

Campus Rio de Janeiro
Curso de Ciências Biológicas

**Patrícia dos Santos Lima
Dutra**

**IDENTIFICAÇÃO
MOLECULAR DOS
PEQUENOS MAMÍFEROS
NÃO-VOADORES DOS
CAMPOS DE ALTITUDE DO
PARQUE NACIONAL DA
SERRA DOS ÓRGÃOS, RIO
DE JANEIRO**

PATRÍCIA DOS SANTOS LIMA DUTRA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES
DOS CAMPOS DE ALTITUDE DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS
ÓRGÃOS, RIO DE JANEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência Biológicas.

Orientador Interno: Profa. Dra. Roberta Kuan Tchien de Mello Loh

Orientador Externo: Dr. Marcelo Weksler

Rio de Janeiro

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada por
Anderson Morais Chalaça
CRB7 5661

D978i Dutra, Patrícia dos Santos.
Identificação molecular dos pequenos mamíferos não-voadores dos campos de altitude do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. / Patrícia dos Santos Dutra. – Rio de Janeiro, 2019.
47 f.: il.: 21 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas com Habilitação em Biotecnologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Kuan Tchuen de Mello Loh
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Weksler

1. Mamíferos. 2. Identificação molecular. I. Loh, Roberta Kuan Tchuen de Mello. II. Weksler, Marcelo. III. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 599

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Ao meu orientador, Marcelo Weksler, pela paciência, orientação e suporte para que este trabalho fosse realizado e concluído.

Aos meus amigos de Laboratório, Giulia Lopes, Ana Pantaleão, Samantha Palhano, Felipe Gudinho, Aldo Caccavo e Marcos Cruz, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela vontade de ajudar e pelo apoio emocional, principalmente nos momentos finais da Monografia.

Aos meus Professores do IFRJ, minha eterna gratidão. Minha profunda admiração aos Professores Roberta Loh e Maron Galliez, por lecionarem com e por amor. Estou muito honrada em tê-los na banca da minha defesa.

À minha amiga do IFRJ, Julia Santos, por todos os momentos cômicos, principalmente os de trabalho em grupo.

Aos meus amigos Hugo Esteves e Deborah Lima, por serem o melhor casal de amigos que eu poderia desejar.

Às minhas primas, Isabela e Gabriela Dutra, que ao longo dos anos me incentivaram e me apoiaram mesmo não entendendo nada do meu trabalho.

À minha família, em especial à minha irmã Giovana e minha mãe Cleide, que sempre acreditou na minha capacidade e apostou que eu conseguiria uma vaga na faculdade pública. Obrigada, mãe. Essas conquistas também são suas.

Aos meus filhos Luís, Leia e Anakin que sempre estavam ao meu lado renovando minhas energias e me confortando com o que tinham para oferecer, amor.

Finalmente, agradeço ao meu namorado Gustavo por ter trilhado este caminho comigo, sempre me ajudando a tomar decisões difíceis, pela paciência em ouvir meus dramas e por ter acreditado que eu seria capaz de terminar este trabalho. Sem você eu não estaria completa. Meu melhor amigo, companheiro e confidente, amo você.

RESUMO

Atualmente, os remanescentes naturais da Mata Atlântica correspondem a cerca de 12% da sua cobertura original. Contudo, ela ainda é considerada como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundiais, e particularmente uma das maiores regiões de diversidade de pequenos mamíferos. Inclusos nesse bioma estão os Campos de Altitude que ocorrem a partir de 1.800 m de altitude, onde a vegetação florestal é substituída por vegetação herbácea-arbustiva e apresentam uma fauna particularmente distinta. A maior parte da diversidade de pequenos mamíferos corresponde a roedores da subfamília Sigmodontinae (Cricetidae) e a marsupiais da família Didelphidae. A taxonomia dentro destes clados, contudo, é complexa devido a alta diversidade morfológica e a existência de espécies crípticas, isto é, com diferenças imperceptíveis entre os espécimes. Desta forma, estudos baseados apenas na morfologia não conseguem caracterizar efetivamente espécies crípticas, como nos gêneros *Oligoryzomys* e *Akodon* (Sigmodontinae) e *Monodelphis* (Didelphidae). Este trabalho teve como objetivo identificar os pequenos mamíferos não-voadores dos Campos de Altitude do PARNASO, através do gene mitocondrial citocromo b (*Mt-Cytb*). Foram analisados 39 indivíduos: 7 *Bucepattersonius griserufescens*; 6 *Castoria angustidens*; 15 *Monodelphis dimidiata*; 6 *Oligoryzomys* sp.; 5 *Oxymycterus quaestor*. A amplificação do *Mt-Cytb* (801 pb) foi feita através da PCR, utilizando os *primers* MVZ05 e MVZ16. Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança foi possível identificar a maioria das espécies molecularmente, com exceção de alguns espécimes de *Oligoryzomys* e dos espécimes de *Bucepattersonius* identificados morfológicamente como *B. griserufescens*. Os *primers* foram capazes de amplificar todas as espécies da família Sigmodontinae, bem como os da família Didelphidae (*Monodelphis*). Para espécies crípticas, as análises moleculares mostram-se consideráveis e evidenciam a sua importância como ferramenta a complementar a identificação morfológica.

Palavras-chave: Identificação molecular, pequenos mamíferos não-voadores, Campos de Altitude, citocromo b (*Mt-Cytb*).

ABSTRACT

Currently, the natural remnants of the Atlantic Forest account for about 12% of its original coverage. However, it is still considered one of the 25 biodiversity *hotspots* worldwide, and particularly one of the largest diversity regions of small mammals. Included in this biome are the High-altitude Grasslands that occur from 1.800 m altitude, where the forest vegetation is replaced by herbaceous-shrub vegetation and present a particularly distinct fauna. Most of the diversity of small mammals corresponds to rodents of the subfamily Sigmodontinae (Cricetidae) and to marsupials of family Didelphidae. The taxonomy within these clades, however, is complex because of the huge morphological diversity and the existence of cryptic species, that is, with imperceptible differences between the specimens. Thus, studies based only on morphology can not effectively characterize cryptic species, as in genus *Oligoryzomys* and *Akodon* (Sigmodontinae) and *Monodelphis* (Didelphidae). The objectives of this work were: identify the small non-flying mammals of High-altitude Grasslands of Parque Nacional da Serra dos Órgãos through mitochondrial gene cytochrome b (*Mt-Cytb*). Thirty-nine individuals were analyzed: 7 *Bucepattersonius griserufescens*; 6 *Castoria angustidens*; 15 *Monodelphis dimidiata*; 6 *Oligoryzomys* sp.; 5 *Oxymycterus quaestor*. The amplification of *Mt-Cytb* (801 bp) was made by PCR, using *primers* MVZ05 and MVZ16. Based on the results of the phylogenetic analysis of maximum likelihood it was possible to identify most species molecularly, except some specimens of *Oligoryzomys* and specimens of *Bucepattersonius* morphologically identified as *B. griserufescens*. The *primers* were able to amplify all species of the Sigmodontinae family, as well as those of the family Didelphidae (*Monodelphis*). For cryptic species, the molecular analyzes are considerable and show its importance as a tool to complement the morphological identification.

