>Oxymycterus sp</i>	-	3	2	-	5	0.00	0.60	0.40
Oryzomyini								
<i>Oryzomys delticola</i>	-	1	9	8	18	0.00	0.28	0.72
<i>O. intermedius</i>	-	1	2	6	9	0.00	0.44	0.56
<i>O. flavescens</i>	-	1	4	8	13	0.00	0.39	0.61

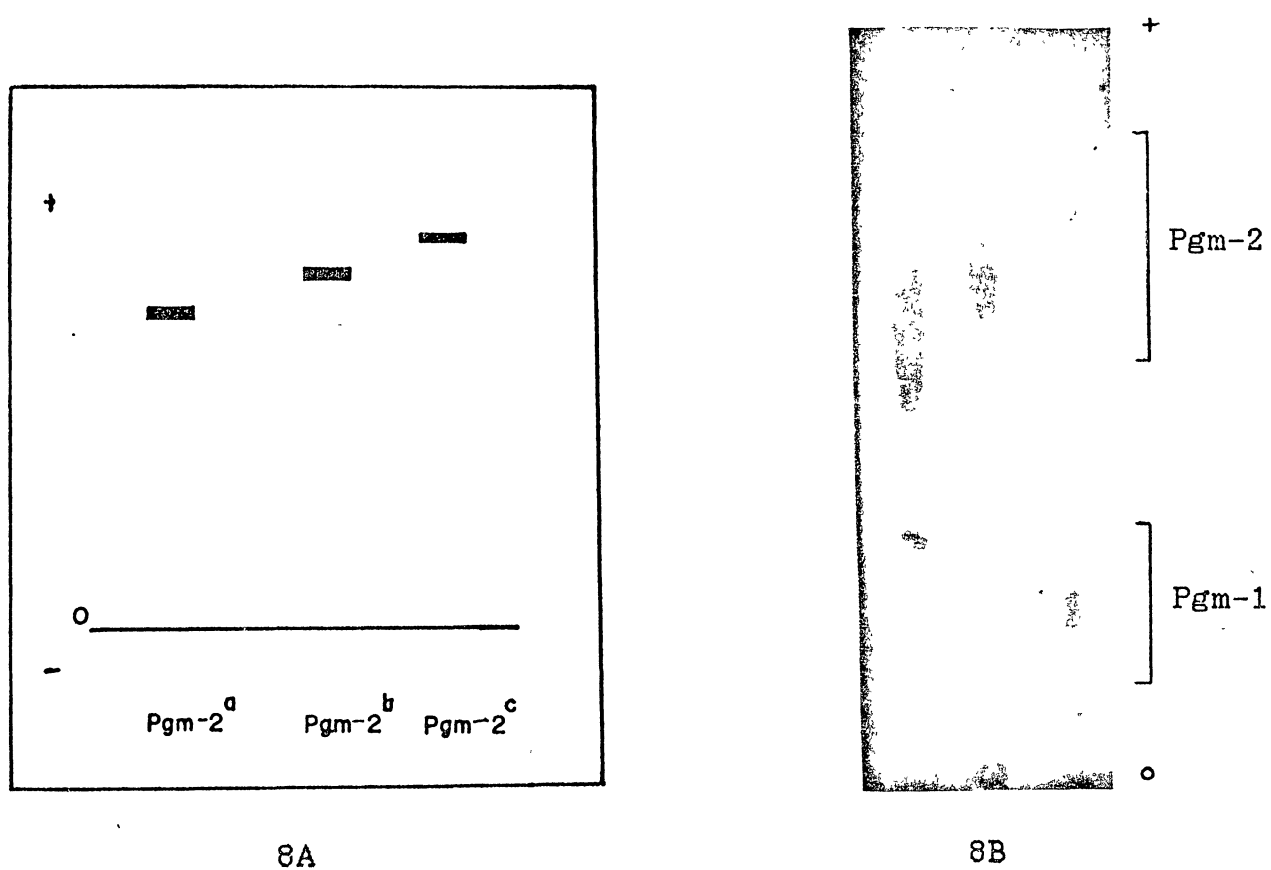


FIGURA III.8A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-2. 8B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgm-2^a, Pgm-2^b e Pgm-2^c, da esquerda para a direita, respectivamente, entre os eletromorfos de migração mais rápida.

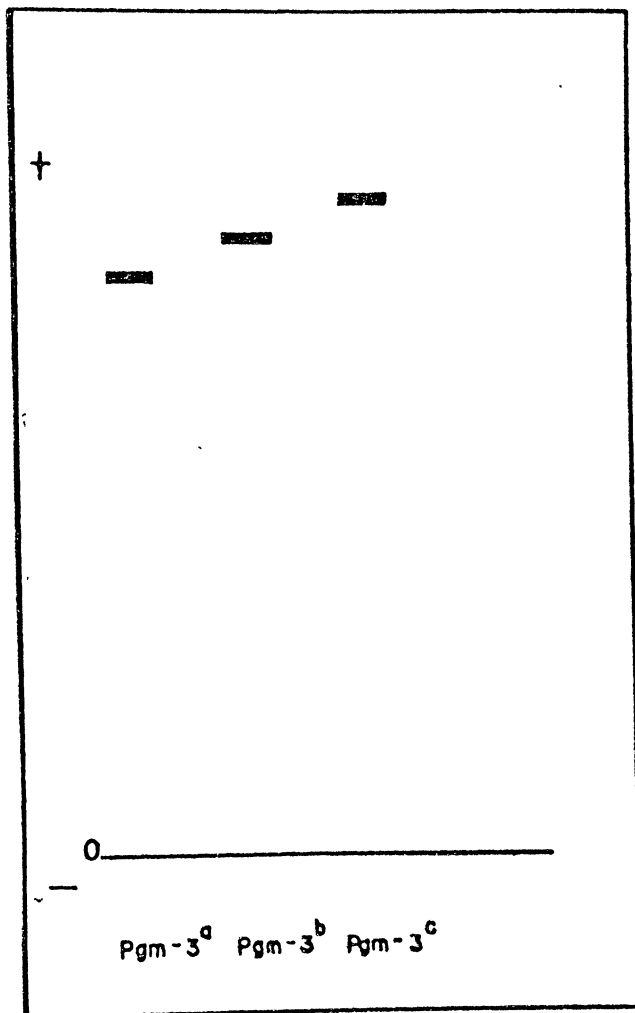
A variação no alelo Pgm-2^b foi de 0.15 ± 0.07 (*A. aff. arviculoides*) a 0.60 ± 0.10 (*Oxymycterus* sp), e no alelo Pgm-2^c, de 0.40 ± 0.15 (*Oxymycterus* sp) a 0.72 ± 0.07 (*Oryzomys delticola*). O alelo Pgm-2^a apresentou pouca variação, uma vez que só foi observado em duas espécies.

O loco Pgm-3 mostrou-se polimórfico somente no gênero *Akodon* (Tabela III.9 e Figura III.9A e 9B); mesmo assim somente *Akodon serrensis* apresentou os três alelos Pgm-3^a, Pgm-3^b e Pgm-3^c. Em *A. aff. arviculoides*, verificou-se a presença de Pgm-3^b e Pgm-3^c, e *A. arviculoides* mostrou-se monomórfico para Pgm-3^c. Foram observados também heterozigotos Pgm-3^a/Pgm-3^c em *A. serrensis*, e Pgm-3^b/Pgm-3^c em *A. aff. arviculoides* e *A. serrensis*. O gênero *Oxymycterus* mostrou-se monomórfico para Pgm-3^c, e os *Oryzomyini*, para o alelo Pgm-3^b. A variação gênica dos dois alelos Pgm-3^b e Pgm-3^c foi, respectivamente, 0.02 ± 0.01 (*A. serrensis*) e 0.63 ± 0.10 (*A. aff. arviculoides*), e 0.37 ± 0.10 (*A. aff. arviculoides*) e 0.97 ± 0.02 (*A. serrensis*).

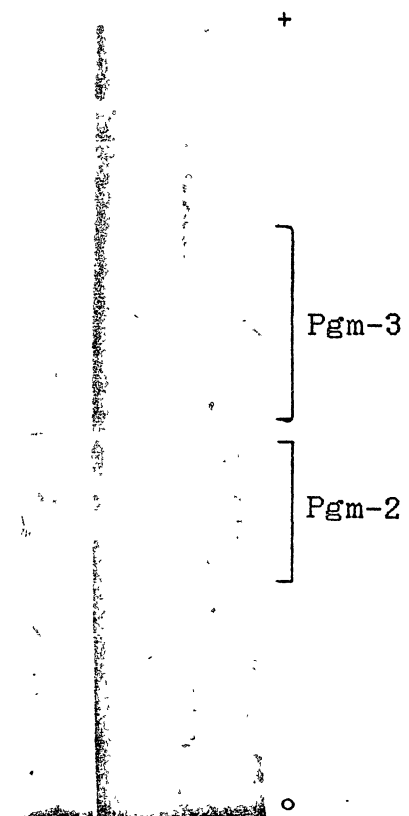
No sistema Pgi verificou-se variação nos três gêneros. Foram observados quatro alelos Pgi^{-a}, Pgi^{-b}, Pgi^{-c} e Pgi^{-d} (Tabela III.10 e Figura III.10A e 10B). *A. serrensis* foi a única espécie a apresentar os quatro alelos; *Oryzomys delticola* apresentou Pgi^{-a}, Pgi^{-b} e Pgi^{-c}; em *A. arviculoides*, *O. intermedius* e *O. flavescens* observaram-se Pgi^{-a} e Pgi^{-c}. Em *A. aff. arviculoides* foi verificado a presença dos alelos Pgi^{-c} e Pgi^{-d} e um heterozigoto Pgi^{-c}/Pgi^{-d}. Em *Oxymycterus* sp detectou-se os alelos Pgi^{-a} e Pgi^{-c} e um heterozigoto Pgi^{-a}/Pgi^{-c}. *Oxymycterus roberti* apresentou somente o alelo Pgi^{-c}. Em *Oryzomys flavescens* também foi encontrado um heterozigoto Pgi^{-a}/Pgi^{-c}. Neste loco, a

TABELA III.9 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Pgm-3, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados				Total	Freqüências gênicas		
	BB	CC	AC	BC		a	b	c
Akodontini								
<i>Akodon serrensis</i>	-	50	1	2	53	0.01	0.02	0.97
<i>A. aff. arviculoides</i>	7	4	-	1	12	0.00	0.63	0.37
<i>A. arviculoides</i>	-	8	-	-	8	0.00	0.00	1.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	14	-	-	14	0.00	0.00	1.00
<i>Oxymycterus sp</i>	-	5	-	-	5	0.00	0.00	1.00
Oryzomyini								
<i>Oryzomys delticola</i>	13	-	-	-	13	0.00	1.00	0.00
<i>O. intermedius</i>	9	-	-	-	9	0.00	1.00	0.00
<i>O. flavescens</i>	13	-	-	-	13	0.00	1.00	0.00



9A

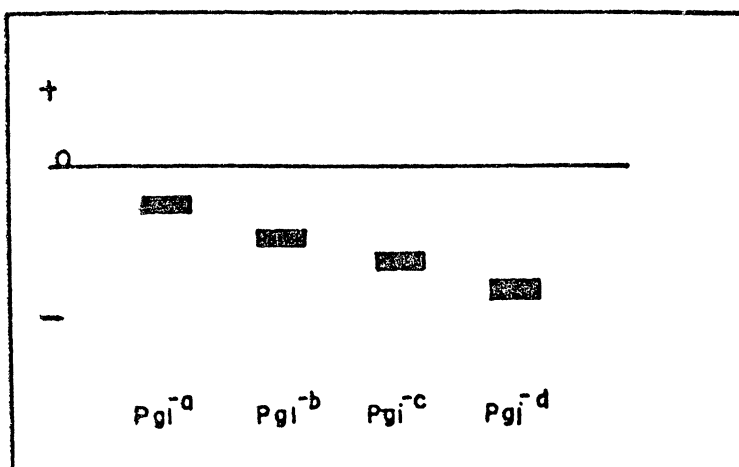


9B

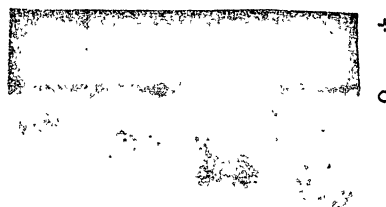
FIGURA III.9A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Pgm-3. 9B - Fotografia de um gel mostrando entre os eletromorfos de migração mais catódica, os fenótipos Pgm-3^a, Pgm-3^b e Pgm-3^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

TABELA III.10 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Pgi, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados						Total	Freqüências gênicas			
	AA	BB	CC	DD	AC	DC		-a	-b	-c	-d
Akodontini											
<i>Akodon serrensis</i>	1	1	49	3	-	-	54	0.02	0.02	0.91	0.05
<i>A. aff. arviculoides</i>	-	-	7	5	-	1	13	0.00	0.00	0.58	0.42
<i>A. arviculoides</i>	1	-	7	-	-	-	8	0.12	0.00	0.88	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	-	14	-	-	-	14	0.00	0.00	1.00	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	1	-	4	-	1	-	6	0.25	0.75	0.00	0.00
Oryzomyini											
<i>Oryzomys delticola</i>	14	1	3	-	-	-	18	0.78	0.05	0.17	0.00
<i>O. intermedius</i>	7	-	2	-	-	-	9	0.78	0.00	0.22	0.00
<i>O. flavescens</i>	13	-	-	-	1	-	14	0.96	0.00	0.04	0.00



10A



10B

FIGURA III.10A - Representação esquemática dos alelos do loco Pgi. 10B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Pgi^a, Pgi^b, Pgi^c e Pgi^d, da esquerda para a direita, respectivamente.

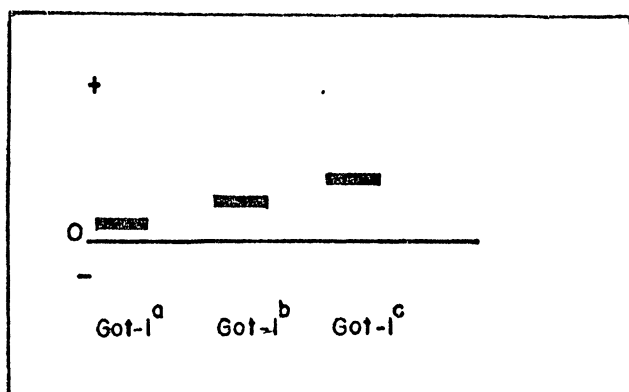
frequência do alelo Pgi^{-a} variou de 0.02 ± 0.01 (*A. serrensis*) a 0.96 ± 0.04 (*O. flavescens*); o alelo Pgi^{-b} oscilou entre 0.02 ± 0.01 (*A. serrensis*) a 0.75 ± 0.31 (*Oxymycterus* sp); Pgi^{-c}, de 0.04 ± 0.04 (*Oryzomys flavescens*) a 0.91 ± 0.03 (*A. serrensis*); e Pgi^{-d} variou de 0.05 ± 0.02 (*A. serrensis*) a 0.42 ± 0.10 (*A. aff. arviculoides*).

Em Got-1 encontrou-se apenas variação inter-específica; a variação intraespecífica somente foi verificada nos Oryzomyini, onde foram encontrados quatro alelos Got-1^a, Got-1^b, Got-1^c e Got-1^d (Tabela III.11 e Figura III.11A e 11B). O genero *Akodon* mostrou-se monomórfico para Got-1^a; em *Oxymycterus* detectaram-se alelos Got-1^a e Got-1^b, sendo que se observaram heterozigotos Got-1^a/Got-1^b; e em *Oryzomys*, verificou-se a presença de Got-1^c, Got-1^d, e heterozigotos Got-1^c/Got-1^d em *O. delticola* e *O. flavescens*. A frequência de Got-1^a variou de 0.10 ± 0.06 (*Oxymycterus roberti*) a 0.50 ± 0.14 (*Oxymycterus* sp); Got-1^b variou de 0.50 ± 0.14 (*Oxymycterus* sp) a 0.90 ± 0.06 (*O. roberti*); Got-1^c oscilou entre 0.17 ± 0.06 (*Oryzomys delticola*) e 0.67 ± 0.11 (*O. intermedius*); e Got-1^d, entre 0.33 ± 0.11 (*O. intermedius*) e 0.83 ± 0.06 (*O. delticola*).

