

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO ALTITUDINAL DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *DELOMYS* (RODENTIA: CRICETIDAE)

Adalmario Neto Silva de Freitas¹; Letícia Rosário Cruz^{1, 3}; Victor Vale^{2, 3}, Valéria Fagundes^{1, 3}

(1) Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. *e-mail para correspondência: adalmariobio2021@gmail.com.

INTRODUÇÃO

Delomys (Voss, 1993) é um gênero de roedor (Cricetidae, Sigmodontinae) que ocorre nas florestas tropicais e subtropicais no sudeste e sul do Brasil. É composto por três espécies: *D. dorsalis* (DDO), com ampla distribuição nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em regiões com altitudes variando de 800-2100m; *D. sublineatus* (DSU), com ampla distribuição nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, em áreas com altitude de 850-1200m; e *D. altimontanus* (DAL), registrado nos Parques Nacionais do Itatiaia (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e do Caparaó (Espírito Santo e Minas Gerais), em regiões com altitude de 1843-2500m (Gonçalves e Oliveira, 2014). Cada espécie está distribuída em diferentes gradientes altitudinais, com caracteres morfológicos, moleculares e citogenéticos bem distintos. Os autores sugeriram que a especiação alopátrica tenha sido determinante na diversificação das espécies, forçada por processos ocorridos nos períodos de expansão e retração da Mata Atlântica nas regiões de altitude. O presente estudo pretendeu investigar os níveis de diversidade genética intra e interespecífica e verificar se a altitude é uma variável associada à diversificação das espécies.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 231 sequências do gene mitocondrial Citocromo-b (Cit-b, 801 pb), sendo 102 sequências (101 de *D. altimontanus*; uma *D. sublineatus*) geradas com os primers MVZ05-MVZ16 (Smith e Patton, 1993) e 130 sequências (14 de *D. altimontanus*, 29 de *D. sublineatus* e 87 de *D. dorsalis*) obtidas no Genbank® (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A análise, edição das sequências e o alinhamento da matriz de dados foi realizada no programa Geneious® 7.1.3. O número, diversidade e frequência de haplótipos foram estimados com o programa DNAsp (Rozas et al., 2017). Para a Inferência Bayesiana utilizou-se o programa MrBayes (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com definição dos modelos evolutivos para cada posição de leitura do gene definidos no programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2016). As sequências de *Chelemys macronyx* e *Notiomys edwardsii* foram utilizados como grupo externo, seguindo Gonçalves e Oliveira (2014). A distância genética par-a-par intra e inter clados foi calculada através do programa MEGA (Kumar et al., 2018). Para avaliar a estruturação genética das populações, a rede de haplótipos *Median-Joining* foi gerada através do programa PopArt (Bandelt et al., 1999). Para testar a significância da altitude na separação intra e interespecífica, foi confeccionado um gráfico BoxPlot e, dada a não normalidade dos dados, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA Kruskal-Wallis). Além disso, análises geográficas foi realizada pelo QGIS, versão 3.22.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 231 sequências recuperaram 83 haplótipos espécie-específicos (Tabela 1). De modo geral, os haplótipos são espécie-específicos e exclusivos de suas localidades, com pouco compartilhamento. Dentre os 115 indivíduos de DAL recuperou-se 13 haplótipos, com 13 sítios variáveis e diversidade haplotípica $Hd=0,7117$ e nos 29 indivíduos de DSU observou-se 19 haplótipos, com 39 sítios variáveis ($Hd=0,9680$). *D. dorsalis* (n=89) revelou-se 51 haplótipos, com 93 sítios variáveis ($Hd=0,9969$), e três agrupamentos: Serra da Mantiqueira (13 haplótipos, $Hd=0,9444$), Sul (19 haplótipos, $Hd=0,9581$) e Serra do Mar (19 haplótipos, $Hd=0,9747$), sendo 9 haplótipos ($Hd=0,9455$)