Keywords: Molecular identification, small non-flying mammals, High-altitude Grasslands, cytochrome b (*Mt-Cytb*).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figura 1: Campos de Altitude no Parque Nacional da Serra dos Órgãos.....	23
Figura 2: Mapa do Parque Nacional da Serra dos Órgãos.....	23
Figura 3: Localidades do PARNASO onde foram coletados os espécimes: Vale da Luva, Abrigo do Açú e Ravina entre o Morro Açú e o Morro do Marco.....	24
Figura 4: Mapa com os <i>primers</i> utilizados para amplificar e sequenciar o citocromo b (<i>Mt-Cytb</i>).....	24
Figura 5: Gel de agarose a 2% para PCR observado no transiluminador.....	25
Figura 6: Árvore filogenética apresentando o resultado de <i>Bucepattersonius griserufescens</i> para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Castoria angustidens</i> (= <i>Akodon serrensis</i>) e <i>Oxymycterus nasutus</i> como grupo externo.....	26
Figura 7: Espécime de <i>Bucepattersonius</i> sp.....	27
Figura 8: Mapa de distribuição da espécie <i>Bucepattersonius griserufescens</i>	27
Figura 9: Árvore filogenética apresentando o resultado de <i>Castoria angustidens</i> para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Bucepattersonius soricinus</i> e <i>Oxymycterus nasutus</i> como grupo externo.....	28
Figura 10: Espécime de <i>Castoria angustidens</i> (= <i>Akodon serrensis</i>).....	29
Figura 11: Mapa de distribuição da espécie <i>Castoria angustidens</i> (= <i>Akodon serrensis</i>).....	29
Figura 12: Árvore filogenética apresentando o resultado do gênero <i>Oligoryzomys</i> sp. para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Neacomys minutus</i> e <i>Microryzomys altissimus</i> como grupo externo.....	30
Figura 13: Espécime de <i>Oligoryzomys flavescens</i>	31
Figura 14: Mapa de distribuição da espécie <i>Oligoryzomys flavescens</i>	31
Figura 15: Mapa de distribuição da espécie de <i>Oligoryzomys rupestris</i>	32

Figura 16: Árvore filogenética apresentando o resultado de <i>Oxymycterus quaestor</i> para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Castoria angustidens</i> (= <i>Akodon serrensis</i>) e <i>Brucepattersonius soricinus</i> como grupo externo.....	33
Figura 17: Espécime de <i>Oxymycterus quaestor</i>	34
Figura 18: Mapa de distribuição da espécie de <i>Oxymycterus quaestor</i>	34
Figura 19: Árvore filogenética apresentando o resultado geral do gênero <i>Monodelphis</i> para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Thylamys elegans</i> e <i>Marmosa robinsoni</i> como grupo externo.....	35
Figura 20: Árvore filogenética apresentando o resultado de <i>Monodelphis sorex</i> e <i>Monodelphis dimidiata</i> para o gene <i>Mt-Cytb</i> utilizando um espécime de <i>Thylamys elegans</i> e <i>Marmosa robinsoni</i> como grupo externo.....	36
Figura 21: Espécime de <i>Monodelphis dimidiata</i>	37
Figura 22: Mapa de distribuição da espécie de <i>Monodelphis dimidiata</i>	37

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Lista de espécimes coletados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos....	38
Tabela 2: Lista de espécimes coletados de <i>Oligoryzomys</i> sp. do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional do Itatiaia.....	41
Tabela 3: Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados neste trabalho.....	41
Tabela 4: Grupos externos utilizados para cada táxon.....	41

LISTA DE APÊNDICES:

Apêndice A: Protocolo de Extração de DNA – Promega Wizard Mouse Tail Modificado.....	42
Apêndice B: Preparação do Gel de Agarose a 2% para PCR.....	44
Apêndice C: Protocolo de Eletroforese para PCR.....	45
Apêndice D: Protocolo de Purificação do DNA (Peg 20%).....	46
Apêndice E: Protocolo de Sequenciamento.....	47

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mata Atlântica.....	1
1.2 Pequenos mamíferos não-voadores dos Campos de Altitude.....	2
1.3 Identificação molecular.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1 Área de estudo.....	6
3.2 Material utilizado.....	6
3.3 Extração do DNA.....	7
3.4 Quantificação do DNA.....	7
3.5 Amplificação das fitas de DNA.....	8
3.6 Sequenciamento do DNA.....	9
3.7 Análise e edição de dados.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	11
<i>Castoria angustidens</i>	11
<i>Oligoryzomys</i> sp.....	12
<i>Oxymycterus quaestor</i>	13
<i>Monodelphis</i> sp.....	14
5. CONCLUSÃO.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais das Américas, com uma cobertura original de aproximadamente 150 milhões de hectares, distribuídas por 17 estados brasileiros (Ribeiro *et al.*, 2009). Sua localização geográfica se estende pelo litoral brasileiro e, em consequência disso, a Mata Atlântica foi uma das primeiras áreas a sofrer com a exploração durante a colonização europeia, há 500 anos (Figueiredo *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2009). A degradação deste ecossistema deve-se principalmente aos ciclos econômicos da extração de madeira e de cana de açúcar, das plantações de café, da pecuária, e posteriormente, da industrialização e ocupação urbana (Figueiredo *et al.*, 2017).

Atualmente, os remanescentes naturais da floresta são responsáveis por cerca de 12% da sua cobertura original, e mais de 80% desses remanescentes são fragmentos menores que 50 hectares (Figueiredo *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2009). Por conseguinte, estes pequenos fragmentos isolados uns dos outros compõem florestas secundárias em estágios iniciais e intermediários de sucessão (Ribeiro *et al.*, 2009). Os poucos fragmentos grandes remanescentes (acima de 10 mil hectares), sobreviveram em locais nos quais o terreno íngreme dificultava a ocupação humana (Ribeiro *et al.*, 2009).

Ainda que a Mata Atlântica esteja seriamente ameaçada pela fragmentação e perda de habitats, ela mantém-se como um dos principais focos de biodiversidade (Ribeiro *et al.*, 2009), sendo considerada um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundiais que abriga um enorme número de espécies endêmicas (Bovendorp *et al.*, 2017). Suas características geográficas somadas com uma ampla faixa de altitude, propiciaram uma alta diversidade e endemismo, abrigando mais de 20.000 espécies de plantas, 321 espécies de mamíferos, 688 espécies de pássaros, 200 espécies de répteis, 280 espécies de anfíbios e muitas outras espécies que a ciência ainda não descreveu (Graipel *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2009).

Em particular, a Mata Atlântica é uma das maiores regiões de diversidade de pequenos mamíferos do continente (Ribeiro *et al.*, 2009; Ventura *et al.*, 2012), abrigando 108 espécies de roedores das famílias Caviidae, Cricetidae, Cuniculidae,

Ctenomyidae, Dasyproctidae, Echimyidae, Erethizontidae e Sciuridae; das quais 55 são endêmicas (Graipel *et al.*, 2007; Paglia *et al.*, 2012) e 23 espécies de marsupiais da família Didelphidae (Graipel *et al.*, 2017). Um quinto dessa diversidade pertence à subfamília Sigmodontinae (Muroidea: Cricetidae), com ao menos 19 gêneros e 50 espécies presentes no bioma (Ribeiro *et al.*, 2009; Ventura *et al.*, 2012).

Contudo, o conhecimento científico sobre a diversidade de sigmodontíneos é limitado, mesmo na Mata Atlântica, uma vez que têm-se descoberto e/ou “redescoberto” novas espécies de sigmodontíneos no bioma; por exemplo, nos últimos 20 anos 14 novas espécies foram descritas: *Abrawayaomys chebezi* Pardiñas *et al.*, 2009; *Akodon paranaensis* Christoff *et al.*, 2000; *Akodon philipmyersi* Pardiñas *et al.*, 2005; *Akodon reigi* González *et al.*, 1999; *Brucepattersonius paradisus*, *Brucepattersonius guarani*, *Brucepattersonius misionensis* Mares & Braun, 2000; *Cerradomys langguthi* e *Cerradomys vivoi* Percequillo *et al.*, 2008; *Hylaeamys seuanezi* (Weksler *et al.*, 1999); *Juliomys rimofrons* Oliveira & Bonvicino, 2002; *Juliomys ossitenuis* Costa *et al.*, 2007; *Rhipidomys tribei* e *Rhipidomys itoan* Costa *et al.*, 2011 (Percequillo, Weksler & Costa, 2011; Suárez-Villota *et al.*, 2013).