No loco Lap foi observado polimorfismo em quase todas as espécies estudadas: verificou-se a presença de três alelos Lap^a, Lap^b e Lap^c (Tabela III.12 e Figura III.12A e 12B). Todas as espécies do gênero *Akodon* apresentaram os alelos Lap^b e Lap^c, e *A. arviculoides* apresentou somente o alelo Lap^b. Em *Oxymycterus roberti* observou-se a presença de Lap^a e Lap^b, e *Oxymycterus* sp mostrou-se monomórfica para Lap^a. Em *Oryzomys* foi verificada a presença de Lap^a e Lap^c, e observaram-se heterozigotos Lap^a/Lap^c em

TABELA III.11 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Got-1, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados								Total	Freqüências gênicas			
	AA	BB	CC	DD	AB	CD	-----	-----		a	b	c	d
----- Akodontini													
Akodon serrensis	55	-	-	-	-	-	-	55	1.00	0.00	0.00	0.00	
A. aff. arviculoides	13	-	-	-	-	-	-	13	1.00	0.00	0.00	0.00	
A. arviculoides	8	-	-	-	-	-	-	8	1.00	0.00	0.00	0.00	
Oxymycterus roberti	-	11	-	-	3	-	-	14	0.10	0.90	0.00	0.00	
Oxymycterus sp	-	-	-	-	6	-	-	6	0.50	0.50	0.00	0.00	
Oryzomyini													
Oryzomys delticola	-	-	6	6	-	6	-	18	0.00	0.00	0.17	0.83	
O. intermedius	-	-	6	3	-	-	-	9	0.00	0.00	0.67	0.33	
O. flavescens	-	-	1	10	-	3	-	14	0.00	0.00	0.18	0.82	



11A

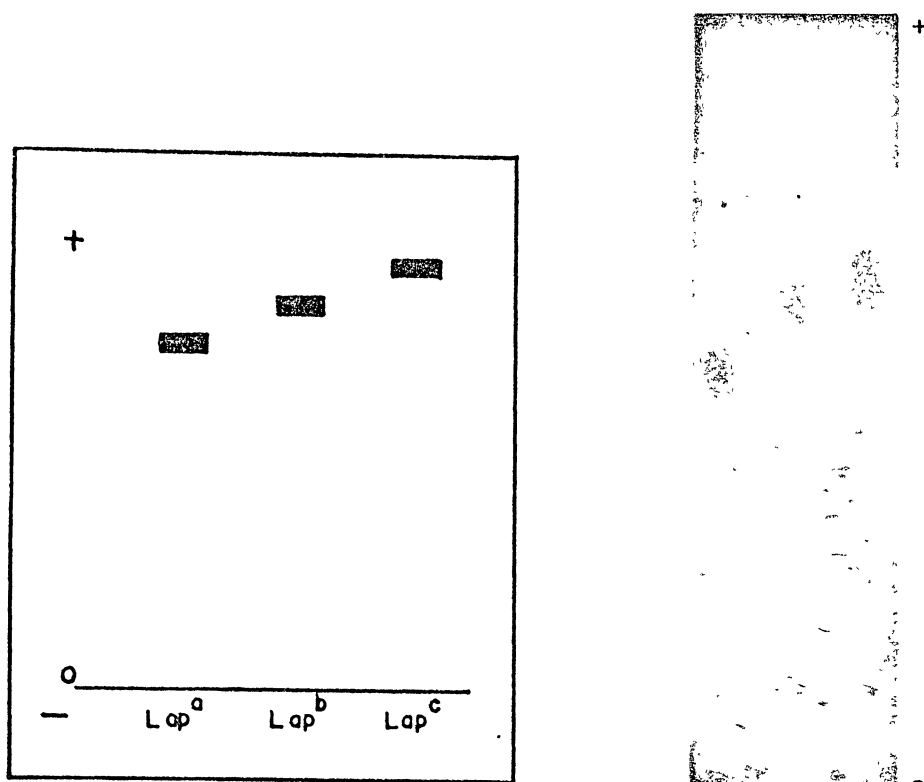


11B

FIGURA III.11A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Got-1. 11B - Fotografia de um gel mostrando na parte superior os fenótipos Got-1^a, Got-1^b e Got-1^c da esquerda para a direita, respectivamente. E na parte inferior, o fenótipo Got-2^a.

TABELA III.12 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Lap, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados				Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC	AC		a	b	c
Akodontini								
Akodon serrensis	-	43	12	-	55	0.00	0.78	0.22
A. aff. arviculoides	-	12	1	-	13	0.00	0.92	0.08
A. arviculoides	-	8	-	-	8	0.00	1.00	0.00
Oxymycterus roberti	13	1	-	-	14	0.93	0.07	0.00
Oxymycterus sp	6	-	-	-	6	1.00	0.00	0.00
Oryzomyini								
Oryzomys delticola	11	-	6	1	18	0.64	0.00	0.36
O. intermedius	7	-	1	1	9	0.83	0.00	0.17
O. flavescens	12	-	2	-	14	0.86	0.00	0.14



12A



12B

FIGURA III.12A - Representação esquemática dos alelos observados no loco Lap. 12B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos Lap^a, Lap^b e Lap^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

Oryzomys delticola e *O. intermedius*. A variação das frequências gênicas nos alelos foi a seguinte: Lap^a variou de 0.6 ± 0.08 (*O. delticola*) a 0.93 ± 0.05 (*Oxymycterus roberti*). Lap^b oscilou entre 0.07 ± 0.05 (*O. roberti*) e 0.92 ± 0.05 (*A. aff. arviculoides* e Lap^c, entre 0.08 ± 0.05 (*A. aff. arviculoides*) e 0.36 ± 0.08 (*Oryzomys delticola*).

O sistema Acp foi o mais polimórfico do presente estudo: apresentou sete alelos, Acp^a, Acp^b, Acp^c, Acp^d, Acp^e, Acp^f e Acp^g (Tabela III.13 e Figura III.13). No gênero *Akodon* foram observados apenas os alelos Acp^d e Acp^f, sendo que todas as espécies apresentaram heterozigotos para estes dois alelos. Em *Oxymycterus*, observaram-se os alelos Acp^b e Acp^f, e heterozigotos Acp^b/Acp^f em ambas as espécies. Em *Oryzomys*, várias combinações de alelos foram observadas, *Oryzomys delticola* apresentou Acp^a, Acp^b, Acp^c, Acp^e e Acp^g e heterozigotos Acp^a/Acp^b, Acp^b/Acp^e e Acp^b/Acp^g. Em *O. intermedius*, foram observados os mesmos alelos e heterozigotos Acp^a/Acp^b, Acp^a/Acp^c, Acp^b/Acp^e e Acp^e/Acp^g, e em *O. flavescens* foi verificada a presença dos alelos Acp^a, Acp^b, Acp^e e Acp^g, e de heterozigotos Acp^a/Acp^b, Acp^b/Acp^e, Acp^b/Acp^g e Acp^e/Acp^g. A variação observada entre as frequências gênicas foi a seguinte: Acp^a oscilou entre 0.12 ± 0.06 (*O. flavescens*) e 0.17 ± 0.09 (*O. intermedius*). O alelo Acp^b variou entre 0.17 ± 0.09 (*O. intermedius*) e 0.50 ± 0.14 (*Oxymycterus* sp); Acp^c oscilou entre 0.11 ± 0.05 (*O. delticola*) e 0.50 ± 0.12 (*O. intermedius*); Acp^d, de 0.54 ± 0.05 (*A. aff. arviculoides*) a 0.69 ± 0.12 (*A. arviculoides*); Acp^e, de 0.11 ± 0.07 (*O. intermedius*) a 0.44 ± 0.08 (*O. delticola*); Acp^f, de 0.31 ± 0.12 (*A. arviculoides*) a 0.57 ± 0.09 (*Oxymycterus roberti*) e Acp^g, de 0.03 ± 0.03 (*Oryzomys delticola*) a 0.31 ± 0.09 (*O. flavescens*).

TABELA III.13 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Acp, por espécie

Tribo/Espécie	Fenótipos observados												Total	Freqüências gênicas						
	BB	CC	DD	EE	FF	AB	AC	BE	BF	BG	DF	EG		a	b	c	d	e	f	g
Akodontini																				
Akodón serrensis	-	-	22	-	14	-	-	-	-	-	17	-	53	0.00	0.00	0.00	0.58	0.00	0.42	0.00
A. aff. arviculoides	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	13	-	14	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.46	0.00
A. arviculoides	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	5	-	8	0.00	0.00	0.00	0.69	0.00	0.31	0.00
Oxymycterus roberti	-	-	-	-	2	-	-	-	12	-	-	-	14	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.57	0.00
Oxymycterus sp	1	-	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	6	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00
Oryzomyini																				
Oryzomys delticola	-	2	-	6	-	5	-	4	-	1	-	-	18	0.14	0.28	0.11	0.00	0.44	0.00	0.03
O. intermedius	-	4	-	-	-	2	1	1	-	-	-	1	9	0.17	0.17	0.50	0.00	0.11	0.00	0.05
O. flavescens	-	-	-	1	-	3	-	1	-	6	-	2	13	0.12	0.38	0.00	0.00	0.19	0.00	0.31

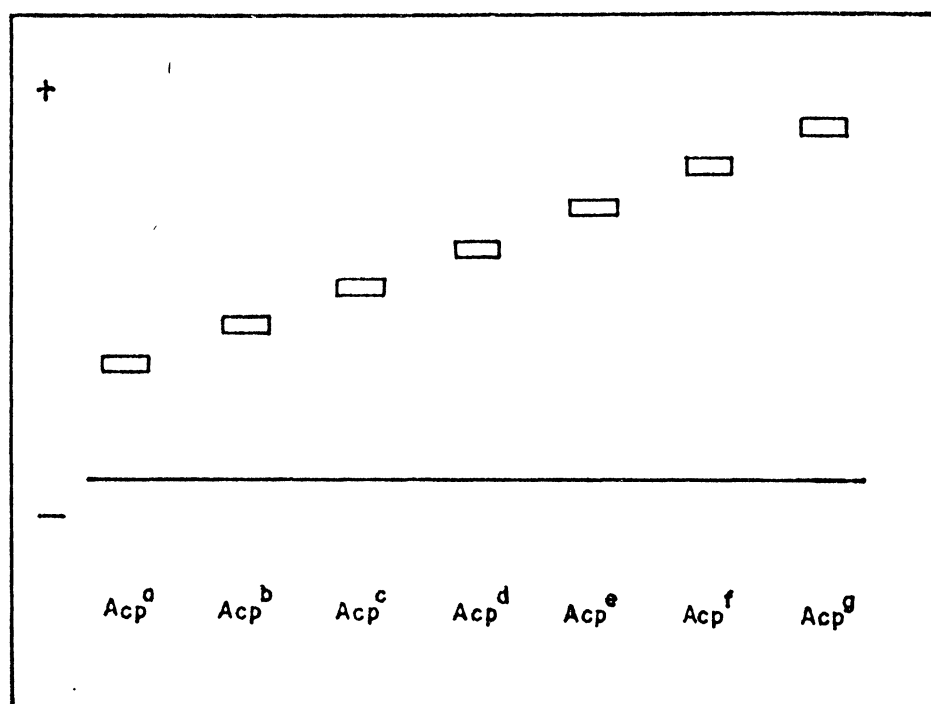


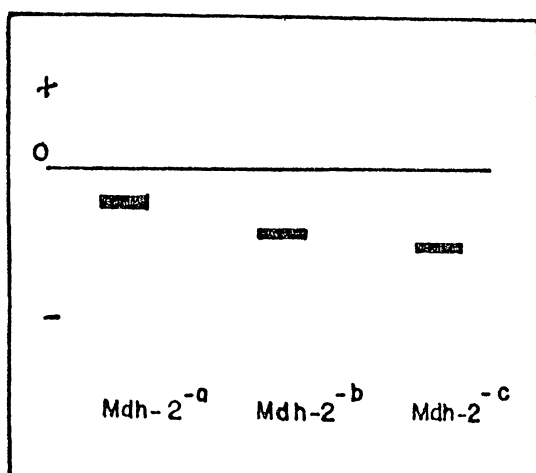
FIGURA III.13 - Representação esquemática dos alelos observados no loco Acp .

Em Mdh-2 verificou-se a presença de três alelos, Mdh-2^{-a}, Mdh-2^{-b} e Mdh-2^{-c} (Tabela III.14 e Figura III.14A e 14B). O gênero *Akodon* apresentou três os alelos em combinações diferentes para cada espécie, *Akodon serrensis* apresentou Mdh-2^{-a}, Mdh-2^{-b} e Mdh-2^{-c}; em *A. aff. arviculoides* foram observados os alelos Mdh-2^{-a} e Mdh-2^{-c}, e em *A. arviculoides*, Mdh-2^{-a} e Mdh-2^{-b}. No gênero *Oxymycterus*, somente se observou o alelo Mdh-2^{-b}. Nos *Oryzomys* observaram-se Mdh-2^{-a} e Mdh-2^{-b}, sendo que em *O. flavescens*, somente se verificou a presença de Mdh-2^{-a}. Nenhum heterozigoto foi detectado neste sistema. A frequência gênica do alelo Mdh-2^{-a} oscilou entre 0.11 ± 0.07 (*O. intermedius*) e 0.94 ± 0.04 (*O. delticola* e *A. serrensis*); a do alelo Mdh-2^{-b}, entre 0.04 ± 0.02 (*A. serrensis*) e 0.89 ± 0.07 (*O. intermedius*) e a do alelo Mdh-2^{-c}, entre 0.02 ± 0.01 (*A. serrensis*) e 0.08 ± 0.05 (*A. aff. arviculoides*).

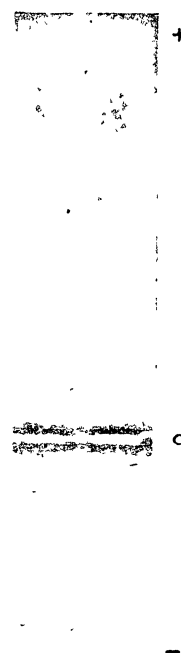
O sistema Idh-1 apresentou uma grande variabilidade intra e interespecífica: foram detectados seis alelos, Idh-1^a, Idh-1^b, Idh-1^c, Idh-1^d, Idh-1^e e Idh-1^f (Tabela III.15 e Figura III.15A e 15B). No gênero *Akodon*, observou-se a presença dos alelos Idh-1^b, Idh-1^c e Idh-1^e e de heterozigotos Idh-1^b/Idh-1^c e Idh-1^c/Idh-1^e. Em *Oxymycterus* foi verificada a presença dos alelos Idh-1^c, Idh-1^a e Idh-1^f, sendo que os dois últimos foram observados somente neste gênero; também se observaram heterozigotos do tipo Idh-1^a/Idh-1^c e Idh-1^c/Idh-1^f. As espécies *Oryzomys delticola* e *O. flavescens* apresentaram os alelos Idh-1^b e Idh-1^c e heterozigotos Idh-1^b/Idh-1^c, *O. intermedius* apresentou Idh-1^c e Idh-1^d e heterozigotos Idh-1^c/Idh-1^d. A variação da frequência gênica no alelo Idh-1^a foi de 0.61 ± 0.09 (*Oxymycterus roberti*) a 0.63 ± 0.17 (*Oxymycterus* sp); o alelo Idh-1^b variou

TABELA III.14 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco Mdh-2, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados			Total	Freqüências gênicas		
	AA	BB	CC		-a	-b	-c
Akodontini							
<i>Akodon serrensis</i>	51	2	1	54	0.94	0.04	0.02
<i>A. aff. arviculoides</i>	12	-	1	13	0.92	0.00	0.08
<i>A. arviculoides</i>	7	1	-	8	0.88	0.12	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	-	14	-	14	0.00	1.00	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	-	4	-	4	0.00	1.00	0.00
Oryzomyini							
<i>Oryzomys delticola</i>	17	1	-	18	0.94	0.06	0.00
<i>O. intermedius</i>	1	8	-	9	0.11	0.89	0.00
<i>O. flavescens</i>	14	-	-	14	1.00	0.00	0.00



14A

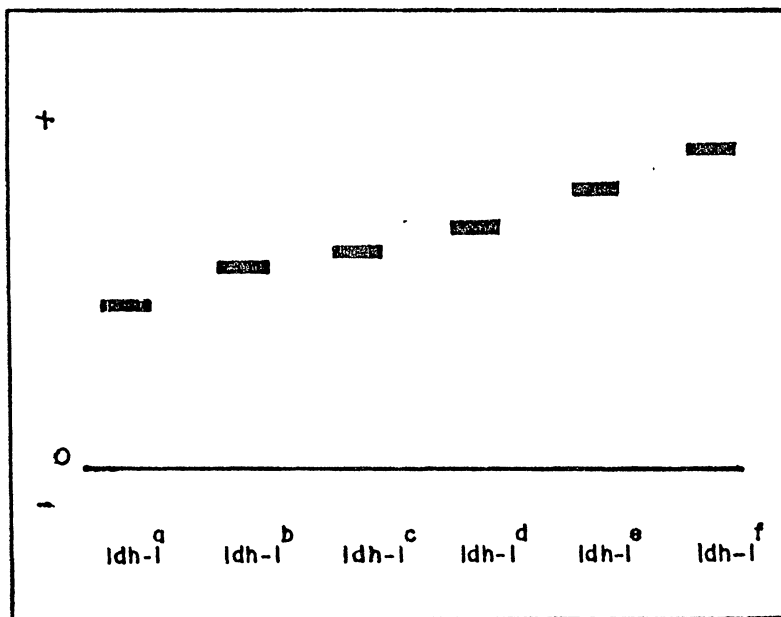


14B

FIGURA III.14.A - Representação esquemática dos alelos do loco Mdh-2. 14B - Fotografia de um gel mostrando na parte superior, o fenótipo Mdh-1^a, e na parte inferior, os fenótipos Mdh-2^a e Mdh-2^c, da esquerda para a direita, respectivamente.

TABELA III.15 - Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Idh-1, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados									Total	Frequências gênicas					
	AA	BB	CC	EE	AC	BC	CD	CE	CF		a	b	c	d	e	f
Akodontini																
<i>Akodon serrensis</i>	-	5	22	-	9	-	15	-	-	51	0.00	0.19	0.67	0.00	0.14	0.00
<i>A. aff. arviculoides</i>	-	-	3	1	-	5	-	4	-	13	0.00	0.19	0.58	0.00	0.23	0.00
<i>A. arviculoides</i>	-	2	1	-	-	1	-	4	-	8	0.00	0.31	0.44	0.00	0.25	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	4	-	-	-	9	-	-	-	1	14	0.63	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	1	-	-	-	3	-	-	-	-	4	0.63	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00
Oryzomyini																
<i>Oryzomys delticola</i>	-	-	12	-	-	6	-	-	-	18	0.00	0.17	0.83	0.00	0.00	0.00
<i>O. intermedius</i>	-	-	8	-	-	-	1	-	-	9	0.00	0.00	0.94	0.06	0.00	0.00
<i>O. flavescens</i>	-	-	12	-	-	1	-	-	-	13	0.00	0.04	0.96	0.00	0.00	0.00



15A



15B

FIGURA III.15A - Representação esquemática dos alelos observados no loco *Idh-1*. 15B - Fotografia de um gel mostrando da esquerda para a direita, respectivamente, os fenótipos, *Idh-1*^a, *Idh-1*^b, e *Idh-1*^c.

entre 0.04 ± 0.04 (*Oryzomys flavescens*) e 0.31 ± 0.12 (*A. arviculoides*); no alelo Idh-1^c a frequência oscilou de 0.36 ± 0.09 (*Oxymycterus roberti*) a 0.96 ± 0.04 (*Oryzomys flavescens*); Idh-1^d não apresentou variação nenhuma, pois foi encontrado em somente uma espécie, *O. intermedius*. O alelo Idh-1^e oscilou entre 0.14 ± 0.03 (*A. serrensis*) e 0.25 ± 0.10 (*A. arviculoides*), o alelo Idh-1^f também não demonstrou variação, pois foi somente detectado em *Oxymycterus roberti*.