em SP e 10 haplótipos ($Hd=0,9532$) no RJ. A reconstrução filogenética (Figura 1) confirmou cada espécie como monofilética, assim como os haplogrupos de DDO, com alto suporte. Adicionalmente, a rede de haplótipos (Figura 2a) confirmou forte estruturação das espécies e dos haplogrupos de DDO, além da organização de DAL em dois haplogrupos, com haplótipos exclusivos: PARNA Caparaó/MG-ES (PNC/MG-ES) com 8 haplótipos ($n=108$, H20-H22/H28-H32); e PARNA Itatiaia/RJ (PNI/RJ), com 5 haplótipos ($n=7$, H23-H27). No presente estudo houve adição de exemplares do ES na amostra de DAL, até então contando apenas com indivíduos de MG para PNC (Gonçalves & Oliveira 2014), além de calcular índices de diversidade haplotípica. Nosso estudo abrangente mostrou que dos 8 haplótipos de PNC, cinco são novos e três são compartilhados entre MG-ES, confirmando a separação de PNI e PNC. Os três haplogrupos de DDO (Fig. 2) já tinham sido verificados em estudos prévios (Gonçalves e Oliveira, 2014). A amostra analisada no presente estudo alterou a organização dos grupos já descritos, assim como o número de haplótipos. A rede de haplótipo recuperou 19 haplótipos (H65-H83, $n=29$, $Hd=0,9581$) para o haplogrupo Sul. O haplogrupo Serra da Mantiqueira/MG-RJ recuperou 13 haplótipos ($n=28$, H33-H45, $Hd=0,9444$) e o haplogrupo Serra do Mar mostrou 19 haplótipos ($n=30$, H46-H64, $Hd=0,9747$). Verificou-se distinção entre os espécimes de São Paulo (H46-H49, H54-H57 e H62-H64) e Rio de Janeiro (H47, H48, H50-H53 e H58-H61), sem compartilhamento de haplótipo. Dentre os 29 indivíduos de DSU foram recuperados 19 haplótipos (H1-H19, $Hd=0,9680$), com compartilhamento de três haplótipos: H2 (MG/ES), H8 (SP/ES/SC) e H15 (SP/RJ). A rede de haplótipo mostrou uma estrutura genética para os espécimes do Rio de Janeiro (H3-H6), com cinco passos mutacionais separando a linhagem, ainda que haja um haplótipo H15 distante e compartilhado com outra localidade. Em relação à diferença de altitude, uma distribuição em Boxplot (Figura 2b) mostrou que há diferença para as três espécies e, entre o subclado Serra da Mantiqueira e Sul e entre os haplogrupos da Serra do Mar em DDO. *D. altimontanus* está restrita à altas altitudes (1843-2700m); *D. dorsalis* em áreas com maior amplitude geográfica e altitudinal no sudeste e sul do Brasil (800-2100m) e *D. sublineatus*, por sua vez, ocorre no sudeste em áreas de altitudes mais baixas (800-1200m). Essa diferença tem suporte estatístico ANOVA-Kruskal-Wallis, com $p<0.001$ (Tabela 3), sugerindo que a altitude tem papel relevante na separação de espécies e populações no gênero (Figura 2b). Dentre os subgrupos de DDO, há diferença significativa de altitude dos indivíduos da Serra da Mantiqueira (850-2100m) e do Sul (850-1700m). No subgrupo Serra do Mar, somente foi significativa a distinção por altitude entre SP (800-1400m) e RJ (1000-2040m). Podemos destacar, no entanto, que dois subgrupos de DDO mostram-se distintos, apesar de ocuparem a mesma faixa altitudinal (800-2100m). Populações da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira distam entre si cerca de 30 km, e são separadas pelo Vale do rio Paraíba do Sul, com altitude média de apenas 550 metros do nível do mar. Nossos dados revelam que a altitude desempenha um papel relevante na distinção dos grupos no gênero *Delomys*.

Tabela 01. Índices de diversidade genética (Hd), cit B. N = n° de espécimes; h = n° de haplótipos. Hd = índice de diversidade haplotípica.

Espécie	N	HAPLÓTIPOS	h	Hd	Sítios Variáveis
DSU	29	H1-H19	19	0,9680	39
DDO	87	H33-H83	51	0,9969	93
DAL	115	H20-H32	13	0,7117	13

Tabela 02. Índices de distância genética calculados par-a-par (p-distância) interespecífica, intraespecífica e entre sub-clados.

	DAL	DSU	DDO	DDO S. Mar	DDO S. Mantiqueira	DDO Sul
<i>DAL</i>	0,002					
<i>DSU</i>	0,083	0,011				
<i>DDO</i>	0,064	0,084	0,03			
<i>S. Mar</i>	0,065	0,084	-	0,007		
<i>S. Mantiqueira</i>	0,064	0,093	-	0,047	0,006	
<i>Sul</i>	0,063	0,077	-	0,038	0,037	0,01

Tabela 03. Comparações par a par Dwass-Steel-Critchlow-Fligner da Análise de Variância (ANOVA Kruskal-Wallis). Abaixo, valores de W e acima valores de p.