Ainda sobre pequenos mamíferos, a família Didelphidae possui reconhecidamente 25 espécies (Graipel *et al.*, 2017; Pavan, Jansa & Voss, 2016), destacando-se o gênero *Monodelphis*. Dezesete espécies compõem este gênero e sete delas ocorrem na Mata Atlântica brasileira, sendo três endêmicas do bioma (Graipel *et al.*, 2017). *Monodelphis* ainda é um gênero complexo que necessita de revisão taxonômica, apesar dos avanços recentes com estudos moleculares. (Graipel *et al.*, 2017; Vilela, Russo & Oliveira, 2010). Como visto por Pavan, Jansa & Voss *et al.* (2014) e Vilela, Russo & Oliveira (2010), *Monodelphis sorex* é sinônimo júnior de *Monodelphis dimidiata*, assim como *Monodelphis rubida* é sinônimo júnior de *Monodelphis americana*; e *Monodelphis theresa* é sinônimo júnior de *Monodelphis scalops*.

1.2 Pequenos mamíferos não-voadores dos Campos de Altitude

Os Campos de Altitude da Mata Atlântica (Figura 1), ocorrem a partir de 1.800 m de altitude, onde a vegetação florestal é substituída por vegetação herbácea-arbustiva que se desenvolve sobre os afloramentos rochosos (Gonçalves *et al.*, 2007). Nesta

altitude, mesmo inserido em clima tropical, os Campos de Altitude apresentam temperaturas baixas com mínimas variando entre – 6 °C e – 10 °C. A flora destaca-se por seu alto grau de endemismo, estimado em 550 espécies das quais 20% são endêmicas (Gonçalves *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009).

Quando comparada com as áreas de floresta, os Campos de Altitude apresentam uma fauna particularmente distinta (Cronemberger & Castro, 2007). A pesquisa dos mamíferos dos Campos de Altitude iniciou-se recentemente, há duas décadas, mas já pôde-se registrar a riqueza de pequenos mamíferos em especial, de Sigmodontinae (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira & Bonvicino, 2002). Também foi descoberto que algumas espécies estão restritas aos Campos de Altitude, com destaque para os gêneros *Bucepattersonius* e *Oxymycterus* da tribo Akodontini (Sigmodontinae); e *Monodelphis* de Didelphidae (Oliveira *et al.*, 2007).

Os Campos de Altitude no Sudeste encontram-se no Itatiaia, Serra da Mantiqueira, Serra do Caparaó, Serra dos Órgãos e Serra do Mar (Geise, Bossi & Bergallo, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2011). O estado do Rio de Janeiro dispõe de apenas três localidades nas quais ocorrem os Campos de Altitude: Serra dos Órgãos, no maciço do Itatiaia e em um pequeno trecho da Serra do Desengano (Cronemberger & Castro, 2007) que apresentam um alto grau de endemismo e um valor inestimável para a conservação (Oliveira *et al.*, 2007).

1.3 Identificação molecular

A taxonomia dos roedores da família Sigmodontinae está passível a constantes revisões e debates (Lanzone *et al.*, 2011). Um desses motivos, é a enorme semelhança morfológica que em alguns casos, possuem diferenças imperceptíveis entre os espécimes (Rosa *et al.*, 2012). Estas espécies que são indistinguíveis morfológicamente, são denominadas espécies crípticas. Apesar dos estudos de delimitação de espécies terem se iniciado com divergências na morfologia, a análise genética tem complementado ou resolvido problemas de diagnóstico de espécies (Lanzone *et al.*, 2011).

Na família Sigmodontinae destacam-se alguns gêneros, como *Oligoryzomys* e *Akodon*, que apresentam espécies crípticas. Ambos são gêneros com alta

diversidade, porém os caracteres morfológicos de suas espécies são muito semelhantes, tornando sua taxonomia problemática (Rivera *et al.*, 2018; Yazbeck *et al.*, 2011). Dessa forma, a análise cariotípica e/ou molecular são as formas mais seguras de identificação dessas espécies (Yazbeck *et al.*, 2011). O mesmo ocorre para os marsupiais da família Didelphidae. O gênero *Monodelphis* apresenta espécies crípticas como visto por Duda & Costa (2015), que em seu estudo conseguiu distinguir *M. americana* e *M. iheringi* molecularmente.

Diversos estudos moleculares têm sido empregados para os pequenos mamíferos (Duda & Costa, 2015; Rivera *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2012). O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta características vantajosas que tem difundido seu uso: origem materna; pouca ocorrência de íntrons e rápida acumulação de substituições nucleotídicas (Avice, 2009). Dessa forma, estudos filogenéticos utilizam um ou mais genes mitocondriais, como o citocromo oxidase 1 (CO1) e o citocromo b (*Mt-Cytb*), para em seguida comparar com as sequências já depositadas em banco de dados (Tobe, Kitchener & Linacre, 2010). Demos *et al.* (2013), por exemplo, publicaram um artigo que compara os valores relativos de CO1 e o *Mt-Cytb* para reconstrução filogenética e identificação de mamíferos na África. Ele evidenciou que dentre estes genes o *Mt-Cytb* é mais preciso na reconstrução da filogenia de mamíferos e também separa melhor as espécies.

2. OBJETIVOS

Identificar os pequenos mamíferos não-voadores dos Campos de Altitude do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, através do marcador molecular mitocondrial citocromo b (*Mt-Cytb*), dado que muitas espécies são crípticas e de difícil identificação apenas pela análise morfológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) criado em 30 de novembro de 1939, representa o terceiro parque mais antigo do país. O PARNASO é uma Unidade de Conservação Federal de Proteção Integral subordinada ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O Parque está inserido na Mata Atlântica e possui 20.024 hectares de Mata Atlântica que abrangem os municípios de Guapimirim, Magé, Petrópolis e Teresópolis, ocupando uma posição central no Corredor Ecológico da Serra do Mar no Estado do Rio de Janeiro (Figura 2). O PARNASO possui clima superúmido com praticamente nenhum déficit hídrico e com calor bem distribuído o ano todo. Apresenta relevo singular com paisagem composta por grandes declives, fortemente montanhoso e possui suas maiores elevações (200 m até 2.263 m de altitude) na faixa que acompanha a linha divisória dos municípios (ICMBio, 2008).

A partir de 1.800 m de altitude, têm-se os Campos de Altitude, onde a vegetação florestal é substituída por vegetação herbácea-arbustiva que se desenvolve sobre os afloramentos rochosos podendo ser subdividido em regiões de: picos; vegetação graminosa; charcos; depressão; capões; e rochas (Oliveira *et al.*, 2007).

3.2 Material utilizado

As amostras dos pequenos mamíferos foram coletadas em excursões anteriores ao início desse estudo, no ano de 2014. A coleta dos animais foi realizada em três localidades do PARNASO: no Vale da Luva, no Abrigo do Açú e na Ravina entre o Morro Açú e o Morro do Marco (Tabela 1; Figura 3). Sendo 2153 m de altura a maior altitude de coleta, e 1820 m, a menor. Os animais coletados foram identificados morfologicamente no Setor de Mastozoologia do Museu Nacional/UFRJ a partir da avaliação de caracteres da morfologia externa dos espécimes que incluíram o comprimento cabeça-corpo, comprimento da cauda, comprimento do pé, comprimento da orelha e peso (DeBlase & Martin, 1981), como também, foram avaliados os caracteres cranianos e dentários (Patton, Pardiñas & D'Elía, 2015; Vilela, Russo & Oliveira, 2010).

Neste estudo, foram utilizadas amostras de tecido hepático e/ou muscular, preservadas em álcool etílico absoluto, de 45 espécimes: 15 *Monodelphis dimidiata*, 8 *Brucepattersonius griserufescens*, 8 *Delomys dorsalis*, 7 *Castoria angustidens*, 6 *Oxymycterus quaestor* e 1 *Oligoryzomys* sp. Para complementar a amostragem do gênero *Oligoryzomys*, foram incluídos 3 espécimes provenientes do Parque Nacional do Itatiaia (MG) e 2 espécimes do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Tabela 2). Espécimes de *Delomys dorsalis* já haviam sido previamente identificados molecularmente (Jacob, 2015). Sendo assim, foram analisadas molecularmente 42 indivíduos (Tabelas 1 e 2). Todas as amostras estão depositadas na coleção de tecidos do Setor de Mastozoologia do Museu Nacional/UFRJ.