O loco Sod demonstrou variação intraespecífica somente no gênero *Oryzomys*, no qual foram visualizados três alelos Sod^a, Sod^b e Sod^c (Tabela III.16 e Figura III.16), nos demais só foi verificado a presença do alelo Sod^a. Em *O. delticola* e *O. flavescens* observou-se os alelos Sod^a e Sod^c e heterozigotos Sod^a/Sod^c, em *O. intermedius* encontraram-se os alelos Sod^a, Sod^b e Sod^c e um heterozigoto Sod^a/Sod^b. A variação gênica foi somente encontrada no alelo Sod^a, que variou entre 0.39 ± 0.11 (*O. intermedius*) e 0.97 ± 0.03 (*O. delticola*), e no Sod^c, de 0.03 ± 0.03 (*O. delticola*) a 0.11 ± 0.07 (*O. intermedius*).

Em G6pd, verificou-se polimorfismo nos três gêneros analisados. Foram detectados quatro alelos G6pd^a, G6pd^b, G6pd^c e G6pd^d (Tabela III.17 e Figura III.17A e 17B). *A. serrensis* foi a única espécie a apresentar os 4 alelos, *A. aff. arviculoides* apresentou G6pd^a, G6pd^b e G6pd^c e *A. arviculoides* apresentou somente G6pd^a e G6pd^b. Em *Oxymycterus*, detectaram-se os alelos G6pd^a e G6pd^b. Tanto *Oryzomys delticola* como *Oryzomys flavescens* apresentaram os alelos G6pd^a, G6pd^b e G6pd^c, e *O. intermedius*, somente G6pd^a e G6pd^c. A variação da frequência gênica do alelo G6pd^a foi de 0.07 ± 0.02 (*A. serrensis*) a 0.92 ± 0.03

TABELA III.16 - Distribuição dos fenótipos observados e frequências gênicas dos alelos do loco Sod, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados					Total	Frequências gênicas		
	AA	BB	CC	AB	AC		a	b	c
Akodontini									
<i>Akodon serrensis</i>	54	-	-	-	-	54	1.00	0.00	0.00
<i>A. aff. arviculoides</i>	13	-	-	-	-	13	1.00	0.00	0.00
<i>A. arviculoides</i>	8	-	-	-	-	8	1.00	0.00	0.00
<i>Oxymycterus roberti</i>	14	-	-	-	-	14	1.00	0.00	0.00
<i>Oxymycterus sp</i>	6	-	-	-	-	6	1.00	0.00	0.00
Oryzomyini									
<i>Oryzomys delticola</i>	18	-	-	-	1	19	0.97	0.00	0.03
<i>O. intermedius</i>	3	4	1	1	-	9	0.39	0.50	0.11
<i>O. flavescens</i>	11	-	-	-	3	14	0.90	0.00	0.10

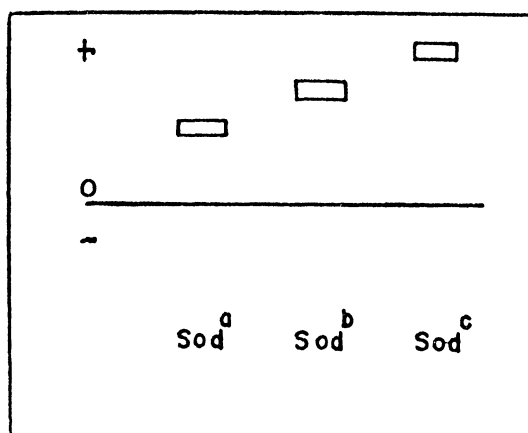
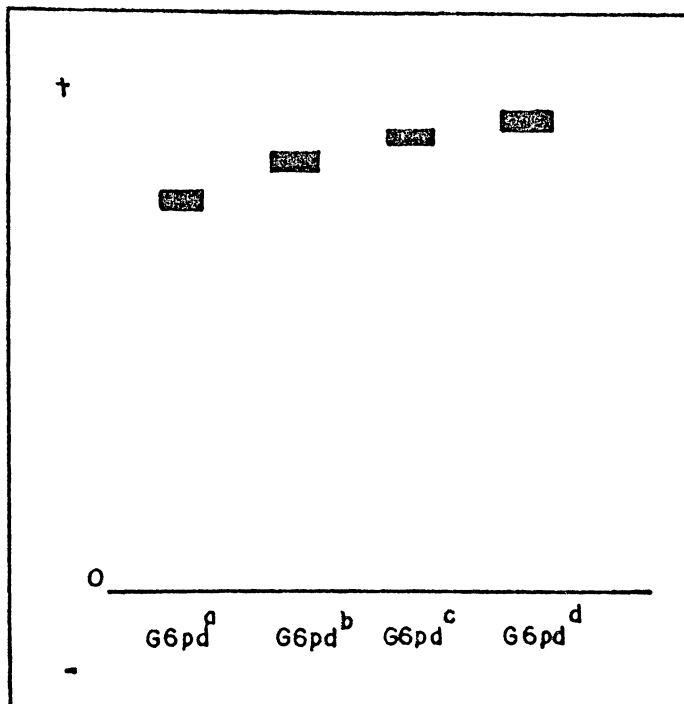


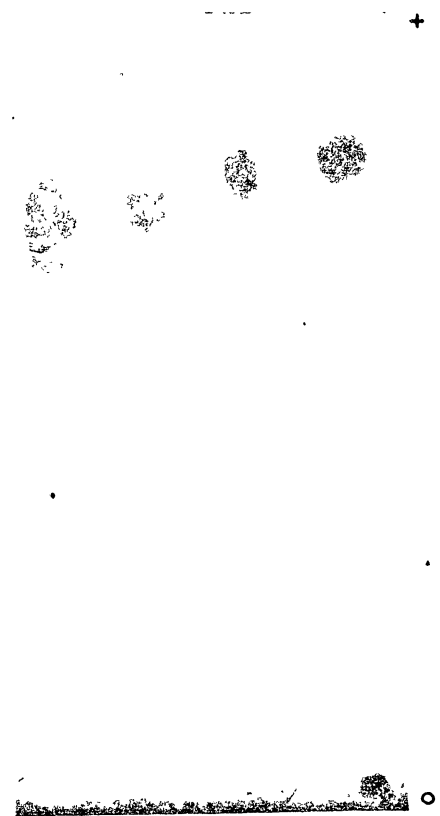
FIGURA III.16 - Representação esquemática dos alelos observados no loco Sod.

TABELA III.17 - Distribuição dos fenótipos observados e freqüências gênicas dos alelos do loco G6pd, por espécie.

Tribo/Espécie	Fenótipos observados				Total	Freqüências gênicas			
	AA	BB	CC	DD		a	b	c	d
Akodontini									
Akodon serrensis	4	40	1	10	55	0.07	0.72	0.02	0.19
A. aff. arviculoides	7	4	2	-	13	0.54	0.31	0.15	0.00
A. arviculoides	5	3	-	-	8	0.63	0.37	0.00	0.00
Oxymycterus roberti	12	1	-	-	13	0.92	0.08	0.00	0.00
Oxymycterus sp	4	2	-	-	6	0.67	0.33	0.00	0.00
Oryzomyini									
Oryzomys delticola	11	3	1	-	15	0.73	0.20	0.07	0.00
O. intermedius	5	-	4	-	9	0.56	0.00	0.44	0.00
O. flavescens	9	1	3	-	13	0.69	0.08	0.23	0.00



17A



17B

FIGURA III.17A - Representação esquemática dos alelos do loco $G6pd$. 17B - Fotografia de um gel mostrando os fenótipos $G6pd^a$, $G6pd^b$, $G6pd^c$ e $G6pd^d$, da esquerda para a direita, respectivamente.

(*Oxymycterus roberti*); o alelo G6pd^b variou entre 0.08 ± 0.05 (*O. flavescens* e *Oxymycterus roberti*) e 0.72 ± 0.04 (*A. serrensis*); G6pd^c oscilou entre 0.02 ± 0.01 (*A. serrensis*) e 0.44 ± 0.12 (*O. intermedius*) e G6pd^d não apresentou nenhuma variação, uma vez que este alelo foi somente verificado em *A. serrensis*.

As estimativas de variabilidade por espécie foram feitas através dos cálculos de heterozigosidade média (\bar{H}) e proporção de locos polimórficos (P). Os valores de \bar{H} variaram de $19\% \pm 5\%$ em *O. intermedius* a $33\% \pm 6\%$ em *A. aff. arviculoides*. Dos 19 locos estudados, 89.5% mostraram-se polimórficos na maioria das espécies, e a proporção de locos polimórficos variou de 50% em *O. delticola* e *O. intermedius*, a 74% em *A. serrensis* e *A. aff. arviculoides* (Tabela III.18).

3.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Na análise filogenética, foram obtidos dois tipos de resultados, os quais estão relacionados com os dois tipos de procedimento utilizados. Na primeira abordagem onde todos os indivíduos da amostra foram considerados, utilizou-se a matriz denominada GEGE.DAT (Tabela III. 19). A partir desta os dados foram analisados como ordenados e não ordenados. Os dados ordenados em três cladogramas, a partir dos quais se elaborou um de consenso (Figura III.18), e neste, fez-se o primeiro TSA. A partir deste, foram feitos o ordenamento simples e o ordenamento complexo. Do ordenamento simples, obtivemos um cladograma que se assemelhou ao primeiro cladograma obtido com os dados não ordenados, no qual o gênero *Akodon* deixou de ser monofilético, unindo-se ao gênero *Oxymycterus* (Figura III.19). Do ordenamento complexo foi obtido um cladograma diferente do

TABELA III.18 - Valores de heterozigosidade média (\bar{H}), e proporção de locos polimórficos (P), por espécie, para as amostras de tamanho superior ou igual a 5.

Tribo/Espécie	N*	H (%)	P (%)
Akodontini			
Akodon serrensis	51	31 ± 6	74
A. aff. arviculoides	11	33 ± 6	74
A. arviculoides	8	23 ± 4	58
Oxymycterus roberti	14	25 ± 6	63
Oryzomyini			
Oryzomys delticola	11	22 ± 5	50
O. flavescens	11	20 ± 6	53
O. intermedius	5	19 ± 5	50

Onde N* corresponde ao número de exemplares analisados por espécie.

TABELA III.19 - Matriz de dados GEGE.DAT, ASE = *Akodon serrensis*; AAV = *A. arviculoides*; AAFA = *A. aff. arviculoides*; OXR = *Oxymycterus roberti*; OXSP = *Oxymycterus* sp; ODL = *Oryzomys delticola*; OIN = *O. intermedius* e OFL = *O. flavescens* (Matriz elaborada conforme dados do apêndice 4)

Caracteres	Alb	Hb	Trf	Pgd	Es-10	Es-6	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Pgi	Got-1	G6pd	Lap	Acp	Mdh-2	Idh-1	Sod
OTU																	
ASE	A	B	A	B	A	B	C	A	D	A	C	A	C	E	A	B	C
AAV	C	B	A	C	B	A	C	B	B	C	C	C	E	E	B	B	C
AAFA	A	A	A	A	D	A	C	A	A	E	C	B	C	E	C	B	C
OXR	E	A	C	B	A	C	A	B	C	F	A	C	A	D	B	A	C
OXSP	D	A	D	C	B	E	A	B	C	D	A	C	D	D	E	C	C
ODL	A	B	A	C	C	B	D	B	B	B	B	B	B	B	B	D	B
OIN	B	A	A	B	B	B	B	B	B	D	B	D	B	A	B	E	A
OFL	A	A	B	B	B	D	D	B	B	D	B	C	B	C	D	D	B

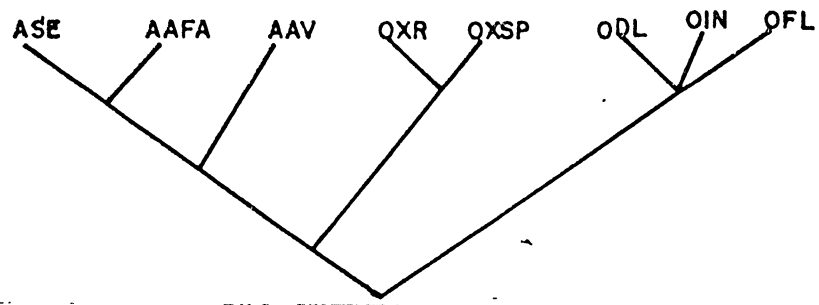


FIGURA III.18 - Cladograma de consenso GEGE 2.OUT, de dados ordenados.

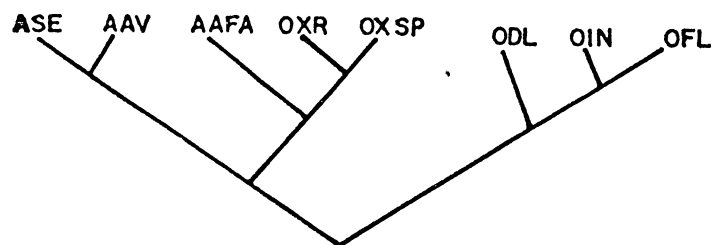


FIGURA III.19 - Cladograma GEGE 41.OUT, resultante de ordenamento simples.

anterior (Figura III.20), a partir do qual se fez outro TSA; e novamente se procedeu com a análise simples e complexa. Da primeira, obteve-se um cladograma igual ao anterior (Figura III.21), e da segunda, um cladograma semelhante ao primeiro de consenso (Figura III.22); portanto, a análise de dados ordenados terminou com este cladograma.

Os dados não-ordenados, resultaram num cladograma no qual as espécies do gênero **Akodon** deixaram de ser monofiléticas, onde *Akodon* aff. *arviculoides* uniu-se com o grupo dos *Oxymycterus* (Figura III.23). Deste fez-se o primeiro TSA, e com estes dados novamente foram feitos ordenamento complexo e simples. O primeiro logo resultou num cladograma igual ao anterior (Figura III.24); portanto, a análise foi encerrada neste cladograma. Do ordenamento simples, obteve-se um cladograma de consenso (Figura III.25), elaborou-se o segundo TSA, e a partir destes dados fez-se novamente o ordenamento simples e o complexo. O primeiro resultou também num cladograma de consenso igual ao anterior (Figura III.26), e o segundo, num cladograma igual ao último obtido na análise com dados ordenados, pela abordagem de análise simples (Figura III.27). Logo a análise dos dados não ordenados finalizou com estes dois cladogramas. De toda a análise de dados ordenados e não ordenados, obtivemos um consenso geral (Figura III.28).

Na segunda abordagem, na qual utilizou-se somente os exemplares que haviam sido tipados para todos os locos, a matriz utilizada foi a ELETRO.DAT (Tabela III.20).

A análise de dados não ordenados desta abordagem, resultou num cladograma de consenso sem muita resolução, por isso

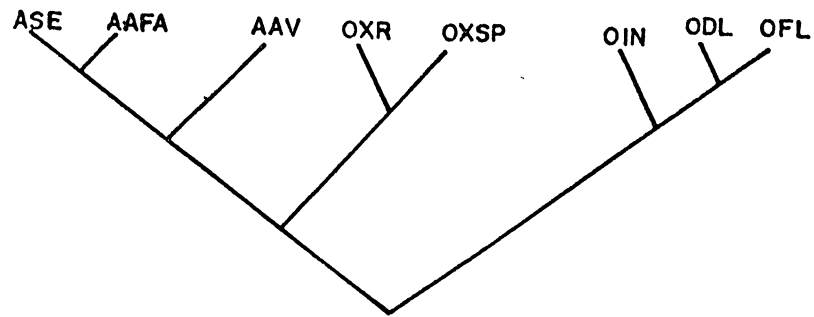


FIGURA III.20 - Cladograma GEGE 4.OUT, resultante de ordenamento complexo

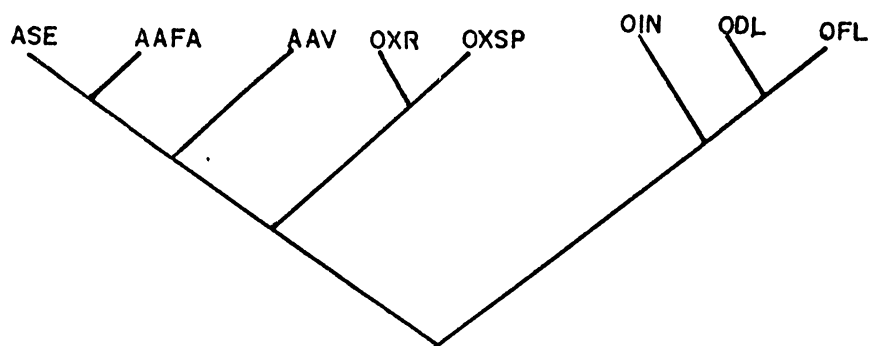


FIGURA III.21 - Cladograma GEGE 51.OUT, resultante de ordenamento simples.