	DAL	DSU	DDO	DDO_Subclados		DDO - Serra do Mar		
				Serra da Mantiqueira	Sul	Serra do Mar	HapG_SP	HapG_RJ
DAL	-	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.005
DSU	-13.019	-	<.001	<.001	0.204	0.426	0.055	<.001
DDO	-14.518	5.900	-	0.095	0.590	0.993	<.001	0.465
S. Mantiqueira	-9.652	8.101	3.962	-	<.001	0.269	<.001	1.000
Sul	-13.023	3.506	-2.607	-6.192	-	1.000	0.002	0.031
Serra do Mar	-8.642	2.946	-1.144	-3.318	0.386	-	0.055	0.429
HapG_SP	-8.753	-4.244	-5.965	-6.535	-5.627	-4.242	-	<.001
HapG_RJ	-5.244	7.029	2.864	0.155	4.508	2.939	6.147	-

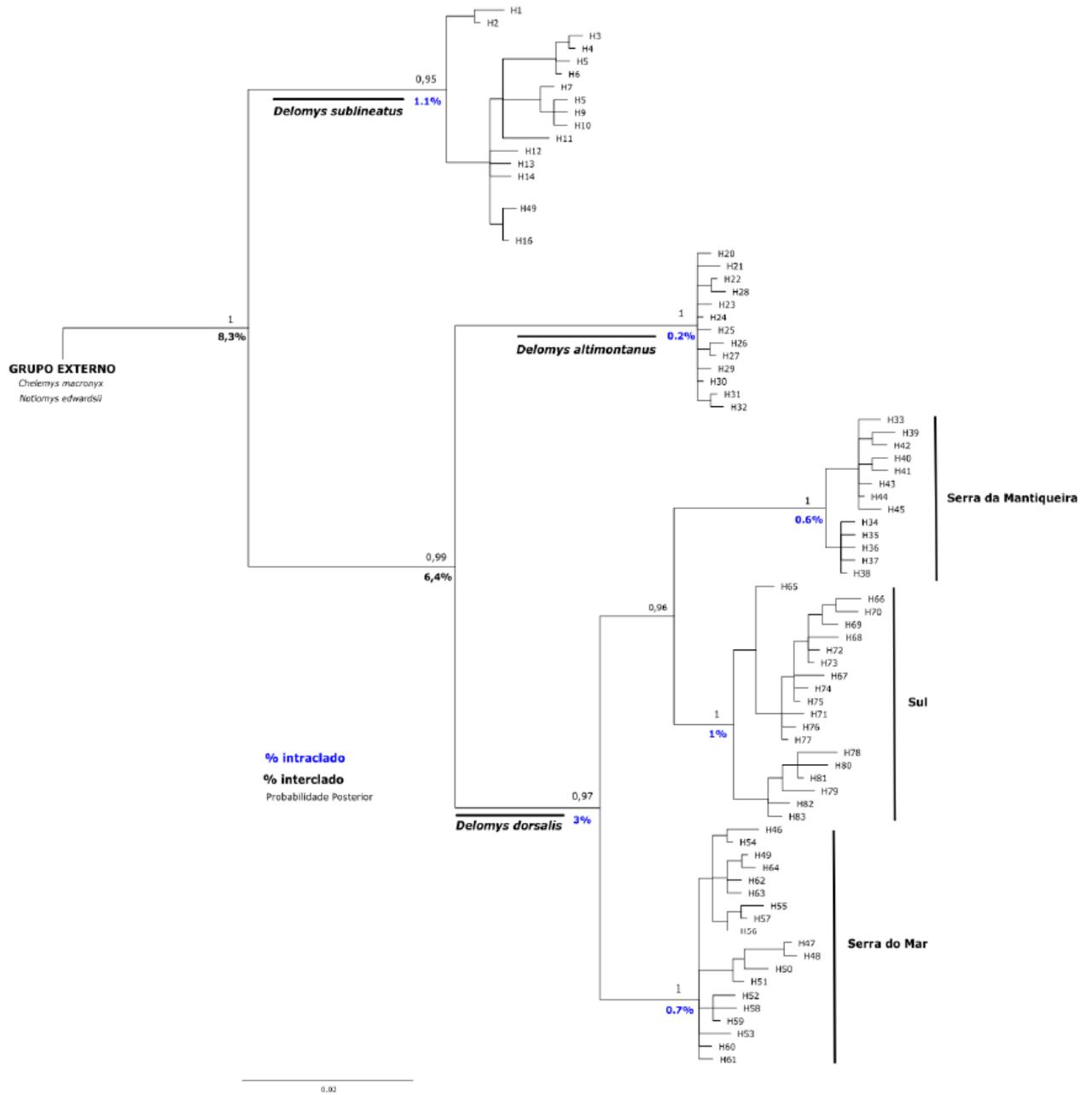


Figura 1. Reconstrução filogenética Bayesiana baseada no CITB do gênero *Delomys*: *D. sublineatus*, *D. altimontanus* e *D. dorsalis*. Foi estimada a probabilidade posterior (preto) e distância genética intraclado (azul) e interclado (preto-negrito). *Chelemys macronyx* e *Notiomys edwardsii* foram utilizados como grupo externo para melhor enraizar a árvore filogenética.