3.3 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de tecido muscular e/ou hepático preservadas em álcool etílico absoluto, utilizando um protocolo modificado do Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® Mouse Tail (Promega; APÊNDICE A). O kit fornece um método simples para o isolamento de DNA de glóbulos brancos, células de cultura de tecido, tecido animal, tecido vegetal, levedura e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Promega). O protocolo é baseado em um processo de quatro etapas; o primeiro passo no procedimento de extração é a lise das células e dos núcleos. Para o isolamento do DNA dos glóbulos brancos, este passo envolve a lise dos glóbulos vermelhos na solução de lise celular, seguida da lise dos glóbulos brancos e dos seus núcleos na solução de lise dos núcleos. Então, as proteínas celulares são retiradas por uma etapa de precipitação salina, que as precipita, mas permite que o DNA genômico de alto peso molecular fique em solução. Finalmente, o DNA genômico é concentrado e dessalinizado pela precipitação de isopropanol. (Nielsen *et al.*, 2007).

3.4 Quantificação do DNA

Amostras de ácido nucléico podem ser facilmente verificadas quanto à concentração e à qualidade (índice de pureza) usando o espectrofotômetro. A espectrofotometria pode ser usada para medir a quantidade de nanogramas (ng) por

microlitro (μL) de amostras de DNA puro, isto é, DNA que não está contaminado por proteínas, fenol ou RNA. O DNA extraído foi quantificado por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000.

A razão de absorbância em 260 e 280 nm é usada para avaliar a pureza do DNA e RNA. Uma proporção de aproximadamente 1,8 é geralmente aceita como “pura” para o DNA; uma proporção de aproximadamente 2,0 é geralmente aceita como “pura” para RNA. Se esta relação é significativamente menor em ambos casos, pode ser um indicativo da presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente 280 nm ou próximo disso. A razão de absorbância a 260 nm e 230 nm é uma medida secundária de pureza do ácido nucleico. Os valores 260/230 para um ácido nucleico “puro” estão usualmente na faixa de 1,8-2,2. Se esta relação é consideravelmente menor, pode ser um indicativo a presença de contaminantes copurificados. (Thermo Scientific, 2009).

O DNA bruto foi diluído para uma concentração de trabalho (ca. 50 mM) em pequenas alíquotas com água ultrapura, e em seguida aplicado à eletroforese em um gel de agarose a 1% e observado em transiluminador ultravioleta para provar a sua integridade.

3.5 Amplificação das fitas de DNA

A amplificação parcial de 801 pares de bases (pb) do gene mitocondrial citocromo b (*Mt-Cytb*) foi feita por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando-se os *primers* MVZ05 e MVZ16 (Smith & Patton, 1993) como mostrados na Tabela 3 e Figura 4. As amplificações ocorreram em reações com volumes finais de 25 μL utilizando 2,5 μL de 10x PCR Buffer (MgCl_2), 1,25 μL de MgCl_2 a 50 mM, 0,5 μL de dNTPs a 10 mM, 0,2 μL de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), 17,55 μL de água ultrapura, 1,0 μL de cada *primer* e 1,0 μL de DNA da amostra, para todos os espécimes, exceto *Oligoryzomys* sp.; para este táxon, foram utilizados 2,5 μL de 10x PCR Buffer (MgCl_2), 2,0 μL de MgCl_2 a 50 mM, 0,5 μL de dNTP Mix a 10 mM, 0,2 μL de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), 16,8 μL de água ultrapura, 1,0 μL de cada *primer* e 1,0 μL de DNA da amostra, totalizando um volume final de 25 μL . As reações foram feitas em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo

Fischer Scientific), e, em todas as reações, utilizou-se um controle negativo e um controle positivo. Foram realizados 35 ciclos com desnaturação inicial a 94 °C (2 min), seguidos de desnaturação a 94 °C (30 s), anelamento a 54 °C (45 s), extensão a 72 °C (1 min), sendo sucedidos por uma extensão prolongada a 72 °C (7 min). Essa ciclagem foi efetuada para todos os espécimes, com exceção dos *Oligoryzomys* sp.; para este, a temperatura da fase de anelamento foi alterada de 54 °C para 48 °C. O êxito da amplificação do gene *Mt-Cytb* foi averiguado em géis de agarose a 2% (APÊNDICE B e C) e observado em transiluminador ultravioleta (Figura 5).

3.6 Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR foram purificados com PEG/NaCl a 20% (APÊNDICE D) e quantificados no NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific) para apurar a concentração e o nível de pureza do DNA. Posteriormente, foram realizadas reações de sequenciamento para *Mt-Cytb* com o produto purificado em sequenciador automático ABI 3130 (sequenciamento de Sanger).

Para a reação de sequenciamento (APÊNDICE E), foram utilizados os mesmos *primers* da PCR numa concentração de 3,2 mM (1 µL), tampão 5x (1,5 µL), BigDye (1 µL), água ultrapura (4,5 µL) e DNA (2 µL) em cada poço da placa (96 poços), em um total de 10 µL. Em seguida, a placa foi submetida ao termociclador para a realização da ciclagem do BigDye, respeitando o protocolo da plataforma nas seguintes temperaturas: desnaturação inicial a 96 °C (1 min), seguida de 25-40 ciclos de desnaturação a 96 °C (15 s), anelamento a 50 °C (15 s) e extensão a 60 °C (4 min). É importante configurar o termociclador para uma rampa de 1 °C/s para facilitar o anelamento do *primer*.

3.7 Análise e edição de dados

Os eletroferogramas gerados das fitas complementares foram alinhados e editados com o software Geneious® (Kearse *et al.*, 2012). Basicamente foi efetuado o trabalho de “Base calling” que é atribuir a base nitrogenada mais provável, conforme os picos do eletroferograma. Neste mesmo software, os alinhamentos foram realizados através do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Para padronizar o tamanho

das sequências (801 pb), foram retiradas manualmente as extremidades das sequências, dessa forma, eliminando regiões que não foram lidas com precisão e aumentando a qualidade do sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com milhares de sequências armazenadas no *GenBank* através do algoritmo BLAST (Ferramenta de Busca por Alinhamento Local Básico, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), a fim de, no mínimo confirmar os gêneros sequenciados fornecendo um valor de significância estatística associada a comparação de similaridade.

Para confirmar a identificação morfológica, um dos meios utilizados é a filogenia. Dessa forma, foi construída uma árvore filogenética para cada gênero. A partir do alinhamento das sequências de nucleotídeos, foram geradas árvores de máxima verossimilhança no FastTree (Price, Dehal & Arkin, 2010) com *bootstrap* de 100 pseudoréplicas. Estas árvores foram construídas a partir do modelo evolutivo GTR e foram escolhidos aleatoriamente dois indivíduos de espécies diferentes para cada gênero analisado. Para o enraizamento da árvore foram utilizados dois grupos externos para cada árvore/gênero (Tabela 4).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram geradas 39 sequências para os indivíduos analisados, sendo 7 sequências de *Bucepattersonius griserufescens*; 6 de *Castoria angustidens*; 15 de *Monodelphis dimidiata*; 6 de *Oligoryzomys* sp.; 5 de *Oxymycterus quaestor*. Durante as reações de purificação do PCR, foi perdida uma amostra de *O. quaestor* (MW395). E após o sequenciamento, as amostras MW405 de *C. angustidens* e MW392 de *B. griserufescens* apresentaram eletroferogramas de baixa qualidade e também não foram incluídos nas posteriores análises.