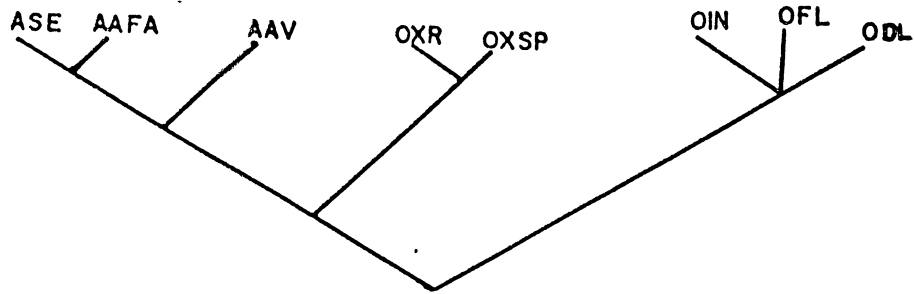


FIGURA III.22 - Cladograma GEGE 5.OUT, resultante de ordenamento complexo.

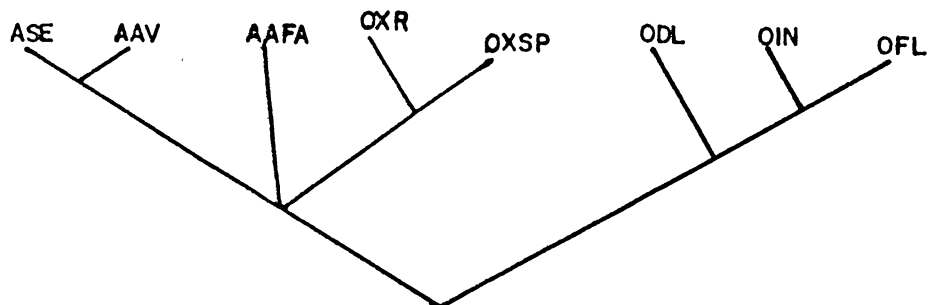


FIGURA III.23 - Cladograma GEGE 21.OUT, resultante de dados não ordenados.

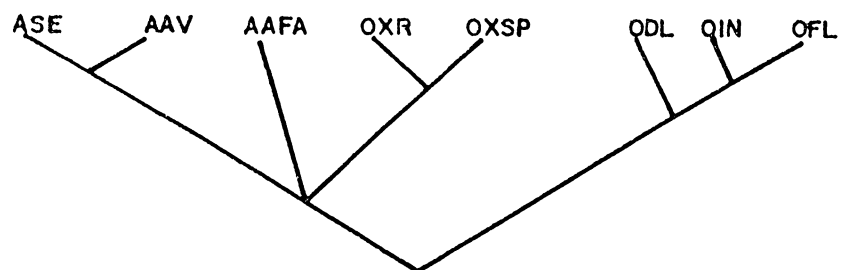


FIGURA III.24 - Cladograma GEGE 6.OUT, resultante de ordenamento complexo.

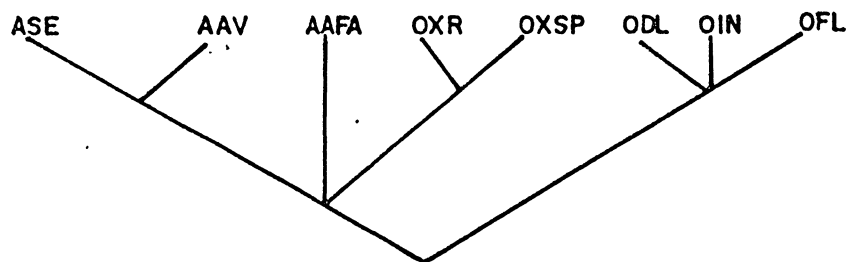


FIGURA III.25 - Cladograma GEGE 61.OUT, cladograma de consenso, resultante de ordenamento simples.

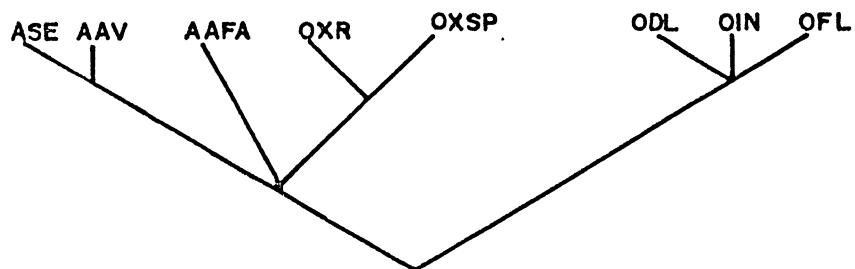


FIGURA III.26 - Cladograma GEGE 71.OUT, cladograma de consenso, resultante de ordenamento simples.

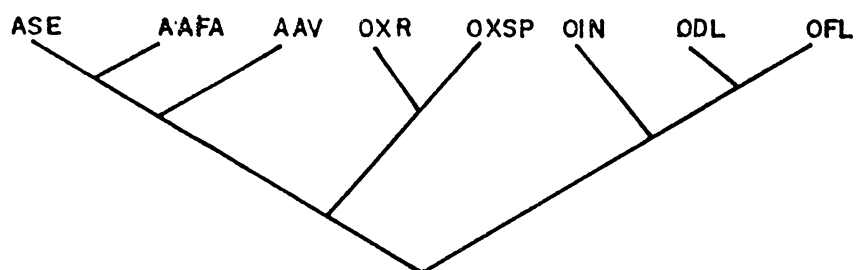


FIGURA III.27 - Cladograma GEGE 7.OUT, resultante de ordenamento complexo.

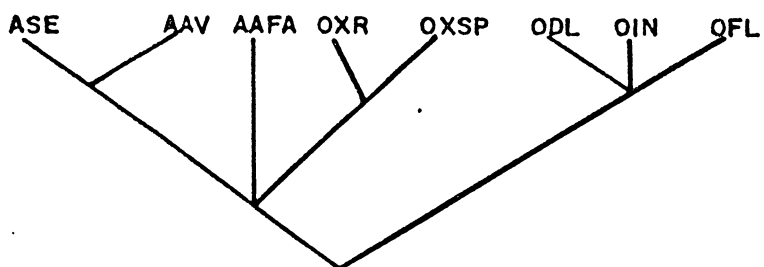


FIGURA III.28 - Cladograma de consenso geral, da matriz GEGE.DAT.

abandonou-se este tipo de análise. Da análise de dados ordenados resultou um cladograma (Figura III.29), do qual se fez o primeiro TSA. Com os dados deste procedeu-se com o ordenamento simples e o complexo. O primeiro resultou num cladograma sem muita resolução, portanto não foi utilizado na análise. E do segundo ordenamento obteve-se outro cladograma (Figura III.30); como este não se assemelhou ao anterior, fez-se o segundo TSA. Tanto o ordenamento simples como o complexo deste TSA resultaram num cladograma igual ao primeiro (Figura III.31), portanto, esta análise foi concluída neste cladograma.

Da análise com o BIOSYS-1 (Matriz POA.DAT, Tabela III.21), resultaram quatro fenogramas obtidos pelo métodos de distância, e dois pelo método de Wagner com distância. Nos quatro primeiros (Figuras III.32, 33, 34 e 35), os agrupamentos mantiveram-se os mesmos, todos os gêneros permaneceram monofiléticos, e as tribos Akodontini e Oryzomyini, separadas.

Naqueles obtidos pelo método de Wagner com distância (Figura III.36 e 37), pode-se observar uma variação no agrupamento dos Akodontini; no cladograma obtido pela distância de Rogers *Akodon aff. arviculoides* ficou mais próximo de *A. serrensis*, como nos fenogramas com distância. Utilizando-se a distância modificada de Rogers, *A. aff. arviculoides* uniu-se com *A. arviculoides*; o restante dos agrupamentos mantiveram-se constantes. A relação entre os outgroup também se manteve constante, e *Oryzomys delticola* sempre se uniu com *O. flavescens*.

Comparando-se os cladogramas resultantes do TSA e do método de Wagner com distância, ambos baseados na parcimônia de

TABELA III.20 - Matriz de dados ELETRO.DAT. ASE = Akodon serrensis; AAV = A. arviculoides; AAFA = A. aff. arviculoides; OXR = Oxymycterus roberti; OXSP = Oxymycterus sp; ODL = Oryzomys delticola; OIN = O. intermedius e OFL = O. flavescens (Matiz elaborada conforme dados do apêndice 5).

Caracteres	Alb	Hb	Trf	Pgd	Es-10	Es-6	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Pgi	Got-1	G6pd	Lap	Acp	Mdh-2	Idh-1	Sod
OTU																	
ASE	A	C	B	B	A	A	C	A	A	B	C	A	C	E	B	B	C
AAV	A	A	B	A	B	A	C	A	B	D	C	B	E	E	C	B	C
AAFA	B	C	A	C	D	A	C	B	D	A	C	C	C	E	A	B	C
OXR	E	A	C	B	B	C	A	B	E	G	A	C	A	D	D	A	C
OXSP	C	B	D	D	B	C	A	B	E	C	A	C	D	D	D	C	C
ODL	A	C	A	C	A	B	D	B	D	C	B	D	B	B	A	D	B
OIN	D	B	A	B	B	B	B	B	C	E	B	C	B	A	A	E	A
OFL	D	A	E	B	C	D	D	B	D	F	B	B	B	C	C	B	B

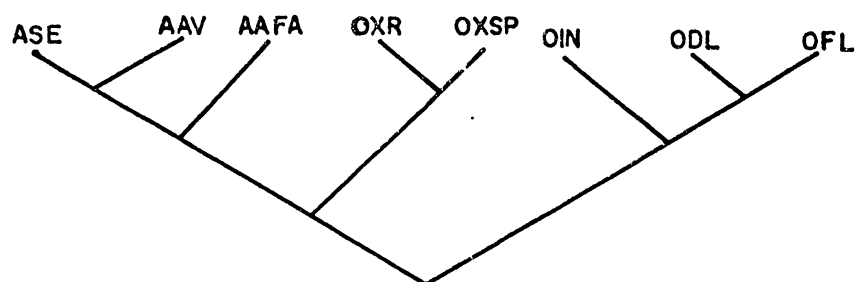


FIGURA III.29 - Cladograma ELETRO 1.10UT, resultante de dados ordenados.

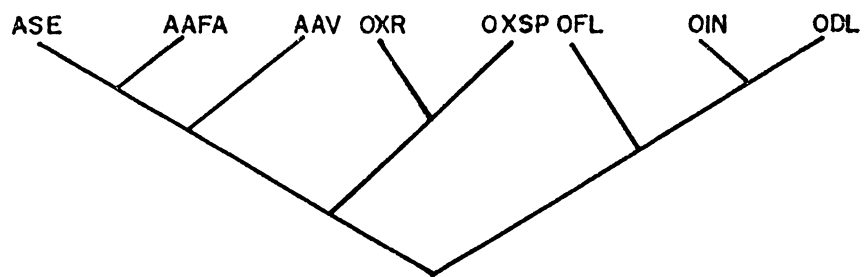


FIGURA III.30 - Cladograma ELETRO 2.OUT, resultante de ordenamento complexo.

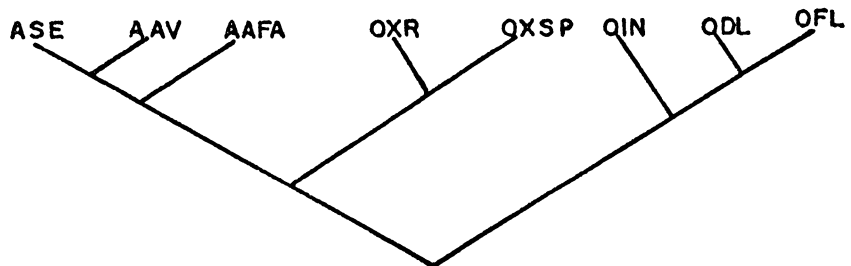


FIGURA III.31 - Cladograma ELETRO 3.OUT, resultante tanto de ordenamento simples como de ordenamento complexo.

TABELA III.21 - Matriz POA.DAT, de freqüências gênicas obtidas à partir de indivíduos tipados para todos os locos, onde ASE = Akodon serrensis, AAFA = A. aff. arviculoides, AAV = A. arviculoides, OXR = Oxymycterus roberti, OXSP = Oxymycterus sp, ODL = Oryzomys delticola, OFL = O. flavescens e OIN = O. intermedius.

OTU / ALELOS	a			b			c			d				Es-10			Es-6		
	A1b	A1b	A1b	Hb	Hb	Hb	Trf	Trf	Trf	Trf	Es-10	Es-10	Es-10	Es-6	Es-6	Es-6			
ASE	.24	.58	.18	.00	.82	.18	.24	.58	.18	.00	.54	.32	.14	.34	.61	.05			
AAFA	.23	.23	.58	.08	.62	.30	.39	.27	.27	.04	.12	.88	.00	.12	.38	.50			
AAV	.25	.00	.75	.00	.88	.12	.25	.38	.25	.12	1.00	.00	.00	.06	.31	.63			
OXR	.00	1.00	.00	.33	.54	.13	.00	.13	.50	.37	.42	.58	.00	.13	.00	.87			
OXSP	.00	.67	.33	.67	.33	.00	.00	.00	.50	.50	.67	.33	.00	.50	.00	.50			
ODL	.73	.13	.14	.00	.43	.57	.50	.13	.30	.07	.30	.43	.27	.10	.90	.00			
OFL	.42	.58	.00	.50	.50	.00	.42	.00	.58	.00	.00	.50	.50	.00	1.00	.00			
OIN	.61	.39	.00	.06	.44	.50	.28	.06	.61	.06	.78	.28	.00	.61	.39	.00			

TABELA III.21 - continuação

OTU / ALELOS	a			b			c			Got-1			
	Pgm-1	Pgm-1	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-2	Pgm-2	Pgm-3	Pgm-3	Pgm-3	Got-1	Got-1	Got-1	Got-1
ASE	1.00	.00	.00	.29	.53	.18	.02	.02	.96	1.00	.00	.00	.00
AAFA	1.00	.00	.00	.12	.23	.65	.00	.65	.35	1.00	.00	.00	.00
AAV	1.00	.00	.00	.00	.31	.69	.00	1.00	.00	1.00	.00	.00	.00
OXR	.17	.83	.00	.00	.50	.50	.00	.00	1.00	.13	.87	.00	.00
OXSP	.50	.50	.00	.00	.67	.33	.00	.00	1.00	.50	.50	.00	.00
ODL	.00	.00	1.00	.00	.27	.73	.00	1.00	.00	.00	.00	.33	.67
OFL	.00	.00	1.00	.00	.42	.58	.00	1.00	.00	.00	.00	.21	.79
OIN	.00	.06	.94	.00	.06	.94	1.00	.00	.00	.00	.00	.78	.22

TABELA III.21 - Matriz POA.DAT - continuação

OTU / ALELO	Idh-1 ^a	Idh-1 ^b	Idh-1 ^c	Idh-1 ^d	Idh ^e	Idh-1 ^f	Sod ^a	Sod ^b	Sod ^c	Gópd ^a	Gópd ^b	Gópd ^c	Gópd ^d
ASE	.00	.15	.54	.00	.31	.00	1.00	.00	.00	.08	.67	.03	.22
AAFA	.00	.15	.72	.00	.13	.00	1.00	.00	.00	.46	.42	.12	.00
AAV	.00	.31	.44	.00	.25	.00	1.00	.00	.00	.63	.37	.00	.00
OXR	.00	.00	.38	.00	.58	.04	1.00	.00	.00	.92	.08	.00	.00
OXSP	.83	.00	.17	.00	.00	.00	1.00	.00	.00	.67	.33	.00	.00
ODL	.00	.23	.77	.00	.00	.00	.93	.00	.07	1.00	.00	.00	.00
OFL	.00	.08	.92	.00	.00	.00	.79	.00	.21	.40	.20	.40	.00
OIN	.00	.00	.94	.06	.00	.00	.39	.50	.11	.61	.39	.00	.00

TABELA III.21 - Matriz POA.DAT - continuação.