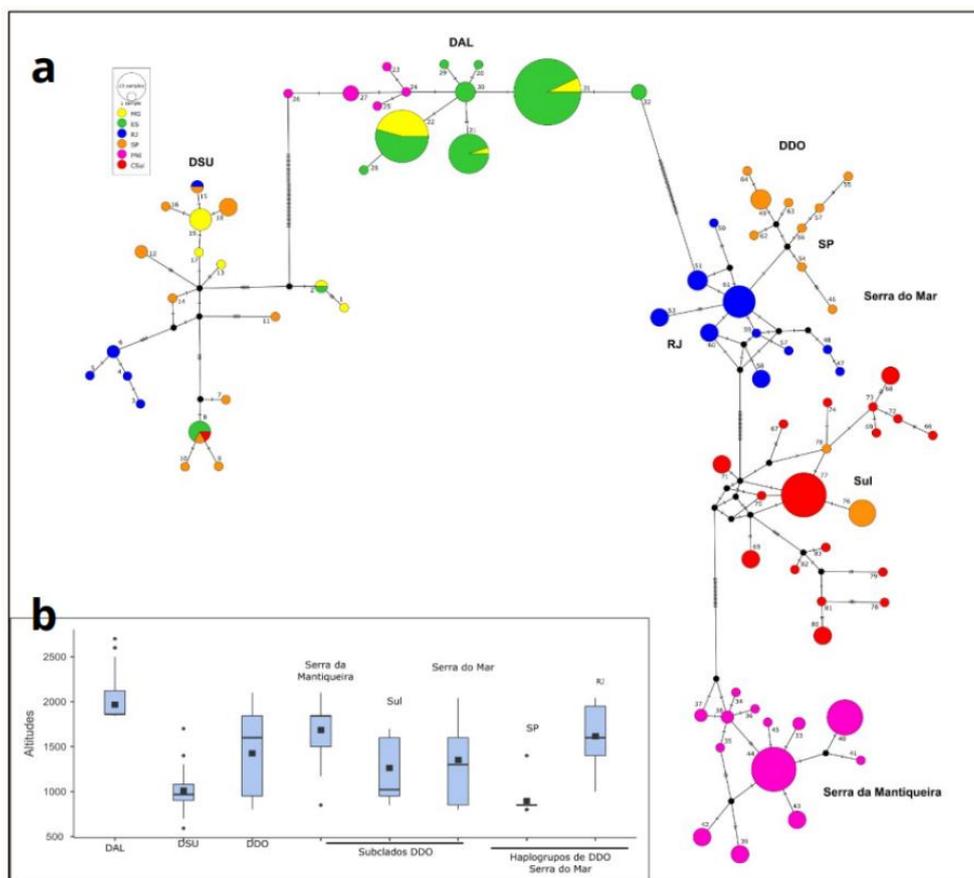


Figura 2. A) Rede de haplótipo (topo) descrevendo arranjo genético do gênero *Delomys*: *D. sublineatus*, *D. altimontanus* e *D. dorsalis*. O tamanho dos círculos corresponde ao número de indivíduos para o haplótipo e as cores representam as localidades: azul (RJ), laranja (SP), amarelo (MG), verde (ES), vermelho (CSUL) e rosa (PNI). Os círculos pretos representam os vetores médios e o comprimento dos ramos é proporcional ao número de passos mutacionais. B) Gráfico Boxplot representando a separação das espécies e populações conforme a altitude.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo pudemos verificar que houve diferença significativa entre a amplitude altimétrica de ocupação para estruturação interespecífica das três espécies e intraespecífica em *D. dorsalis*. Essas evidências estão de acordo com os dados preliminares que mostram que as espécies são bem caracterizadas morfológicamente e citogeneticamente. Por se tratar de uma ampliação representativa de amostra, principalmente para *D. altimontanus*, novos estudos devem ser realizados para se entender melhor os processos de diversificação no grupo.

Palavras-chave: Diversidade haplotípica. Rede de haplótipo. *Delomys altimontanus*. Parque Nacional do Caparaó.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado por Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDELT, H., FORSTER, P., & RÖHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1), 37–48.

GONCALVES, Pablo Rodrigues; OLIVEIRA, JA d. An integrative appraisal of the diversification in the Atlantic forest genus *Delomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) with the description of a new species. **Zootaxa**, v. 3760, n. 1, p. 1-38, 2014. Inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572-1574.

LANFEAR, R., FRANDBSEN, P. B., WRIGHT, A. M., SENFELD, T., CALCOTT, B. (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution**.

QGIS Development Team, 2022. QGIS Geographic Information System. **Open Source Geospatial Foundation Project**. <http://qgis.osgeo.org>

RONQUIST, F. AND J. P. HUELSENBECK. 2003. **MRBAYES 3**: Bayesian phylogenetic

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Mol. Biol. Evol.** 34: 3299-3302.

SMITH, M. F., PATTON, J.L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of the Linnean Society**. 50:149-177.