Bucepattersonius griserufescens

Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 6), todos os indivíduos sequenciados de *B. griserufescens* foram encontrados no mesmo clado com alto valor de suporte (*bootstrap* = 99%), tendo como grupo irmão um clado contendo as demais espécies de *Bucepattersonius* presentes no *GenBank*: *B. iheringi*, *B. soricinus* e *B. igniventris*. Ao mesmo tempo, não há amostras de *B. griserufescens* disponíveis no *GenBank*, bem como das espécies paraguaias *B. guarani*, *B. paradisus* e *B. misionensis*. Contudo, as espécies paraguaias são restritas a uma única localidade no Paraguai (Vilela *et al.*, 2015), e, segundo Vilela *et al.* 2005, os espécimes de *B. griserufescens* do PARNASO podem constituir uma outra unidade taxonômica. Dessa forma, não há como confirmar que a espécie identificada morfológicamente é a mesma da identificação molecular. Uma vez que a análise molecular foi inconclusiva para a identificação destes espécimes, optou-se por utilizar a identificação morfológica atribuída a estes. São necessários mais estudos para determinar se estes indivíduos correspondem ou não à *B. griserufescens*. Caso correspondam, as sequências geradas neste trabalho podem servir como sequências referência para a identificação de indivíduos do gênero.

Bucepattersonius griserufescens Hershkovitz, 1998 (Figura 7) é uma espécie de Sigmodontinae distribuída nas maiores elevações dos maciços Caparaó (ES/MG), Mantiqueira (MG/SP/RJ) e Serra dos Órgãos (RJ), endêmica dos Campos de Altitude da Mata Atlântica, em altitudes de 1.800 a 2.400 m (Bonvicino, Lindbergh & Maroja, 2002; Vilela *et al.*, 2015; Figuras 8).

Castoria angustidens

Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 9), todos os indivíduos sequenciados de *Castoria angustidens* (= *Akodon serrensis*; Pardiñas *et al.*, 2016) foram encontrados no mesmo clado que os indivíduos selecionados do *GenBank* com alto valor de suporte (*bootstrap* = 100%). Desta forma, afirma-se que a espécie retratada é de fato *C. angustidens* e que a identificação molecular é congruente com a identificação morfológica.

Castoria angustidens (Winge, 1887) (*Akodon serrensis* Thomas, 1902; Figura 10) é endêmico da Mata Atlântica (Paglia *et al.*, 2012) com ocorrência na Floresta Montana (<1.100 m), Floresta Alto-Montana (1.100 a 2.000 m) e Campos de Altitude (>1.800 m) (Geise *et al.*, 2004) do leste do país, do Espírito Santo à Santa Catarina (Gonçalves *et al.*, 2007; Testoni *et al.*, 2012; Figura 11). Porém, Testoni *et al.* (2012) e Abreu *et al.* (2014) relatam registro da espécie também no Rio Grande do Sul, 177km do limite conhecido de sua distribuição geográfica. Também é reportado que na Região Sul, *C. angustidens* ocorre em altitudes mais baixas (<1.000 m; Floresta Submontana), dado que outros autores, como Geise *et al.* (2004) e Testoni *et al.* (2012), registraram esta espécie em maiores altitudes (>920 m).

***Oligoryzomys* sp.**

Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 12), os indivíduos sequenciados LBCE20012, LBCE20022 e LBCE20045 de *Oligoryzomys* sp. foram encontrados no mesmo clado que os indivíduos de *Oligoryzomys flavescens* selecionados do *GenBank* com alto valor de suporte (*bootstrap* = 92%). Desta forma, podemos atestar que pertencem à espécie *O. flavescens*.

Já os indivíduos MW421, LBCE19067 e LBCE19097 de *Oligoryzomys* sp. foram encontrados como grupo-irmão de *Oligoryzomys rupestris* selecionados do *GenBank* com alto valor de suporte (*bootstrap* = 92%). Assim sendo, estes indivíduos podem corresponder a *O. rupestris* ou podem corresponder a uma espécie distinta, mas próxima. Uma vez que estes clados apresentam uma distância genética de 3,53% que pode ser o suficiente para diferenciar espécies ou caracterizar variação

intraespecífica (da Cruz et al., 2019). Dessa forma, optou-se por manter estes indivíduos apenas no nível de gênero.

Oligoryzomys flavescens (Waterhouse, 1837; Figura 13) apresenta uma ampla distribuição. É encontrado no centro e norte da Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. No Brasil é distribuído principalmente na Mata Atlântica e nos Pampas, mas também é encontrado em matas ciliares no Cerrado do Brasil próximo à fronteira com a Mata Atlântica. (Bonvicino & Weksler, 1998; Riveira et al., 2018; Weksler & Bonvicino, 2005; Figura 14).

Oligoryzomys rupestris Weksler & Bonvicino, 2005 é considerada como uma espécie endêmica de áreas com vegetação de Campos Rupestres no Brasil Central e Nordeste (Weksler & Bonvicino, 2005; Figura 15). O fato de três espécimes neste estudo terem sido recuperados como relacionados à *O. rupestris* mostra que os limites desta espécie, bem como sua extensão geográfica, precisam ser reavaliados. O estudo do Oliveira et al. (2007) sugere uma possível relação entre Campos Rupestres e Campos de Altitude, pois os Campos de Altitude apresentam muitas plantas xerofíticas típicas do Cerrado.

Oxymycterus quaestor

Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 16), todos os indivíduos sequenciados de *Oxymycterus quaestor* foram encontrados no mesmo clado que os indivíduos de *O. quaestor* selecionados do *GenBank* com alto valor de suporte (*bootstrap* = 98%). Ao mesmo tempo, não há amostras de *O. caparaoe*, *O. hucucha*, *O. inca*, *O. juliacae*, *O. nigrifrons* e *O. wayku* disponíveis no *GenBank*. Porém, *O. caparaoe* está restrito à uma única localidade conhecida, o Parque Nacional do Caparaó. Assim como, *O. hucucha* está restrita à poucas localidades na Bolívia e *O. juliacae* está restrito às florestas que ocorrem nos afluentes do Rio Inambari (Peru) e do Rio Chaparé (Bolívia). A espécie *O. nigrifrons* distribui-se somente ao longo do Rio Aceramarca, na Bolívia. *O. inca*, no Brasil, está restrito à Floresta Amazônica do estado do Acre. Por fim, *O. wayku* distribui-se ao na província de Tucumán, na Argentina. (Vilela et al., 2015). Desta forma, esta análise molecular confirma a espécie *O. quaestor* da identificação morfológica.

Oxymycterus quaestor Thomas, 1903 (Figura 17) é uma espécie de sigmodontíneo que ocorre no nordeste da Argentina (Província de Misiones), sul e sudeste do Brasil (do norte do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro), e pode estender-se ao extremo leste do Paraguai (Musser & Carleton, 2005; Figura 18).

***Monodelphis* sp.**

Com base nos resultados da análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 19), todos os indivíduos sequenciados de *Monodelphis* estão no mesmo clado e pertencem a uma mesma espécie do gênero. Esses indivíduos estão dispostos no mesmo clado que indivíduos de *M. dimidiata* e *M. sorex* do *GenBank*, com alto valor de suporte (*bootstrap* = 100%). Porém, ainda não existe consenso entre os pesquisadores acerca da nomenclatura das espécies do grupo *M. dimidiata* e *M. sorex*. Por exemplo, Pine e Handley (2008) consideraram estas espécies como distintas por sutis diferenças na cor de suas pelagens. No entanto, com base nos resultados moleculares de Vilela, Russo & Oliveira (2010) e Pavan (2016), *M. sorex* e *M. dimidiata* não apresentam diferenças suficientes nas suas sequências de *Mt-Cytb* que justificam uma divisão em linhagens distintas. Estas análises também apontam para a conclusão de que *M. sorex* é um sinônimo júnior de *M. dimidiata*.

Visto que a árvore filogenética geral de *Monodelphis* mostrou-se inconclusiva a respeito da espécie retratada, uma nova árvore filogenética foi construída. Esta árvore inclui apenas as espécies *M. sorex* e *M. dimidiata*, com o mesmo grupo externo da árvore filogenética geral. Nessa nova análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 20), todos os indivíduos aqui sequenciados de *Monodelphis* foram encontrados no mesmo clado que os indivíduos de *M. dimidiata* selecionados do *GenBank* com alto valor de suporte (*bootstrap* = 88%). Desta forma, podemos concluir que indivíduos sequenciados pertencem à espécie *M. dimidiata*. Os resultados aqui encontrados corroboram com a inclusão de *M. sorex* como sinônimo júnior de *M. dimidiata*.