OTU / ALELOS	^a Pgd	^b Pgd	^c Pgd	^d Pgd	^{-a} Pgi	^{-b} Pgi	^{-c} Pgi	^{-d} Pgi	^a Lap	^b Lap	^c Lap	^{-a} Mdh-2	^{-b} Mdh-2	^{-c} Mdh-2
ASE	.00	.45	.22	.33	.00	.03	.91	.06	.00	.81	.19	.97	.00	.03
AAFA	.58	.38	.00	.04	.00	.00	.42	.58	.00	1.00	.00	1.00	.00	.00
AAV	.00	.81	.19	.00	.12	.00	.88	.00	.00	1.00	.00	.88	.12	.00
OXR	.00	.33	.42	.25	.00	.00	1.00	.00	.92	.08	.00	.00	1.00	.00
OXS	.00	1.00	.00	.00	.33	.67	.00	.00	1.00	.00	.00	.00	1.00	.00
ODL	.00	.80	.20	.00	.87	.13	.00	.00	.93	.00	.07	.87	.13	.00
OFL	.00	.21	.58	.21	1.00	.00	.00	.00	.83	.00	.17	1.00	.00	.00
OIN	.00	.61	.28	.11	.78	.00	.28	.00	.83	.00	.17	.11	.89	.00

TABELA III.21 - continuação

OTU / ALELOS	a	b	c	d	e	f	g
	ACP	ACP	ACP	ACP	ACP	ACP	ACP
ASE	.00	.00	.00	.54	.00	.46	.00
AAFA	.00	.00	.00	.59	.00	.41	.00
AAV	.00	.00	.00	.50	.00	.50	.00
OXR	.00	.54	.00	.00	.00	.46	.00
OXSP	.00	.42	.00	.00	.00	.58	.00
ODL	.20	.27	.23	.00	.30	.00	.00
OFL	.21	.50	.00	.00	.00	.00	.29
OIN	.11	.10	.56	.00	.11	.00	.12

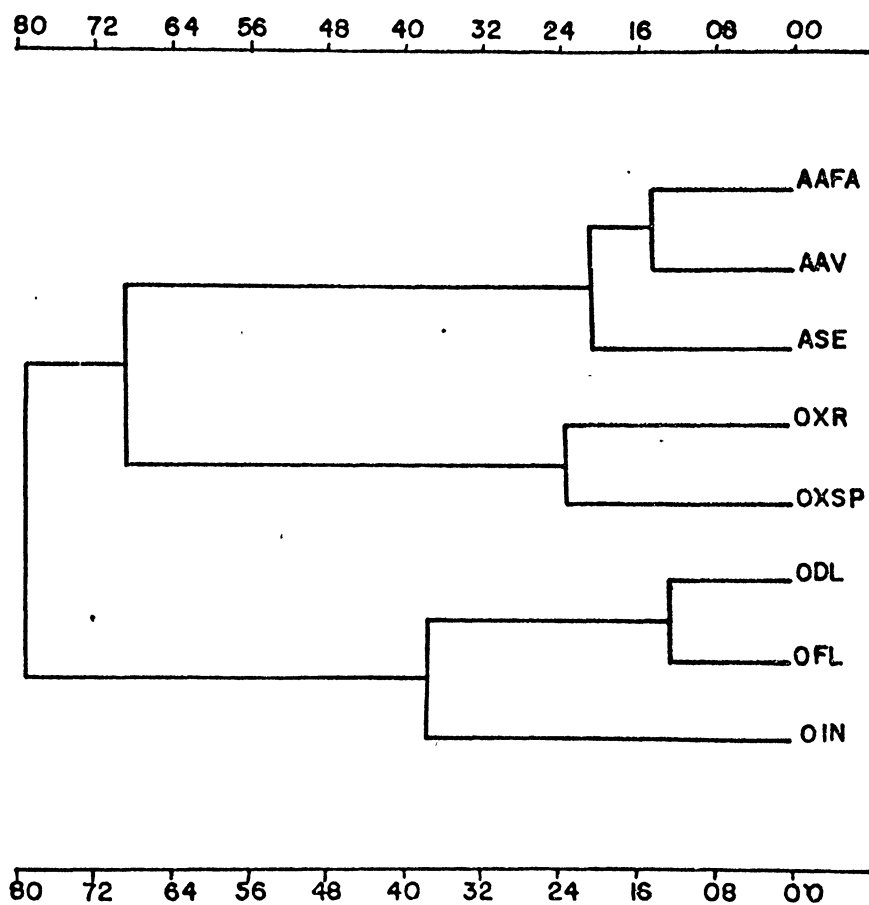


FIGURA III.32 - Fenograma obtido através da distância genética de Nei (Nei, 1972), a escala indica a distância genética entre as espécies.

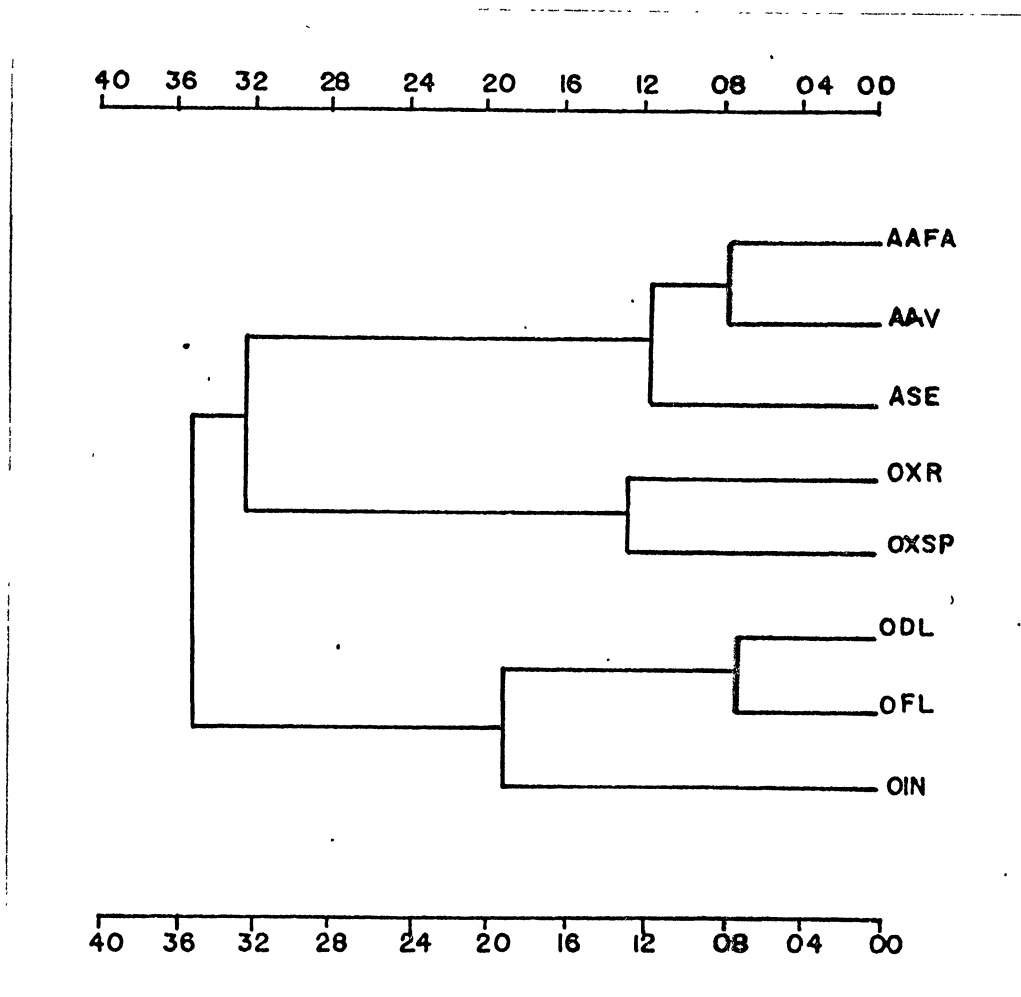


FIGURA III.33 - Fenograma obtido através da distância genética de Nei, (Nei, 1978), a escala indica a distância genética entre as espécies.

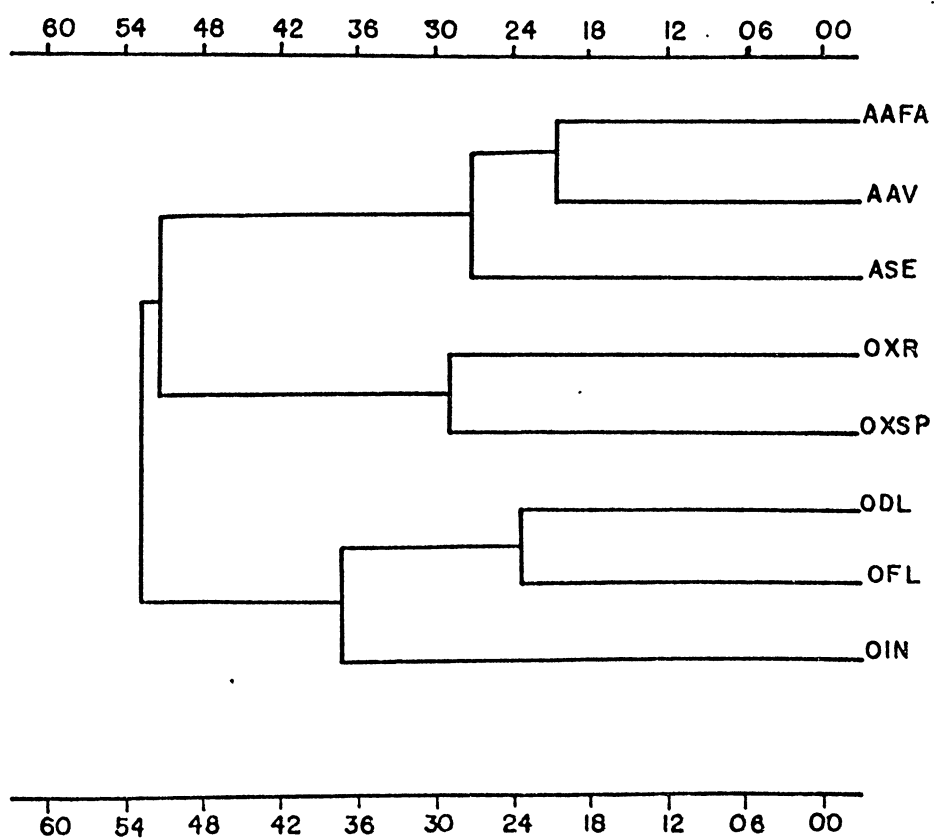


FIGURA III.34 - Fenograma obtido através da distância genética de Rogers (Rogers, 1972), a escala indicca a distância genética entre as espécies.

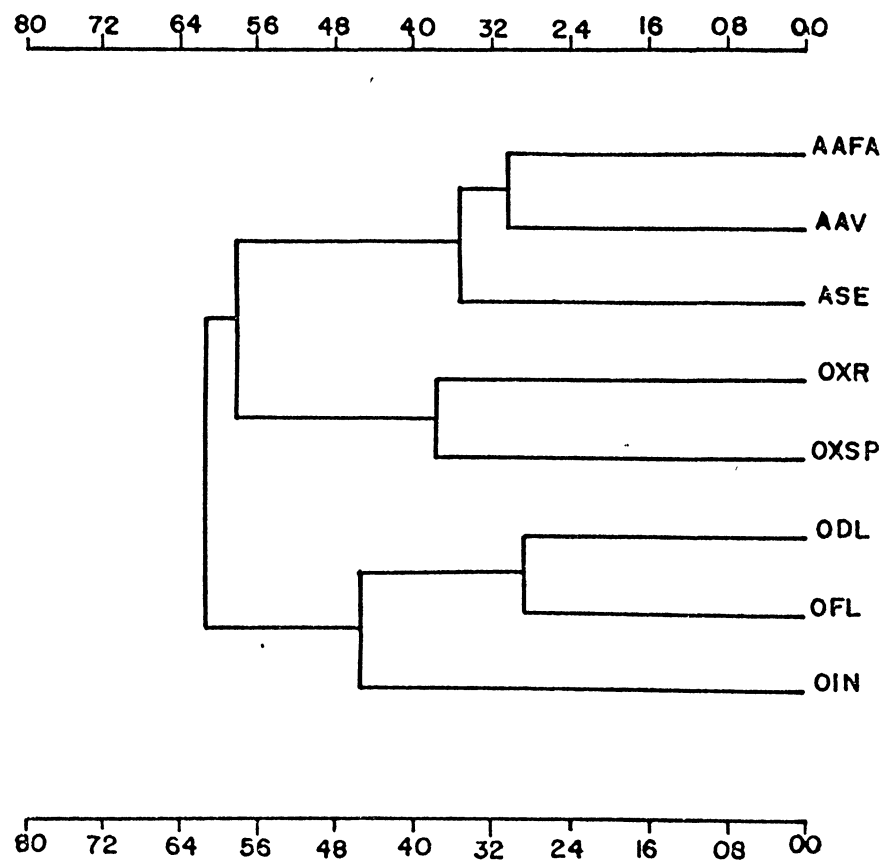


FIGURA III.35 - Fenograma obtido através da distância genética de Rogers modificada (Wright, 1978 citado por Rogers, 1986), a escala indica distância genética entre as espécies.

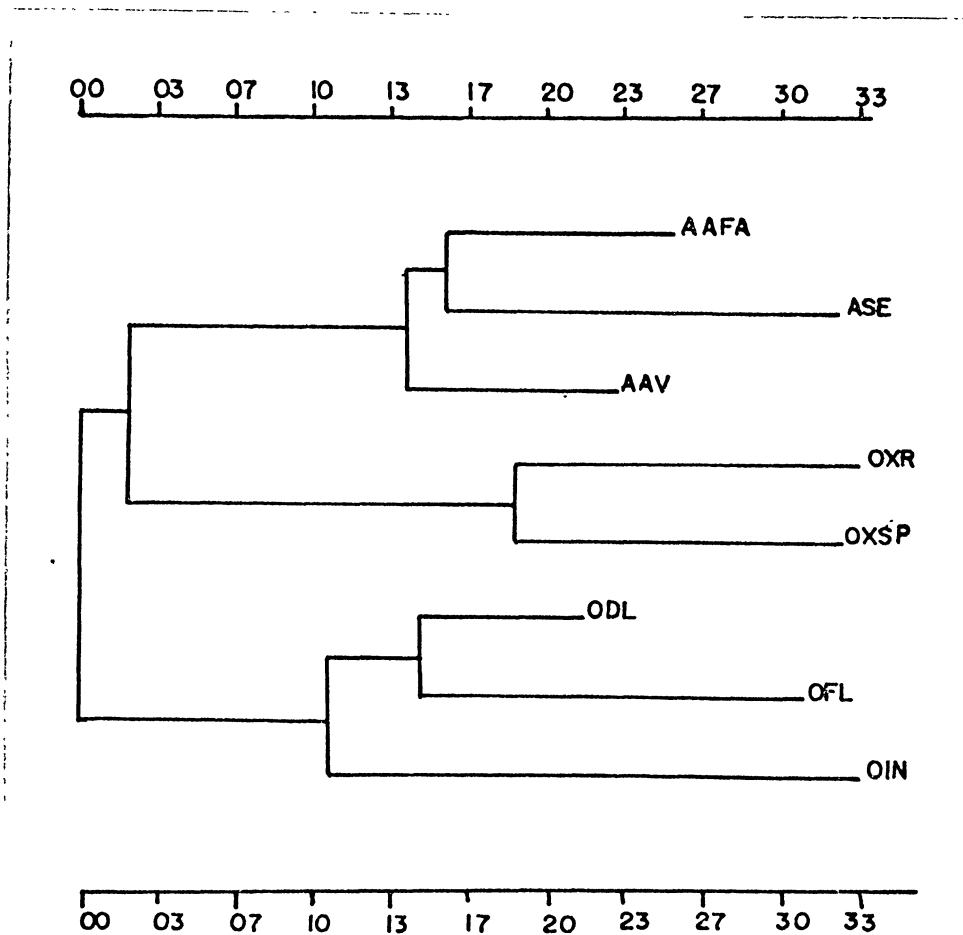


FIGURA III.36 - Cladograma obtido pelo método de Wagner com distância, utilizando-se a distância de Rogers (Rogers, 1972), a escala indica a distância das OTU da raiz.

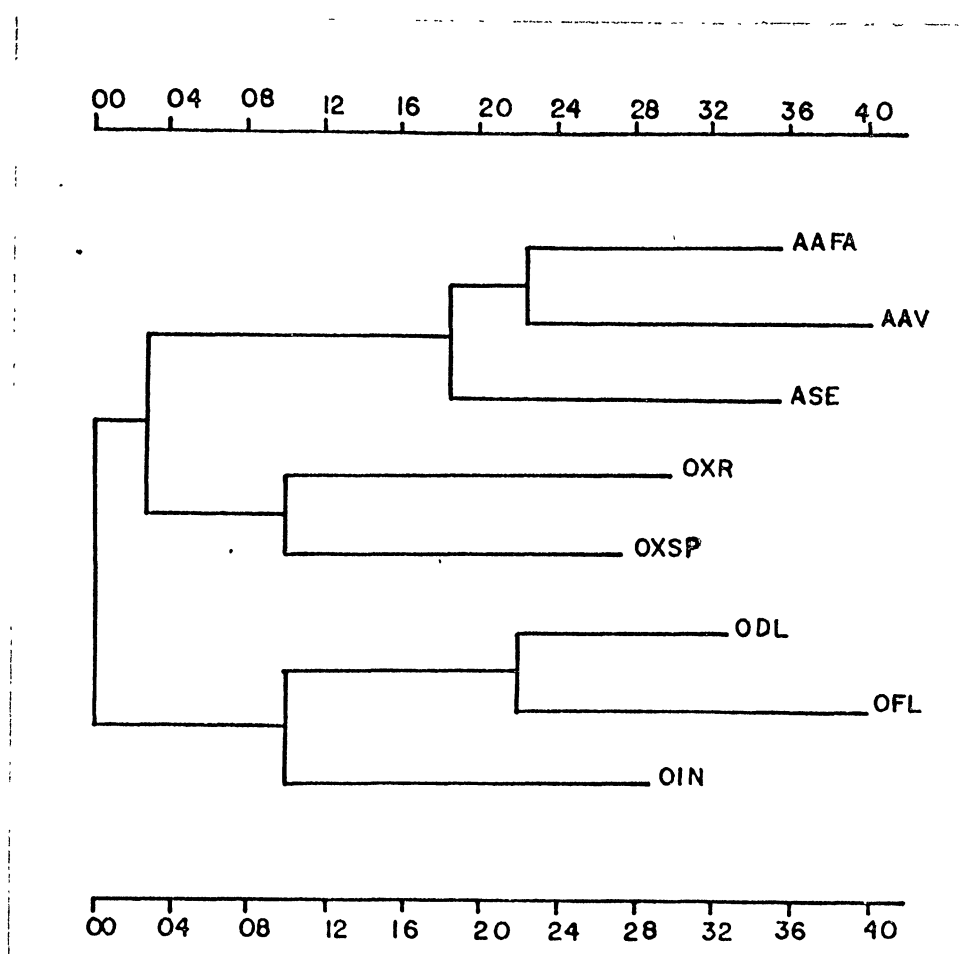


FIGURA III.37 - Cladograma obtido pelo método de Wagner com distância, utilizando-se a distância de Rogers modificada (Wright, 1978, citado por Rogers, 1986), a escala indica a distância das OTU da raiz.