Monodelphis Burnett, 1830 é o gênero com maior diversidade de gambás neotropicais englobando 25 espécies com representantes do sudoeste do Panamá até a região Pampa na Argentina (Caramaschi *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Pavan, Jansa & Voss, 2014; Pavan & Voss, 2016; Solari, 2010). Dezesesseis destas

espécies são encontradas no Brasil (Duda & Costa, 2015; Pine & Handley 2008) ocupando todos os biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Carvalho *et al.*, 2011).

Monodelphis dimidiata Wagner, 1847 (= *Monodelphis sorex*; Pavan, 2016; Vilela, Russo & Oliveira, 2010) possui ampla distribuição ocorrendo no Uruguai, sudeste do Brasil, leste do Paraguai e centro e norte da Argentina (Carvalho *et al.*, 2011; Pine & Handley, 2008; Solari, 2010), como mostram as Figuras 21 e 22.

5. CONCLUSÃO

Para quase todas as espécies estudadas: *Castoria angustidens*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oxymycterus quaestor* e *Monodelphis dimidiata*, a análise filogenética foi capaz de distingui-las e identificá-las através do marcador mitocondrial *Mt-Cytb*.

A análise molecular não foi capaz de confirmar a espécie *B. griserufescens* da identificação morfológica visto que ainda não há sequências de *Mt-Cytb* para esta espécie. Os espécimes de *Brucepattersonius* do PARNASO podem representar *B. griserufescens* ou uma nova unidade taxonômica.

As espécies crípticas de *Oligoryzomys* estudadas neste trabalho, necessitam de mais marcadores moleculares para chegar a um consenso de espécie. Já que é possível que uma distância genética de 3,53% seja uma variação intraespecífica ou seja suficiente para separar espécies. Dessa forma, os espécimes de *Oligoryzomys* que não foram identificados podem pertencer à *O. rupestris* ou representar uma nova espécie que é grupo-irmão de *O. rupestris*. Os relatos de *Oligoryzomys rupestris* na Mata Atlântica (incluindo este trabalho) e na Caatinga, além do Cerrado, ratifica que as distribuições geográficas da espécie, bem como seus limites, carecem de uma revisão.

Os três espécimes de *Oligoryzomys* sp. do Parque Nacional do Itatiaia adicionados, foram identificados pertencendo à mesma espécie: *O. flavescens*. Concomitantemente, diferiram dos demais espécimes do Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

Os *primers* MVZ05 e MVZ16 foram capazes de amplificar todas as espécies da família Sigmodontinae, bem como os da família Didelphidae (*Monodelphis*). Para espécies crípticas, as análises moleculares mostram-se praticamente indispensáveis e evidenciam a sua importância frente à identificação morfológica.

A identificação morfológica dos espécimes estudados provou-se competente, uma vez que, os táxons foram confirmados através da identificação molecular, com exceção de alguns espécimes de *Oligoryzomys* sp. e do gênero *Brucepattersonius*.

6. REFERÊNCIAS

- Abreu MS, Christoff AU, Valiati VH, de Oliveira LR. (2014) **New distribution records of Serra do Mar Grass Mouse *Akodon serrensis* Thomas, 1902 (Mammalia: Rodentia: Sigmodontinae) in the southernmost Brazil.** Check List 10(3), 655–659
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) **Basic local alignment search tool.** Journal of Molecular Biology, 215(3), 403–410.
- Avise JC. (2009) **Phylogeography: retrospect and prospect.** Journal of Biogeography, 36, 3–15.
- Bonvicino CR, Lindbergh SM & Maroja LS. (2002) **Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potencial use for monitoring environment.** Brazilian Journal of Biology, 62(4b), 765–774.
- Bonvicino CR & Weksler M. (1998) **A new species of *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Northeastern and Central Brazil.** Zeitschrift für Säugetierkunde, Jena, 63:90-103.
- Bovendorp RS, Villar N, Abreu-Junior EF, Bello C, Regolin AL, Percequillo AR, Galetti M. (2017) **Atlantic small-mammal: a dataset of communities of rodents and marsupials of the Atlantic forests of South America.** Ecology, 98, 2226.
- Caramaschi FP, Nascimento FF, Cerqueira R, Bonvicino CR. (2011) **Genetic diversity of wild populations of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia: Didelphidae), in Brazilian landscapes.** Biological Journal of the Linnean Society, 104(2), 251–263.
- Carvalho BA, Oliveira LFB, Langguth A, Freygang CC, Ferraz RS, Mattevi MS. (2011) **Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae).** Journal of Mammalogy. 92, 121–133.
- Cronemberger C & Castro EBV. (2007) **Ciência e conservação na Serra dos Órgãos. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.** Ibama, Brasília, Distrito Federal. 298p.

Da Cruz MOR, Weksler M, Bonvicino CR, Bezerra AMR, Prosdocimi F, Furtado C, Geise L, Catzeflis F, de Thoisy B, Oliveira LFB, Silva C, Oliveira JA. (2019) **DNA barcoding of the rodent genus *Oligoryzomys* (Cricetidae: Sigmodontinae): mitogenomic-anchored database and identification of nuclear mitochondrial translocations (*Numts*)**. Mitochondrial DNA.

DeBlase AF & Martin RE. (1981) **A manual of mammalogy, with keys to families of the world**. WCB. McGraw-Hill, New York.

Demos TC, Peterhans JCK, Agwanda B, Hickerson MJ. (2014) **Uncovering cryptic diversity and refugial persistence among small mammal lineages across the Eastern Afrotropical biodiversity hotspot**. Molecular Phylogenetics and Evolution, 71, 41–54.

Duda R & Costa LP. (2015) **Morphological, morphometric and genetic variation among cryptic and sympatric species of southeastern South America three-striped opossums (*Monodelphis*: Mammalia: Didelphidae)**. Zootaxa, 3936, 485–506.

Edgar RC. (2004) **MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. Nucleic Acids Res, 32, 1792–1797

Figueiredo MSL, Barros CS, Delciellos AC, Guerra EB, Asfora PH, Astúa D, Bergallo HG, Cerqueira R, Geise L, Gentile R, Grelle CEV, Iack-Ximenes GE, Oliveira LC, Weksler M, Vieira MV. (2017) **Abundance of small mammals in the Atlantic Forest (ASMAF): a data set for analyzing tropical community patterns**. Ecology, 98, 2981.

Geise L, Pereira LG, Bossi DEP, Bergallo HG. (2004) **Pattern of elevational distribution and richness of non volant mammals in Itatiaia National Park and its surroundings, in Southeastern Brazil**. Brazilian Journal of Biology, 64(3B), 599-612.

Gonçalves PR, Myers P, Vilela JF, Oliveira JA. (2007) **Systematics of species of the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern Brazil and implications for the biogeography of the Campos de Altitude**. Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan, 197, 1-24.

Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho ELA, Carmignotto AP. (2017) **Mamíferos da Mata Atlântica**. Pp. 391-482, In: Monteiro-Filho ELA, Conte CE (Orgs.), Revisões em zoologia: Mata Atlântica. Editora da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. PARNASO, 2008. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnaso/>> Acesso em: 8 de julho de 2019.

Jacob, Gabriela. **Identificação Molecular e Filogenia de *Delomys dorsalis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) dos Campos de Altitude no Leste Brasileiro**. 2015. 43f. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Kearse, M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. (2012) **Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data**. Bioinformatics, 28, 1647-1649

Lanzone C, Ojeda AA, Ojeda RA, Albanese S, Rodríguez D, Dacar MA. (2011) **Integrated analyses of chromosome, molecular and morphological variability in the Andean mice *Eligmodontia puerulus* and *E. moreni* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)**. Zeitschrift Für Säugetierkunde, 76(5), 555–562.