Wagner, observaram-se poucas diferenças entre eles. O agrupamento *A. aff. arviculoides* / *A. serrensis*, observado no cladograma obtido pela distância do Rogers (1972), apareceu algumas vezes nos cladogramas do TSA. Porém, *A. aff. arviculoides* e *A. arviculoides*, agruparam-se somente utilizando-se a distância de Rogers modificada.

IV - DISCUSSAO

4.1 VARIABILIDADE GENÉTICA DA AMOSTRA

Analisando 19 locos, os quais codificam proteínas e enzimas, em 8 espécies da Família Cricetidae, demonstrou-se que, entre estes, 15 foram polimórficos na maioria das espécies estudadas. A variabilidade genética foi analisada pelos parâmetros: heterozigosidade média (\bar{H}) por espécie e proporção de locos polimórficos (P). O primeiro apresentou valores entre 19% e 33% em *Oryzomys intermedius* e *A. aff. arviculoides*, respectivamente. A proporção de locos polimórficos por espécie (P) oscilou entre 50%, também em *O. intermedius*, a 74% em *A. aff. arviculoides*. Como se pode observar, as espécies que apresentaram o maior e o menor valor de \bar{H} , também apresentaram, respectivamente, os maiores e menores valores de P. Assim ficou caracterizado que a espécie *A. aff. arviculoides* possui maior variabilidade, e *O. intermedius* menor variabilidade genética neste estudo.

Os valores de heterozigosidade média obtidos neste trabalho são superiores aos obtidos em cricetídeos norte-americanos. Estudos realizados em 23 espécies mostraram que este parâmetro variou de 1% a 17% naquele continente (Selander e cols., 1971; Johnson e cols., 1972; Mascarello & Shaw, 1973; Smith e cols., 1973; Avise e cols., 1974a, 1974b e 1979; Johnson & Packard, 1974; Zimmerman e cols., 1975; Kilpatrick & Zimmerman, 1975 e 1976b; Loudenslager, 1976; Smith, 1979 e Price & Kennedy, 1980 e 1981. Os valores encontrados nestes trabalhos estão

próximos de 5%, que é o valor proposto por Selander (1976) para roedores. Mesmo os valores mais altos descritos entre os Cricetideos norte-americanos, 13% em *Peromyscus polius* (Kilpatrick & Zimmerman, 1975), 16% em *P. maniculatus* (Loudenslager, 1978) e 17% em *P. sejugis* (Avisé e cols., 1974b), são bastante inferiores aos nossos resultados. Entretanto, nossos resultados assemelham-se aos encontrados entre os cricetideos sulamericanos, 20% para *Calomys musculus* (Gardenal e cols., 1980) e 13 a 19% em *A. dolores* (Apfelbaum & Blanco, 1985). Os valores de P, igualmente altos, também se aproximam entre os encontrados em cricetideos sul-americanos (Apfelbaum & Blanco, 1985 e Gardenal e cols., 1980) diferindo muito de 26%, valor proposto por Selander (1976) para roedores. Os resultados de \bar{H} observados no presente estudo são superiores aos encontrados por Hamel (1985) no único estudo realizado no Brasil com cricetideos, e em *A. azarae*, num estudo realizado na Argentina (Apfelbaum & Blanco, 1985) (Vide Tabela I.2).

O locus Got-2 e Mdh-1 mostraram-se monomórficos em nossos estudos, e também em, respectivamente, 71% e 31% dos estudos com Cricetideos norte-americanos. Os locos que neste estudo apresentaram maior variação, Acp, Idh, Got-1, Pgi, Pgd, G6pd e Trf, mostraram-se muitas vezes monomórficos em cricetideos norte-americanos (Selander e cols., 1971; Johnson e cols., 1972; Smith e cols., 1973; Garten, 1976; Browne, 1977; Smith, 1979; e Price & Kennedy, 1980 e 1981).

Diversas hipóteses são colocadas para explicar este aumento na variabilidade genética. Gillespie e Kojima (1968) sugerem que o grau de variação de uma enzima está relacionado à sua função metabólica, sendo que, de acordo com esta função, as

enzimas podem dividir-se em dois grupos:

GRUPO I : compreende as enzimas com grande especificidade de substratos, integradas num mecanismo fisiológico e, por conseguinte, apresentam menor variação, ou seja, são menos polimórficas. Entre os locos deste grupo, encontram-se Got-1, Got-2, Hxdh, Ldh-1, Ldh-2, Idh-1, Idh-2, Mdh-1, Mdh-2, Sod, Pgd, Pgi, Pgm-1, Pgm-2 e Pgm-3.

GRUPO II : engloba as enzimas com baixa especificidade, tolerando assim um maior grau de variação, são portanto mais polimórficas. Neste grupo podem-se incluir os locos Adh, Es-1, Es-2, Es-3, Es-4, Es-5, Es-6, Acp, Lap e Pep.

Esta idéia foi comprovada por vários estudos (Powell, 1975; Selander, 1976; Gardenal & Blanco, 1985 e Apfelbaum & Blanco, 1985) e também constatada com os dados do presente estudo, onde se pode verificar que a heterozigosidade calculada com enzimas do Grupo II variou entre 20% (*Oryzomys intermedius*) e 50% (*Akodon serrensis*), e foi mais elevada do que os valores de \bar{H} com marcadores do Grupo I, os quais variaram entre 10% (*O. flavescens*) e 32% (*A. aff. arviculoides*) em todas as espécies estudadas. Dos 19 locos analisados no presente estudo, somente quatro (Es-6, Es-10, Acp e Lap) são do grupo II, sendo que Acp foi o loco que apresentou maior variação. Como isto corresponde a uma pequena porcentagem do total de locos analisados, provavelmente não é a única causa para o aumento verificado nos resultados deste trabalho. As proteínas, consideradas como menos variáveis (Selander, 1976) também apresentaram uma grande variação em nossos resultados.

Zouros (1976) sugere que também a estrutura das

enzimas influencia no grau de heterozigosidade, sendo que as enzimas de conformação monomérica apresentam grau de heterozigosidade maior que as multiméricas. Neste trabalho, os locos Pgm-1, Pgm-2, Pgm-3, Lap e Acp codificam para enzimas de estrutura monomérica; entretanto, representam uma pequena porcentagem dos locos analisados.

Powell (1971) sugere que modificações nos valores de \bar{H} podem estar relacionados com variações no ambiente, sendo que será maior em ambientes mais heterogêneos e menor em ambientes mais constantes. Gillespie & Langley (1974), Bryant (1974), Loudeslanger (1978) e Nevo (1978), corroboram com esta idéia, colocando também que um aumento na quantidade de variação genética seria uma estratégia para aumentar a adaptabilidade de uma população frente a um ambiente heterogêneo e incerto. Não dispomos de muitas informações sobre os ambientes nos locais de coleta. Sabe-se somente que os locais situados no município de Piraquara possuíam ambientes bastante modificados (Zotz, 1985). Os outros locais apresentavam, na sua maioria, vegetação secundária, conforme informações obtidas dos responsáveis pela coleta, o que não deixa de ser uma modificação no ambiente. Entretanto, pode-se apenas sugerir que esta possa ser mais uma das causas que acarretaram um aumento na proporção de heterozigosidade média e proporção de locos polimórficos por espécie, no presente trabalho.

Gorman & Renzi (1979) afirmam que as estimativas de heterozigosidade e distância genética são mais afetadas pelo número de locos analisados do que pelo tamanho da amostra. Nei & Roychoudhury (1974) concordam com esta idéia, porém observam que,

se o número de indivíduos da amostra for extremamente pequeno, o desvio de \bar{H} será maior. Deve-se também levar em conta, que uma amostra pequena acarreta perda de informações, o que, conseqüentemente, afetaria os resultados. Algumas espécies estudadas no presente trabalho apresentaram uma amostra relativamente pequena, fator que poderia estar influenciando os resultados obtidos.

Gardenal e cols., (1980); Apfelbaum (1983) e Gardenal & Blanco (1985), sugeriram em seus trabalhos que os roedores sul-americanos apresentam níveis de \bar{H} mais elevados que os norte-americanos; conseqüentemente, apresentam uma variabilidade genética maior. Esta sugestão foi reforçada no presente trabalho. Dentre os estudos com cricetídeos sul-americanos, apenas Hamel (1985) apresentou valores semelhantes aos encontrados em estudos norte-americanos.

Hooper & Musser (1964), Hershkovitz (1972) e Carleton (1973) sugeriram que os cricetídeos norte-americanos e sul-americanos são grupos diferentes. Reig (1984) propôs que os cricetídeos sul-americanos originaram-se a partir de um ancestral norte-americano, que penetrou na América do Sul em princípios do Mioceno.

No presente estudo, alguns alelos foram encontrados somente em uma determinada espécie, ou seja, Pgd^a em *A. aff. arviculoides*, $G6pd^d$ em *A. serrensis*, $Idh-1^f$ em *Oxymycterus roberti* e $Idh-1^d$ e Sod^b em *Oryzomys intermedius*. Não se acreditou que tais alelos fossem característicos destas espécies, definindo-as taxonomicamente, porém sugerimos um número maior de trabalhos nas espécies estudadas para melhor conclusão.

4.3 ANALISE FILOGENETICA

4.3.1 Relações filogenéticas entre as espécies

As abordagens utilizadas, TSA (matrizes GEGE.DAT e ELETRO.DAT), distância genética e método de Wagner com distância (Matriz POA.DAT) resultaram em cladogramas e fenogramas onde as espécies de Akodontini e Oryzomyini formam dois grupos monofiléticos, o que concorda com a hipótese fundamentada em dados morfológicos, de que pertençam a tribos diferentes (Reig, 1981). Esta hipótese, sugerida por Reig (1981), poderia ter sido inconsistente, mas não o foi, uma vez que a raiz foi colocada entre estes grupos *a priori*, quando os Oryzomyini foram assumidos como outgroup.

A tribo Oryzomyini manteve-se sempre monofilética, em todas as abordagens; porém, devido a grande variação das relações interespecíficas, não foi possível estabelecer relações de parentesco entre as espécies. Pode-se verificar apenas que *Oryzomys delticola* e *O. intermedius* uniram-se uma só vez; por outro lado, os agrupamentos *O. flavescens/O. delticola* e *O. flavescens/O. intermedius* foram mais constantes. Nas análises, utilizando-se métodos de distância, o agrupamento *O. delticola/O. flavescens* manteve-se constante, tanto nos fenogramas como nos cladogramas para as diferentes distâncias utilizadas. Este agrupamento foi também encontrado por Hamel (1985), empregando o método da parcimônia de Wagner (Wagner-78) e taxonomia numérica (MINT). Isto sugere que, dentro deste gênero, estas são as espécies que apresentam mais semelhanças a nível enzimático.

Na tribo Akodontini, as espécies do gênero

Oxymycterus sempre se agruparam em todas as abordagens utilizadas: logo, é um agrupamento muito consistente. Entretanto, no gênero *Akodon*, o resultado variou conforme a abordagem. Utilizando-se o TSA, *Akodon serrensis* e *A. arviculoides* mostraram-se sempre agrupados com o gênero *Akodon* e, *A. aff. arviculoides* apresentou posição bastante variável, ora agrupando-se com *A. serrensis*, ora agrupando-se com o grupo dos *Oxymycterus*.

O agrupamento *A. aff. arviculoides/A. arviculoides* não foi observado nenhuma vez nos cladogramas obtidos pelo método do TSA. Porém, foi observado em todos os fenogramas, utilizando-se os diferentes métodos de distância. Entretanto, no cladograma obtido pelo método de Wagner com distância, no qual foi utilizada a distância de Rogers, *A. aff. arviculoides* agrupou-se novamente com *A. serrensis*. Entretanto, Sbalqueiro & Mattevi (1988), utilizando a parcimonia de Wagner (Programa Wagner-78) e dados citogenéticos, verificaram a ancestralidade do gênero *Oxymycterus* entre os Akodontini, e que, *A. aff. arviculoides*, entre os *Akodon*, está mais próximo de *A. serrensis*, que por sua vez está mais próximo de *A. azarae*.

Yonenaga-Yassuda (1979) coloca *A. aff. arviculoides* e *A. arviculoides* como espécies cripticas, e denomina *A. arviculoides* a espécie de $2n=14,15$ e *Akodon* sp, a de $2n=24,25$. Na região sul, por ser *Akodon* sp morfologicamente muito semelhante à *A. arviculoides*, foi denominada *A. aff. arviculoides*

(Sbalqueiro e cols., 1986). A ocorrência de um híbrido estéril de $2n=19,2\emptyset$ (Yonenaga-Yassuda, 1979 e Yonenaga-Yassuda e cols.s 1983), reforça a idéia de serem espécies crípticas, que apresentam uma variação no número cromossômico.

A. serrensis e *A. aff. arviculoides* foram observados mais freqüentemente agrupados nos cladogramas obtidos através do TSA, e *A. aff. arviculoides* e *A. arviculoides* foram constantes nos fenogramas obtidos pelo método de distância. Pode-se dizer que isto seja em decorrência da maneira como são utilizados os dados, pois alelos presentes em baixa freqüência aumentam a semelhança para o método de Mickevich (1982) e não influencia para o método de Wagner com distância. Farris, em 1981 (citado por Rogers, 1986), também coloca que a redução de caracteres à distância, resulta em uma perda de informações sobre a distribuição de alelos particulares entre as espécies.

Como foi verificado, a espécie *A. aff. arviculoides* não apresentou posição filogenética consistente. Possivelmente, os dados eletroforéticos não foram suficientes para definir sua posição filogenética. Pode-se sugerir apenas que tal espécie, por não apresentar maior número de caracteres semelhantes com as espécies do mesmo grupo, agrupou-se com os *Oxymycterus*.

A tribo Akodontini é considerada por Reig (1987), como a mais obscura dentre os roedores sul-americanos; e que os *Akodon* são os akodontinos mais típicos, entretanto, são os mais politípicos, complexos e problemáticos dentro da tribo, e isto se deve ao pouco conhecimento do grupo.

4.2.2 Análise dos diferentes métodos empregados

Quanto aos métodos filogenéticos utilizados observaram-se variações nos resultados de cada um. No método TSA (Mickevich, 1982) esperava-se que o ordenamento complexo resultasse em um cladograma estável mais rapidamente e que fosse também um método mais conservador. Isto se deve ao fato de sua abordagem criar estados intermediários, deste modo refletindo mais os dados contidos no cladograma do que o ordenamento simples. Entretanto, o ordenamento complexo sempre apresentou mais resoluções intermediárias do que o ordenamento simples, antes de resultar num cladograma mais estável. O ordenamento simples, como o proposto pelo método de Mickevich (1982), resultou num cladograma final igual ao inicial para dados ordenados, e diferente do inicial para dados não ordenados. No ordenamento complexo, tanto para dados ordenados como para não ordenados, o cladograma final manteve-se sempre semelhante ao inicial; logo, é uma abordagem mais conservadora, pois mantém a mesma tipologia do cladograma apesar das séries de transformações. Segundo Mickevich (1982), quando o TSA resulta num cladograma diferente do original, ele demonstra uma maior congruência taxonômica entre as séries de dados, ou seja, uma maior similaridade entre os agrupamentos. No presente estudo, isto foi somente observado no ordenamento complexo para dados não ordenados.

Comparando-se os dados ordenados e não ordenados, verificou-se que o ordenamento inicial dos estados influencia no resultado final, contrariando a sugestão de Mickevich (1982) de que isto pouco influenciaria neste tipo de análise.

Outro fenômeno também verificado em nossos

resultados, foi a circularidade dos cladogramas. Alguns cladogramas resultantes do ordenamento simples de dados ordenados repetiam-se no ordenamento complexo de dados não ordenados e vice-versa. Não foi encontrada uma explicação plausível para este fato na revisão bibliográfica realizada. Este resultado pode ser explicado como um evento aleatório dos dados do presente trabalho, e também, consequência do uso de dados simplesmente agrupados, uma vez que tal fenômeno não foi verificado entre os cladogramas resultantes de dados que levavam em conta somente indivíduos tipados para todos os locos.

Observou-se também que considerando-se as duas abordagens deste trabalho, isto é, utilizando dados de todos os indivíduos tipados (matriz GEGE.DAT) e somente os tipados para todos os locos (matriz ELETRO.DAT), os cladogramas da última abordagem apresentaram resolução mais rapidamente que os da primeira e não apresentaram agrupamentos erráticos. Os cladogramas finais das duas abordagens foram semelhantes, com exceção de que *Akodon arviculoides* agrupou-se com *A. serrensis*.