Moreira JC, Manduca EG, Gonçalves PR, Pereira RF, Lessa G, Dergam JA. (2009) **Small mammals from Serra do Brigadeiro State Park, Minas Gerais, Southeastern Brazil: Species Composition and Elevational Distribution**. Arquivos do Museu Nacional, v. 67, n.1-2, p 103-118.

Musser GG & Carleton MD. (2005) **Superfamily Muroidea**. In Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference (De Wilson & DM Reeder, eds). The John Hopkins University Press, Baltimore, v.2, p.894-1531.

Nielsen JV, Nielsen FH, Ismail R, Noraberg J, Jensen NA. (2007) **Hippocampus-like corticoneurogenesis induced by two isoforms of the BTB-zinc finger gene *Zbtb20* in mice**. Development, 134, 1133–1140.

Oliveira JA & Bonvicino CR. (2002) **A new species of sigmodontine rodent from the Atlantic forest of eastern Brazil**. Acta Theriologica, 47, 307-322.

Oliveira SN, Carvalho Júnior OA, Martins ES, Silva TM, Guimarães RF, Gomes RAT. (2007) **Identificação de Unidade de Paisagem e sua implicação no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio De Janeiro**. Revista Brasileira de Geomorfologia, 8, 89-108.

Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA, Patton JL. (2012) **Lista anotada dos mamíferos do Brasil**. 2. ed. Occasional Papers in Conservation Biology, 6, 1-76.

Pardiñas UFJ, Geise L, Ventura K, Lessa G. (2016) **A new genus for *Habrothrix angustidens* and *Akodon serrensis* (Rodentia, Cricetidae): again paleontology meets neontology in the legacy of lund**. Mastozoología Neotropical, 23, 93-115.

Patton JL, Pardiñas UF & D'Elia G. (Eds.). (2015) **Mammals of South America, volume 2: rodents**. University of Chicago Press.

Pavan SE. (2016) **Phylogeny, Systematics and Biogeography of Short-Tailed Opossums (Didelphidae: *Monodelphis*)**. CUNY Academic Works.

Pavan SE & Voss RS. (2016) **A revised subgeneric classification of short-tailed opossums (Didelphidae: *Monodelphis*)**. American Museum Novitates, 3868, 1-44.

Pavan SE, Jansa SA & Voss RS. (2014) **Molecular phylogeny of short-tailed opossums (Didelphidae: *Monodelphis*): Taxonomic implications and tests of evolutionary hypotheses**. Molecular Phylogenetics and Evolution, 79, 199–214.

Pavan SE, Jansa SA & Voss RS. (2016) **Spatiotemporal diversification of a low-vagility Neotropical vertebrate clade (short-tailed opossums, Didelphidae: *Monodelphis*)**. Journal of Biogeography, 43(7), 1299-1309.

Percequillo AR, Weksler M & Costa LP. (2011) **A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography**. Zoological Journal Linnean Society, 161, 357–390

Pine RH & Handley Junior CO. (2008) **Genus *Monodelphis* Burnett, 1830**. In A.L. Gardner (editor), Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats, 82–107. Chicago: University of Chicago Press.

Price MN, Dehal OS & Arkin AP. (2010) **FastTree 2 — approximately maximum-likelihood trees for large alignments**. PLoS ONE, 5, 9490

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. (2009) **The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forests distributed? Implications for conservation.** Biological Conservation, 142(6), 1141–1153.

Rivera PC, González-Ittig RE, Robainas Barcia A, Trimarchi LI, Levis S, Calderón GE & Gardenal CN. (2018) **Molecular phylogenetics and environmental niche modeling reveal a cryptic species in the *Oligoryzomys flavescens* complex (Rodentia, Cricetidae).** Journal of Mammalogy, 99(2), 363–376.

Rosa CC, Flores T, Pieczarka JC, Rossi RV, Sampaio MIC, Rissino JD, Amaral PJS, Nagamachi CY. (2012) **Genetic and morphological variability in South American rodent *Oecomys* (Sigmodontinae, Rodentia): evidence for a complex of species.** Journal of Genetics, 91(3), 265–277.

Smith MF & Patton JL. (1993) **Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe.** Biological Journal Linnean Society, 50, 149–177.

Solari S. (2010) **A molecular perspective on the diversification of short-tailed opossums (*Monodelphis*: Didelphidae).** Mastozoología Neotropical, 17(2), 317–333.

Suárez-Villota EY, Di-Nizo CB, Neves CL, Silva MJJ. (2013) **First cytogenetic information for *Drymoreomys albimaculatus* (Rodentia, Cricetidae), a recently described genus from Brazilian Atlantic forest.** ZooKeys, 303, 65–76.

Testoni AF, Fumis J, Althoff SL, Tortato FR, Cherem JJ. (2012) ***Akodon serrensis* Thomas, 1902 (Mammalia: Rodentia: Sigmodontinae): records in Santa Catarina state, southern Brazil.** Check List, Rio Claro, v. 8, n. 6, p. 1344–1346, 2012

Thermo Fisher Scientific. (2009) **NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual.** Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE.

Tobe SS, Kitchener AC & Linacre AMT. (2010) **Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes.** PLoS ONE, 5(11), e14156.

Vasconcelos MF. (2011) **O que são os Campos Rupestres e Campos de Altitude nos topos das montanhas no Leste do Brasil?** Revista Brasileira de Botânica, 34, 241-246.

Ventura K, Sato-Kuwabara Y, Fagundes V, Geise L, Leite YLR, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y, Rodriguez MT. (2012) **Phylogeographic structure and karyotypic diversity of the Brazilian Shrew Mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest.** Cytogenetic and Genomic Research, 138, 19–30.

Vilela JF. (2005) **Filogenia molecular de *Brucepattersonius* (Sigmodontinae: Akodontini) com uma análise morfométrica craniana do gênero.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 67p.

Vilela JF, Russo CAM & Oliveira JA. (2010) **An assessment of morphometric and molecular variation in *Monodelphis dimidiata* (Wagner, 1847) (Didelphimorphia: Didelphidae).** Zootaxa, 2646, 26–42.

Vilela JF, Gonçalves PR & Oliveira JA. (2015) **Genus *Brucepattersonius* Hershkovitz, 1998.** Mammals of South America, Volume 2 - Rodents (J. L. Patton, U. F. J. Pardiñas & G. D'Elía, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Weksler M & Bonvicino CR. (2005) **Taxonomy of pygmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with the description of two new species.** Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, 63(1), 113–130

Yazbeck GM, Brandão RL, Cunha HM, Paglia AP (2011). **Detection of two morphologically cryptic species from the *cursor* complex (*Akodon* spp; Rodentia, Cricetidae) through the use of RAPD markers.** Genetics and Molecular Research, 10, 2881-2892.

ILUSTRAÇÕES:



Figura 1: Campos de A

io Varricchio.