Comparando-se os resultados obtidos pelo programa BIOSYS - 1 (Swofford & Selander, 1981), pode-se verificar que todos os fenogramas assemelharam-se aos cladogramas obtidos pelo método de Wagner com distância. Como os métodos de distância utilizados para estes fenogramas dependem de iguais taxas de evolução, ao contrário do método de Wagner, a presença de agrupamentos em posições quase semelhantes permite sugerir que, possivelmente, tenha ocorrido pouca variação nas taxas de evolução entre as espécies estudadas, com exceção apenas de *A. aff. arviculoides*, que apresentou uma posição mais variável.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Foi coletada em 8 municípios do Paraná (Araucária, Curitiba, Campina Grande do Sul, Morretes, Piraquara, Ponta Grossa, São José dos Pinhais e São Mateus do Sul) uma amostra de 138 roedores pertencentes às tribos Akodontini e Oryzomyini da Família Cricetidae. Esta amostra está distribuída em 8 espécies, *Akodon serrensis* (55); *A. aff. arviculoides* (13); *A. arviculoides* (8); *Oxymycterus roberti* (15); *Oxymycterus* sp (6); *Oryzomys delticola* (18); *O. flavescens* (14) e *O. intermedius* (9). A amostra foi tipada para 14 sistemas protéicos, através de eletroforese horizontal em gel de amido. Analisou-se um total de 19 locos (Alb, Trf, Hb, Idh-1, Mdh-1, Mdh-2, Sod, Lap, Pgi, Got-1, Got-2, Pgd, Pgm-1, Pgm-2, Pgm-3, Es-6, Es-10, G6pd e Acp). As frequências gênicas foram determinadas, e, a partir destas, estimadas a proporção de locos polimórficos (P) e a heterozigosidade média para cada espécie (\bar{H}). Com estes parâmetros foi possível verificar a variabilidade genética da amostra. Para estabelecer relações filogenéticas entre as espécies estudadas foram utilizadas as frequências gênicas dos diversos sistemas estudados e o perfil de alelos de cada loco nas diferentes espécies.

A análise dos resultados obtidos forneceu as seguintes conclusões:

1 - A proporção de locos polimórficos variou de 50% em *O. intermedius* a 74% em *A. aff. arviculoides*, e a heterozigosidade

média, de 19% em *O. intermedius* a 33% em *A. aff. arviculoides*. Portanto, *A. aff. arviculoides* foi a espécie que apresentou a maior variabilidade, neste estudo.

2 - Na análise filogenética, as tribos Akodontini e Oryzomyini separaram-se em 2 grupos monofiléticos.

3 - As espécies *Oryzomys flavescens* e *O. delticola* da tribo Oryzomyini agruparam-se mais vezes nos cladogramas e fenogramas obtidos. Este resultado sugere que sejam espécies próximas.

4 - As duas espécies do gênero *Oxymycterus* foram encontradas agrupadas nos cladogramas e fenogramas de todas as metodologias de análise empregadas; logo, este é um agrupamento muito consistente.

5 - Não foi possível estabelecer relações filogenéticas consistentes entre as espécies do gênero *Akodon*, pois estas apresentaram posições muito variáveis nos cladogramas obtidos pelo método do TSA e nos fenogramas. As espécies consideradas como cripticas, *A. aff. arviculoides* e *A. arviculoides*, agruparam-se somente nos fenogramas. *A. serrensis* e *A. aff. arviculoides* agruparam-se nos cladogramas obtidos pelo TSA e naqueles obtidos pelo método de Wagner com distância, utilizando-se distância de Rogers. Portanto, concluiu-se que, com a metodologia empregada, não foi possível definir uma posição taxonomica para as espécies do gênero *Akodon* estudadas.

6 - Quanto aos métodos filogenéticos, concluiu-se que um ordenamento inicial para os dados a serem abordados pelo TSA influencia nos resultados.

7 - Dentro dos diferentes ordenamentos do método TSA, o complexo foi o que apresentou uma abordagem mais conservadora do que o simples, proposto por Mickevich (1982).

VI - SUMMARY AND CONCLUSIONS

A sample of 138 rodents belonging to the Akodontini and Oryzomyini tribes and Cricetidae Family was collected in 8 towns of Paraná (Araucária, Curitiba, Campina Grande do Sul, Morretes, Piraquara, Ponta Grossa, São José dos Pinhais e São Mateus do Sul). This sample is distributed on 8 species, *Akodon serrensis* (55), *A. aff. arviculoides* (13), *A. arviculoides* (8), *Oxymycterus roberti* (15), *Oxymycterus* sp (6), *Oryzomys delticola* (18), *O. flavescens* (14) and *O. intermedius* (9). It was analysed for 14 proteic systems by horizontal starch gel electrophoresis, 19 loci being analysed (Alb, Trf, Hb, Idh-1, Mdh-1, Mdh-2, Sod, Lap, Pgi, Got-1, Got-2, Pgd, Pgm-1, Pgm-2, Pgm-3, Es-6, Es-10, G6pd and Acp). The genic frequencies were established and from these, the proportion of polymorphic loci (P) and the average heterozigosity per specie (H) were determined; with them, the genetic variability of the sample was verified. The genic frequencies of the loci studied and the combination of alleles from these loci in the different species were used to establish phylogenetics relationships among studied species.

The main conclusions were :

1 - The proportion of polymorphic loci varied from 50% in *O. intermedius*, to 74% in *A. aff. arviculoides*, and the average heterozigosity per specie from 19% in *O. intermedius* to 33% in *A. aff. arviculoides*. Consequently, *A. aff. arviculoides* showed the major variability, in this study.

2 - In the phylogenetics analysis, the Akodontini and Oryzomyini tribes were separated into two monophyletic groups.

3 - The species of Oryzomyini tribe, *Oryzomys flavescens* and *O. delticola*, clustered many times in the cladograms and fenograms obtained. This result suggests that they are close species.

4 - The species of *Oxymycterus* genus were found clustered in all the cladograms and fenograms obtained by the different phylogenetic methods applied; so, this is a consistent clustering.

5 - It was not possible to establish consistent phylogenetic relationship among the species of *Akodon* genus, because they presented different positions in the cladograms obtained by TSA methods and in the fenograms obtained by distance methods. The cryptic species, *A. aff. arviculoides* and *A. arviculoides*, clustered only in fenograms. *A. serrensis* and *A. aff. arviculoides*, clustered in the cladograms obtained by TSA and distance Wagner methods, using Rogers distance. Therefore, it was concluded that, with the applied methodology, it was not possible to establish a taxonomic position for the studied species of the *Akodon* genus.

6 - As for phylogenetics methods, it was concluded, that initial ordering in the data that will be approached by TSA can influence the results.

7 - Among the different types of ordering of TSA method, the complex ordering was the one that presented a more conservative approach than the simple one, that was proposed by Mickevich (1982).

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C.J.R. Brazilian rodents: their habitats and habits. In Mammalian biology in South America. Mares, M.A. & Genoways, H.H. eds. 1982.
- APFELBAUM, L.I. Estudio de polimorfismo en proteínas en poblaciones del género Akodon (Rodentia - Cricetidae). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Córdoba. 1983.
- APFELBAUM, L.I. & BLANCO, A. Genetic similarity between species of Akodon (Rodentia, Cricetidae). J. Exp. Zool., 229:1-5. 1984.
- , Genetic polymorphism in populations of Akodon rodents. Can. J. Genet. Cytol., 27:12-16. 1985.
- ASHLEY, M. & WILLS, C. Analysis of mitochondrial DNA polymorphisms among channel island deer mice. Evolution, 41(4):854-863. 1987.
- AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23:465-481. 1974
- AVISE, J.C.; SMITH, M.H. & SELANDER, R.K. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. VI. The Boylli species group. J. Mamm., 55(4):751-763. 1974a.

- AVISE, J.C.; SMITH, M.H.; SELANDER, R.K.; LAWLOR, T.E. & RAMSEY, P.R. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. V. Insular and mainland species of the subgenus *Haplomylomys*. Syst. Zool., 23(2):226-238. 1974b.
- AVISE, J.C.; SMITH, M.H. & SELANDER, R.K. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. VII. Geographic differentiation in members of the *truei* and *maniculatus* species groups. J. Mammal., 60(1):177-192. 1979.
- AYALA, F.J. Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. Experientia, 39:813-823. 1983.
- BENDER, K.; BISSBORT, S.; KUHN, A.; NAGEL, M. & GUNTHER, E. Genetic variation of an acid phosphatase (Acp-29 in the laboratory rat: possible homology with mouse AP-1 and human ACP-2. Biochem. Genet., 24(1/2):1-11. 1985.
- BENDER, K.; NAGEL, M. & GUNTHER, E. Es-6, a further polymorphic esterase in the rat. Biochem. Genet., 20(3/4):221-228. 1982.
- BLANCO, A. & GARDENAL, C.N. Polimorfismo enzimático en poblaciones de roedores cricetidos. Medicina (Bs. As.), 37(Supl. 3):141-148. 1977.
- BOWMAN, B.H. & BEARN, A.S. The presence of subunits in the inherited group-specific proteins of human serum. Proc. Natl. Acad. Sci., 53:722-729. 1965.
- BROWN, J.H. & WELSER, C.F. Serum albumin polymorphisms in natural

- and laboratory population of *Peromyscus*. J. Mamm., 49:420-426. 1968.
- BROWNE, R.A. Genetic variation in island and mainland populations of *Peromyscus leucopus*. Am. Midl. Nat., 97:1-9. 1977.
- BRYANT, E.H. On the adaptive significance of enzyme polymorphism in relation to environmental variability. Am. Nat., 108(59):1-19. 1974.
- BUENO, A.M.S.; AGOSTINI, J.M.S.; MORAES, J. & RAMOS, A.P.D. Estudos cromossômicos preliminares de roedores da família Cricetidae coletados na Ilha de Santa Catarina. Ciência e Cultura (Supl.), 39(7):746. 1987.
- BUTH, D.G. The application of eletrophoretic data in systematic studies. Ann. Rev. Ecol. Syst., 15:501-522. 1984.
- CABRERA, A. & YEPES, J. Mamíferos sudamericanos. Vida, costumbres y descripción. 2ed. Buenos Aires, Comp. Arg. de Editores, v.1. 1960.
- CARLETON, M.D. A survey of gross stomach morphology in the new world Cricetinae (Rodentia - Muroidea), with comments on functional interpretations. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan. 1-43. 1973.
- CARVALHO, C.T. Lista nominal dos mamíferos brasileiros. Bol. Tec. Inst. Flor., 37:31-115. 1983.
- CHAPMAN, V.M. 6-Phosphogluconate dehydrogenase (PGD) genetics in the mouse: linkage with metabolically related enzyme loci.

- Biochem. Genet., 13(11/12):849-856. 1975.
- CHAPMAN, V.M.; RUDDLE, F.H. & RODERICK, T.H. Linkage of isozymes loci in the mouse: phosphoglucosmutase-2 (Pgm-2), mitochondrial NADP malate dehydrogenase (Mod-2), and dipeptidase-1 (Dip-1). Biochem. Genet., 5:101-110. 1971.
- CHARLES, D.J. & LEE, C. Biochemical and immunological characterization of genetic variants of phosphoglucose isomerase from mouse. Biochem. Genet., 18(1/2): 153- 169. 1980.
- COHEN, B.L. Genetics of plasma transferrins in the mouse. Genet. Res., 1:431-438. 1960.
- DeLORENZO, R.J & RUDDLE, F.H. Genetic control of two electrophoretic variants of glucosephosphate isomerase in the mouse (*Mus musculus*). Biochem. Genet., 3:151-162. 1969.
- , Glutamate oxalate transaminase (GOT) genetics in *Mus musculus*: linkage, polymorphism and phenotypes of the Got-2 and Got-1 loci. Biochem. Genet., 4:259-273. 1970.
- DOLEZALOVA, V. & BRADA, Z. Serum protein heterogeneity in some inbred rat strains studied by electrophoretic methods. Comp. Biochem. Physiol. 26:301-309. 1968.
- FARRIS, J.S. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. Amer. Natur., 106(951):645-668. 1972.
- FELSENSTEIN, J. Manual of PHYLIP (V.3.0). University of Washington. 1987.

- FINLAY, M.F. & HUANG, L.L. A new variant of serum leucine aminopeptidase in the mouse: its development and possible regulation. Biochem. Genetic, 23(1/2):169-180. 1985.
- GARDENAL, C.N. & BLANCO, A. Polimorfismo enzimático en *Calomys musculinus*: nueva estimación. Mendeliana, 7(1):3-12. 1985.
- GARDENAL, C.N.; SABATTINI, M.S. & BLANCO, A. Enzyme polymorphism in a population of *Calomys musculinus* (Rodentia, Cricetidae). Biochem. Genet., 18(5/6):563-575. 1980.
- GARTEN JR., C.T. Relationships between aggressive behavior and genic heterozygosity in the oldfield mouse, *Peromyscus polionotus*. Evolution, 30:59-72. 1976.
- GILLESPIE, J.H. & KOJIMA, K. The degree of polymorphism in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 61:582-585. 1968.
- GILLESPIE, J.H. & LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. Genetics, 76: 837-848. 1974.
- GORMAN, G.C. & RENZI JR., J. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: effects of sample size. Copèia, 2:242-249. 1979.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. Bio Science:21(18):939-944. 1971.
- HAFNER, M.S. A biochemical investigation of Geomyoid systematics

- (Mammalia : Rodentia). Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.
20:118-130. 1982.
- HAMEL, A.R. Variabilidade protéica, relações fenéticas e cladísticas em roedores (Cricetidae) do Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética, UFRGS, Porto Alegre. 1985.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphism in man. Proc. Roy. Soc. B., 164:298. 1966.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. Average heterozygosity per locus in man: an estimated based on the incidence of enzyme polymorphism. Ann. Hum. Genet., 36:9-20. 1972.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland. Amsterdam. 1976.
- HERSHKOVITZ, P. The recent mammals of the neotropical zoogeographic and ecological review. In: Evolution, Mammals and Southern Continents. A. KEAST; F.C. ERK & B. GLASS, eds. State University of New York Press. Albany. 1972.
- HONEYCUTT, R.L.; EDWARDS, S.V.; NELSON, K. & NEVO, E. Mitochondrial DNA variation and the phylogeny of African mole rats (Rodentia: Bathyergidae). Syst. Zool., 36(3):280-292. 1987.
- HOOPER, E.T. & MUSSER, G.G. The glans penis neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of muroid rodents. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan, 123:1-57. 1964.

- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudobscura*. Genetics, 54:577-579. 1966.
- JOHNSON, G.L. & PACKARD, R.L. Electrophoretic analysis of *Peromyscus comanche blair*, with comments on its systematic status. Occas. Papers Mus. Tex. Tech. Univ., 24: 1-16. 1974.
- JOHNSON, W.E.; SELANDER, R.K.; SMITH, M.H. & KIM, Y.J. XIV. Biochemical genetics of sibling species of the cotton rat (*Sigmodon*). Studies in Genetics VII. Univ. Texas Publ., 7213:297-305. 1972.
- KASAHARA, S. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal variability in *Akodon* sp (Rodentia-Cricetidae). Cytologia, 47:317-324. 1982.
- KILPATRICK, C.W. & ZIMMERMAN, E.G. Genetic variation and systematics of four species of mice of the *Peromyscus boylii* species group. Syst. Zool., 24: 143-162. 1975.
- Hemoglobin polymorphism in in the encinal mouse *Peromyscus pectoralis*. Biochem. Genet., 14(1/2):137-143. 1976a.
- Biochemical variation and systematics of *Peromyscus pectoralis*. J. Mamm., 57(3):506-522. 1976b.
- KLUGE, A.G. & FARRIS, J.S. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool., 18:1-32. 1969.

- LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and the degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudobscura*. Genetics, 54:595-609. 1966.
- LOUDENSLAGER, E.J. Variation in the genetic structure of *Peromyscus* populations. I. Genetic heterozygosity - its relationship to adaptive divergence. Biochem. Genet., 16(11/12):1165-1179. 1978.
- MASCARELLO, J.T. & SHAW, C.R. Analysis of multiple zymograms in certain species of *Peromyscus*, Rodentia: Cricetidae. Texas Rep. Biol. Med., 31(3):507-518. 1973.
- MICKEVICH, M.F. Transformation series analysis. Syst. Zool., 31(4):461-478. 1982.
- MICKEVICH, M.F. & MITTER, C. Treating polymorphic characters in systematics: a phylogenetic treatment of electrophoretic data. In V.A. Funk and D.R. Brooks (eds). Advances in cladistics: Proceedings of the first meeting of the Willi Hennig Society. New York Bot. Garden, Bronx. pp. 45-58. 1981.
- MICKEVICH, M.F. & MITTER, C. Evolutionary patterns in allozyme data: a systematic approach. In: N.I. Platnick and V.A. Funks (eds.). Advances in cladistics, vol.2. Proceedings of the second meeting of the Willi Hennig Society. Columbia Univ. Press., New York, pp 169-176. 1983.
- MOOJEN, J. Os roedores do Brasil. Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro. 1952.

- NADEAU, J.H.; KOMPFF, J.; SIEBERT, G. & TAYLOR, B.A. Linkage of Pgm-3 in the house mouse and homologies of three phosphoglucomutase loci in mouse and man. Biochem. Genet., 19(5/6):465-474. 1981.
- NEI, M. Genetic distance between populations. Amer. Natur., 949(106):283-292. 1972.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89:583-590. 1978.
- NEI, M. & ROYCHOUDURY, A. K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics, 76:379-390. 1974.
- NEVO, E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theor. Pop. Biol., 13:121-177. 1978.
- NICHOLS, E.A. & RUDDLE, F.H. A review of enzyme polymorphism, linkage and electrophoretic conditions for mouse and somatic cell hybrids in starch gels. J. Histochem. Cytochem., 12(21):1066-1081. 1973.
- PADUA, R.A.; BULFIELD, G. & PETERS, J. Biochemical genetics of a new glucosephosphate isomerase allele (Gpi-1^c) from wild mice. Biochem. Genet., 16(1/2):127-143. 1978.
- PATTON, J.L.; SHERWOOD, S.W. & YANG, S.Y. Biochemical systematics of chaetopidine pocket mice, genus *Perognathus* J. Mamm., 62(3):477-492. 1981.
- PETERS, J. & NASH, H.R. Polymorphism of Esterase-10 in *Mus musculus*. Biochem. Genet., 14(1/2):119-125. 1976.

- POWELL, J.R. Genetic polymorphisms in varied environments.
Science, 174: 1035-1036. 1971.
- POWELL, J.R. Protein variation in natural populations of animals
In Evolutionary Biology. vol 8. T. Dobzhansky, M.K. Hecht &
W.C. Steere. eds Plenum Press. New York. 1975.
- PRICE, P.K. & KENNEDY, M.L. Genic relationships in the
white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*, and the cotton mouse
Peromyscus gossypinus. Americ. Midl. Nat., 103(1):73-82.
1980.
- Genetic variation in the deer mouse
Peromyscus maniculatus, in a small geographic area
Genetica, 57:65-74. 1981.
- RASMUNSEN, D.I. JENSEN, J.N. & KOEHN, R.K. Hemoglobin
polymorphism in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. Bioch.
Genet., 2:87-92. 1968.
- REIG, O. Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos
de América del Sur. Monogr. Naturae, Mus. Munic. Cienc. Nat.
"Lorenzo Scaglia", 1:1-161. 1981.
- Distribuição geográfica e história evolutiva dos
roedores muroideos sulamericano (Cricetidae: Sigmodontinae)
Rev. Brasil. Genet., 7(2):333-365. 1984.
- An assessment of the systematics and evolution of the
Akodontini, with the description of the new fossil species
of *Akodon* (Cricetidae : Sigmodontinae). Fieldiana Zoology
39:347-399. 1987.

- RIEGER, T.T; WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P. & ZANCHIN, N.I.T.
Variabilidade protéica em *Akodon aff. arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). Ciência e Cultura (Supl.), 40(7):777. 1988.
- ROBBINS, L.W.; SMITH, M.H.; WOOTEN, M.C. & SELANDER, R.K.
Biochemical polymorphism and its relationship to chromosomal and morphological variation in *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus gossypinus*. J. Mamm., 66(3):498-510. 1985.
- ROGERS, J.S. IV. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII. Univ. Texas Publ., 7213: 145-153. 1972.
- . Deriving phylogenetic trees from allele frequencies. Syst. Zool., 33(1):52-63. 1984.
- . Deriving phylogenetic trees from allele frequencies: a comparison of nine genetics distances. Syst. Zool., 35(W):297-3
- SANTOS, J.F.; SILVA, R.S. & SILVA, L.M. da. Padrões eletroforéticos da transferrina em roedores de Pernambuco. Ciência e Cultura (Supl.), 38:888. 1986.
- SBALQUEIRO, I.J.; CORDEIRO, C.T.; QUELUZ, G.F.; BORGES, C.R.; ZOTZ, C.; LOS, M.M. & MATSUMOTO, J.Y. Análises cariotípicas em roedores cricetideos de duas localidades do Paraná. Ciência e Cultura (Supl.), 39(7):735. 1987.
- SBALQUEIRO, I.J.; KAKU, M.; LACERDA, M.; EL ACHKAR, D. & ARNT, L.R. Estudos cromossômicos em roedores da Família Cricetidae coletados no Paraná. Ciência e Cultura (Supl.), 38(7):927. 1986.

- SBALQUEIRO, I.J. & MATTEVI, M.S. Estudo cladístico através das homologias de bandas G em sete espécies de roedores do Sul do Brasil. Ciência e Cultura (Supl.), 40(7):759. 1988.
- SBALQUEIRO, I.J.; ZOTZ, C; JABLONSKI, E.F.; OLIVEIRA, L.F.B. & MATTEVI, M.S. Estudos citotaxonômicos em *Akodon serrensis* (Rodentia-Cricetidae) no Estado do Paraná. Ciência e Cultura (Supl.), 37(7):704. 1985.
- SCHMITT, L.H. Mitochondrial iso-citrate dehydrogenase variation in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii*. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet., 8:73-78. 1977.
- SELANDER, R.K. Genic variation in natural populations. In: Molecular Evolution. F. J. Ayala. ed. Sinauer. Sunderland. 1976.
- SELANDER, R.K.; SMITH, M.H.; YANG, S.Y.; JOHNSON, W.E. & GENTRY, J.B. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics VI. Univ. Texas Publ., 7103:49-90. 1971.
- SELANDER, R.K. & YANG, S.Y. Protein polymorphism and genic heterozygosity in a wild population of the house mouse (*Mus musculus*). Genetics, 63:653-667. 1969.
- SHOWS, T.B.; CHAPMAN, VM. & RUDDLE, F.H. Mitochondrial malate dehydrogenase and malic enzyme: mendelian inherited eletrophoretic variants in the mouse. Biochem. Genet., 4:707-718. 1970.
- SHOWS, T.B.; RUDDLE, F.H. & RODERICK, T.H. Phosphoglucomutase

- electrophoretic variants in the mouse. Biochem. Genet. 3:25-35. 1969.
- SILVA, F. Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 1984.
- SMITH, M.F. Geographic variation in genic and morphological characters in *Peromyscus californicus*. J. Mamm., 60(4):705-722. 1979.
- SMITH, M.H.; SELANDER, R.K. & JOHNSON, W.E. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* III. Variation in the Florida deer mouse (*Peromyscus floridanus*), a Pleistocene relict. J. Mamm., 54(1):1-13. 1973.
- SMITHIES, O. Zone electrophoretic in starch gels: group variation in the serum proteins of normal adults. Biochem. J., 61:629-641. 1955.
- SPOTORNO, A.E. & WALKER, L.I. Análisis electroforético y biométrico de dos especies de *Phyllotis* en Chile Central y sus híbridos experimentales. Rev. Chilena de Hist. Nat., 56:51-59. 1983.
- SWOFFORD, D.L. PAUP User's Manual (V.2.4.1). Illinois Natural History Survey, Illinois. 1985.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.K. BIOSYS-1: a Fortran program for comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Hered., 72:281-283. 1981.
- VAUGHAN, T.A. Mammalogy. W. B. Saunders Co. Philadelphia. 1972.

- VIEIRA, C. Roedores e lagomorfos do Estado de São Paulo. Arq. Zool. (São Paulo), 8:129-167. 1953.
- WHITE, A.; HANDLER, P. & SMITH, E.L. Principios de Bioquímica - Guanabara Koogan. 5 ed. 1976.
- WILEY, E.O. Phylogenetics : The Theory and Practice of Phylogenetic Systematic. Wiley, New York. 1981.
- WILKINSON, J.H. Isozymes. 2 ed. Chapman and Hall Ltd. 1970.
- WOMACK, J.E.; LYNES, M.A. & TAYLOR, B.A. Genetic variation of an intestinal leucine arylaminopeptidase (Lap-1) in the mouse and its location on chromosome 9. Biochem. Genet., 13(9/10):511-518. 1975.
- WOMACK, J.E. & SHARP, M. Comparative autossomal linkage in mammals. Genetics of Esterases in *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. Genetics, 82:665-675. 1976
- YONENAGA-YASSUDA, Y. New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia, Cricetidae). Cytogenet. Cell. Genet., 23:241-249. 1979.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; L'ABBATE, M. & CHU, T.H. Bandas de alta resolução e padrões de replicação do cromossomo X no genero *Akodon*. Ciência e Cultura (Supl.) 35(7):680. 1983.
- ZIMMERMAN, E.G.; HART, B.J. & KILPATRICK, C.W. Biochemical genetics of the Truei and Boyleii groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). Comp. Biochem. Physiol., 52B:541-545. 1975.

ZOTZ, C. Contribuição à Ecologia e Sistemática de Cricetidae (Mammalia, Rodentia) de Piraquara, Paraná, Brasil. Tese de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Zoologia, UFPR. 1985.

ZOUROS, E. Hibrids molecules and superiority of the heterozygote. Nature, 262:227-229.

APÊNDICE 1 - Dados utilizados no cálculo da heterozigosidade média

Espécie / Loco	Alb	Hb	Trf	Es-10	Es-6	Pgd	Pgi	Lap	Mdh-1	Mdh-2	Idh-1	Sod	G6pd	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-1	Got-2	Acp
Akodon serrensis	51	51	51	51	50	47	50	51	51	50	50	50	51	51	50	47	51	50	49
A. aff. arviculoides	6	11	6	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	11	11	11
A. arviculoides	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Oxymycterus roberti	14	12	12	13	14	13	14	14	14	14	14	15	13	13	13	14	14	14	14
Oryzomys delticola	6	11	-	11	11	5	11	11	11	11	11	15	6	11	11	-	11	11	11
O. intermedius	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
O. flavescens	5	11	6	10	11	10	11	11	11	11	11	11	10	11	10	10	11	11	11
Total	95	104	88	109	110	101	110	103	111	110	110	115	104	110	108	92	111	110	108

APÊNDICE 2 - Dados utilizados na análise filogenética (simplesmente agrupados).

Espécie / Loco	Alb	Hb	Trf	Es-10	Es-6	Pgd	Pgi	Lap	Mdh-1	Mdh-2	Idh-1	Sod	G6pd	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-1	Got-2	Acp
<i>Akodon serrensis</i>	55	55	55	55	54	51	54	55	55	54	51	54	55	55	53	50	55	54	53
<i>A. aff. arviculoides</i>	12	13	12	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	12	13	13	13
<i>A. arviculoides</i>	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>Oxymycterus roberti</i>	14	12	12	13	14	13	14	14	14	14	14	15	13	13	13	14	14	14	14
<i>Oxymycterus sp</i>	6	6	5	6	6	5	6	6	6	4	4	6	6	5	5	6	6	6	6
<i>Oryzomys delticola</i>	15	16	13	16	18	14	18	18	18	18	18	18	15	18	18	13	18	18	18
<i>O. intermedius</i>	9	8	9	9	9	9	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<i>O. flavescens</i>	12	14	13	13	14	13	14	14	14	14	12	14	13	14	13	13	14	14	13

APÊNDICE 3 - Dados utilizados na análise filogenética (somente indivíduos tipados para todos os locos).

Espécie	Número de indivíduos tipados
Akodon serrensis	34
A. aff. arviculoides	9
A. arviculoides	8
Oxymycterus roberti	12
Oxymycterus sp	3
Oryzomys delticola	7
O. intermedius	8
O. flavescens	5

APÊNDICE 4 - Caracteres e estados utilizados na elaboração da Matriz GEGE.DAT, obtidos a partir da transformação de frequências gênicas

Caráter	Combinação de alelos	Estado
Alb	a b c Alb , Alb , Alb	A
	a b Alb , Alb	B
	a c Alb , Alb	C
	b c Alb , Alb	D
	b Alb	E
Hb	a b c Hb , Hb , Hb	A
	b c Hb , Hb	B
Trf	a b c d Trf , Trf , Trf , Trf	A
	a b c Trf , Trf , Trf	B
	b c d Trf , Trf , Trf	C
	a c d Trf , Trf , Trf	D
Pgd	a b d Pgd , Pgd , Pgd	A
	b c d Pgd , Pgd , Pgd	B
	b c Pgd , Pgd	C
Es-6	a b c Es-6 , Es-6 , Es	A
	a b Es-6 , Es-6	B
	a Es-6	C
	b Es-6	D
	a c Es-6 , Es-6	E

Es-10	Es-10 ^a , Es-10 ^b , Es-10 ^c	A
	Es-10 ^a , Es-10 ^b	B
	Es-10 ^b , Es-10 ^c	C
	Es-10 ^a	D
Pgm-1	Pgm-1 ^a , Pgm-1 ^b	A
	Pgm-1 ^b , Pgm-1 ^c	B
	Pgm-1 ^a	C
	Pgm-1 ^c	D
Pgm-2	Pgm-2 ^a , Pgm-2 ^b , Pgm-2 ^c	A
	Pgm-2 ^b , Pgm-2 ^c	B
Pgm-3	Pgm-3 ^b , Pgm-3 ^c	A
	Pgm-3 ^b	B
	Pgm-3 ^c	C
	Pgm-3 ^a , Pgm-3 ^b , Pgm-3 ^c	D
Pgi	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-b} , Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	A
	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-b} , Pgi ^{-c}	B
	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	C
	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-c}	D
	Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	E
	Pgi ^{-c}	F
Got-1	Got-1 ^a , Got-1 ^b	A
	Got-1 ^c , Got-1 ^d	B
	Got-1 ^a	C

G6pd	a b c d	
	G6pd , G6pd , G6pd , G6pd	A
	a b c	
	G6pd , G6pd , G6pd	B
G6pd	a b	
	G6pd , G6pd	C
G6pd	a c	
	G6pd , G6pd	D
Lap	a b	
	Lap , Lap	A
	a c	
	Lap , Lap	B
	b c	
Lap , Lap	C	
Lap	a	
	Lap	D
	b	
Lap	E	
Acp	a b c e g	
	Acp , Acp , Acp , Acp , Acp	A
	a b c e	
	Acp , Acp , Acp , Acp	B
	a b e g	
	Acp , Acp , Acp , Acp	C
Acp	b f	
	Acp , Acp	D
Acp	d f	
	Acp , Acp	E
Mdh-2	-a -b -c	
	Mdh-2 , Mdh-2 , Mdh-2	A
	-a -b	
	Mdh-2 , Mdh-2	B
	-a -c	
Mdh-2 , Mdh-2	C	
Mdh-2	-a	
	Mdh-2	D
Mdh-2	-c	
	Mdh-2	E
Idh-1	a c f	
	Idh-1 , Idh-1 , Idh-1	A
	b c e	
	Idh-1 , Idh-1 , Idh-1	B
	a c	
Idh-1 , Idh-1	C	
Idh-1	b c	
	Idh-1 , Idh-1	D
Idh-1	c d	
	Idh-1 , Idh-1	E

Sod	a b c	A
	Sod , Sod , Sod	
	a c	
	Sod , Sod	B
	a	C
	Sod	

APÊNDICE 5 - Caracteres e estados utilizados na elaboração da Matriz ELETRO.DAT, obtidos a partir da transformação de frequências gênicas

Caráter	Combinação de alelos	Estado
-----	-----	-----
Alb	a b c	A
	Alb , Alb , Alb	
	a c	
	Alb , Alb	
	b c	
Alb	Alb , Alb	C
	a b	
	Alb , Alb	
Alb	b	D
	Alb	
	Alb	
Hb	a b c	A
	Hb , Hb , Hb	
	a b	
	Hb , Hb	
	b c	
Hb	Hb , Hb	C
Trf	a b c d	A
	Trf , Trf , Trf , Trf	
	a b c	
	Trf , Trf , Trf	
	b c d	
	Trf , Trf , Trf	
Trf	c d	D
	Trf , Trf	
	a c	
	Trf , Trf	
Pgd	a b d	A
	Pgd , Pgd , Pgd	
	b c d	
	Pgd , Pgd , Pgd	
	b c	
Pgd	Pgd , Pgd	C
	b	
	Pgd	
Pgd	b	D
	Pgd	

Es-6	Es-6 ^a , Es-6 ^b , Es ^c	A
	Es-6 ^a , Es-6 ^b	B
	Es-6 ^a , Es-6 ^c	C
	Es-6 ^b	D
Es-10	Es-10 ^a , Es-10 ^b , Es-10 ^c	A
	Es-10 ^a , Es-10 ^b	B
	Es-10 ^b , Es-10 ^c	C
	Es-10 ^a	D
Pgm-1	Pgm-1 ^a , Pgm-1 ^b	A
	Pgm-1 ^b , Pgm-1 ^c	B
	Pgm-1 ^a	C
	Pgm-1 ^c	D
Pgm-2	Pgm-2 ^a , Pgm-2 ^b , Pgm-2 ^c	A
	Pgm-2 ^b , Pgm-2 ^c	B
Pgm-3	Pgm-3 ^a , Pgm-3 ^b , Pgm-3 ^c	A
	Pgm-3b, Pgm-3c	B
	Pgm-3 ^a	C
	Pgm-3 ^b	D
	Pgm-3 ^c	E
Pgi	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	A
	Pgi ^{-b} , Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	B
	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-b}	C
	Pgi ^{-c} , Pgi ^{-d}	D
	Pgi ^{-a} , Pgi ^{-c}	E

	-a					
	Pgi		F			
	-c					
	Pgi		G			
	a	b				
Got-1	Got-1 ,	Got-1	A			
	c	d				
	Got-1 ,	Got-1	B			
	a					
	Got-1		C			
	a	b	c	d		
G6pd	G6pd ,	G6pd ,	G6pd ,	G6pd	A	
	a	b	c			
	G6pd ,	G6pd ,	G6pd		B	
	a	b				
	G6pd ,	G6pd			C	
	a					
	G6pd				D	
	a	b				
Lap	Lap ,	Lap			A	
	a	c				
	Lap ,	Lap			B	
	b	c				
	Lap ,	Lap			C	
	a					
	Lap				D	
	b					
	Lap				E	
	a	b	c	e	g	
Acp	Acp ,	Acp ,	Acp ,	Acp ,	Acp	A
	a	b	c	e		
	Acp ,	Acp ,	Acp ,	Acp		B
	a	b	g			
	Acp ,	Acp ,	Acp			C
	b	f				
	Acp ,	Acp				D
	d	f				
	Acp ,	Acp				E
	-a	-b				
Mdh-2	Mdh-2 ,	Mdh-2			A	
	-a	-c				
	Mdh-2 ,	Mdh-2			B	
	-a					
	Mdh-2				C	
	-b					
	Mdh-2				D	

Idh-1	a	c	f	
	Idh-1 ,	Idh-1 ,	Idh-1	A
	b	c	e	
	Idh-1 ,	Idh-1 ,	Idh-1	B
	a	c		
	Idh-1 ,	Idh-1		C
Sod	b	c		
	Idh-1 ,	Idh-1		D
	c	d		
	Idh-1 ,	Idh-1		E
Sod	a	b	c	
	Sod ,	Sod ,	Sod	A
	a	c		
Sod	Sod ,	Sod		B
	a			
Sod				C