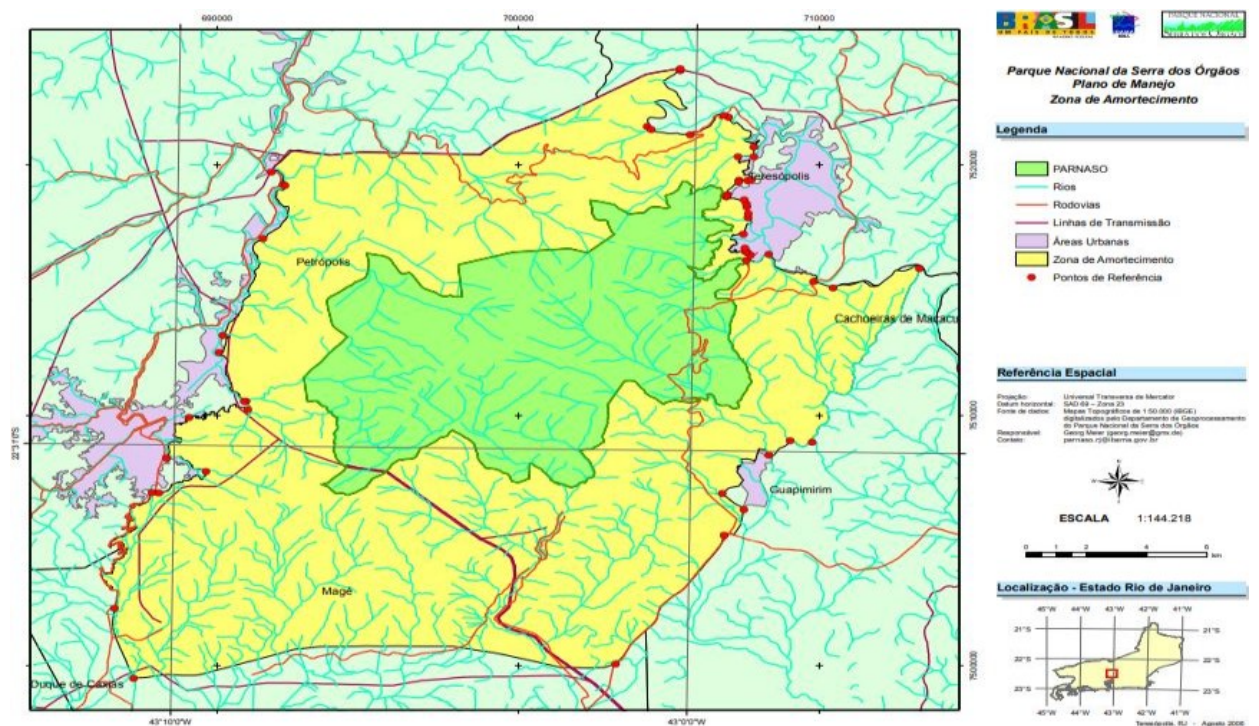


Figura 2: Mapa do Par

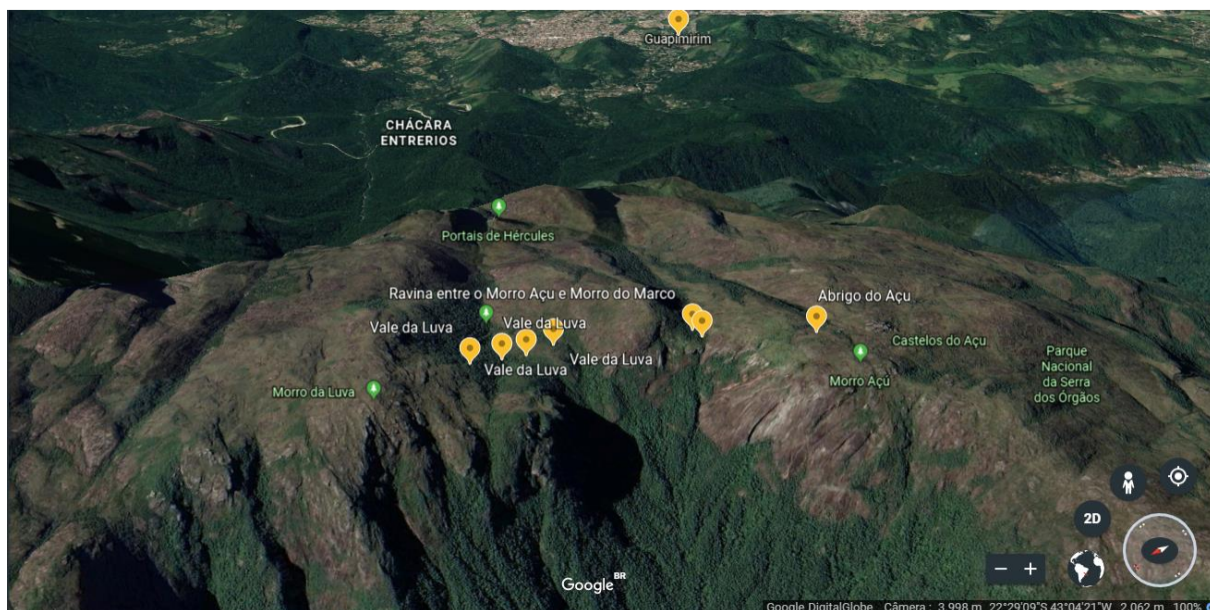


Figura 3: Localidades do PARNASO onde foram coletados os espécimes: Vale da Luva, Abrigo do Açú e Ravina entre o Morro Açú e o Morro do Marco. Fonte: Google Earth.

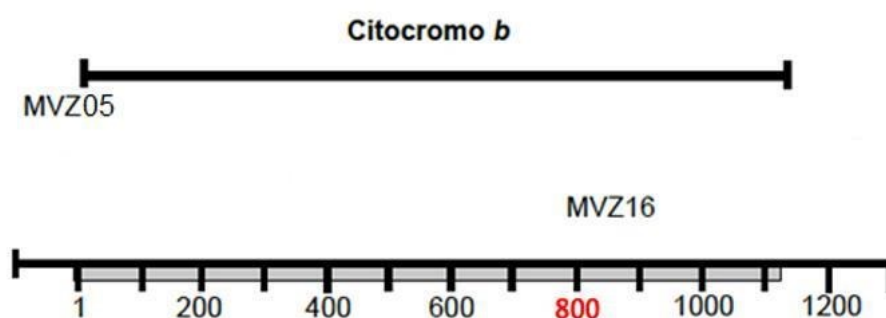


Figura 4: Mapa com os *primers* utilizados para amplificar e sequenciar o citocromo b (*Mt-Cytb*).

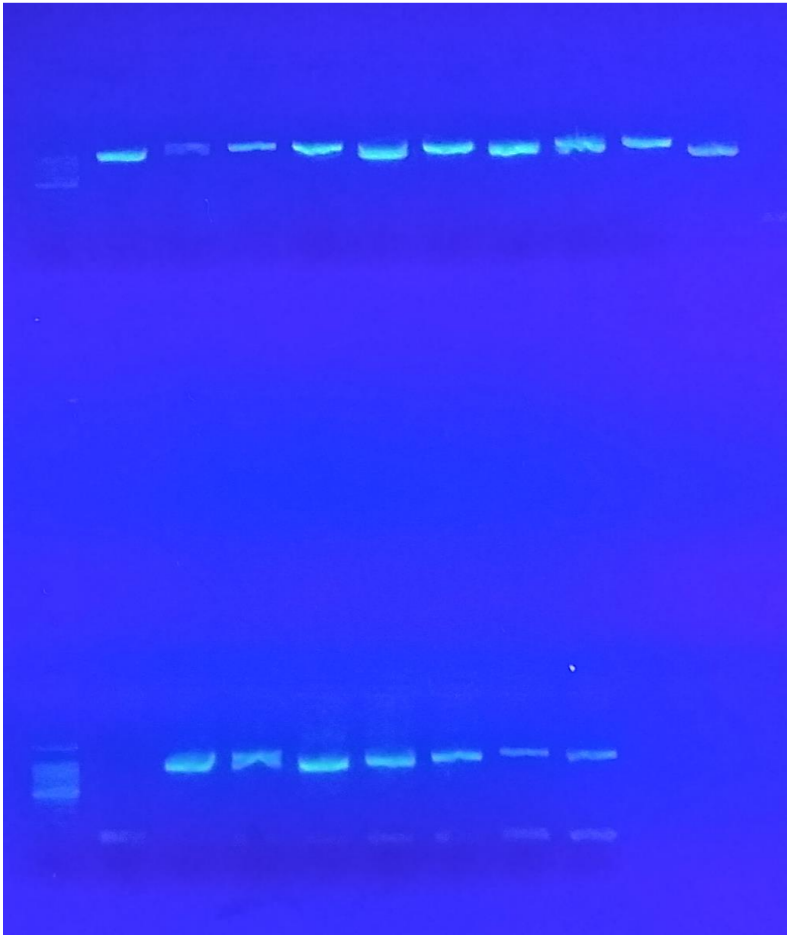


Figura 5: Gel de agarose a 2% para PCR observados no transiluminador.

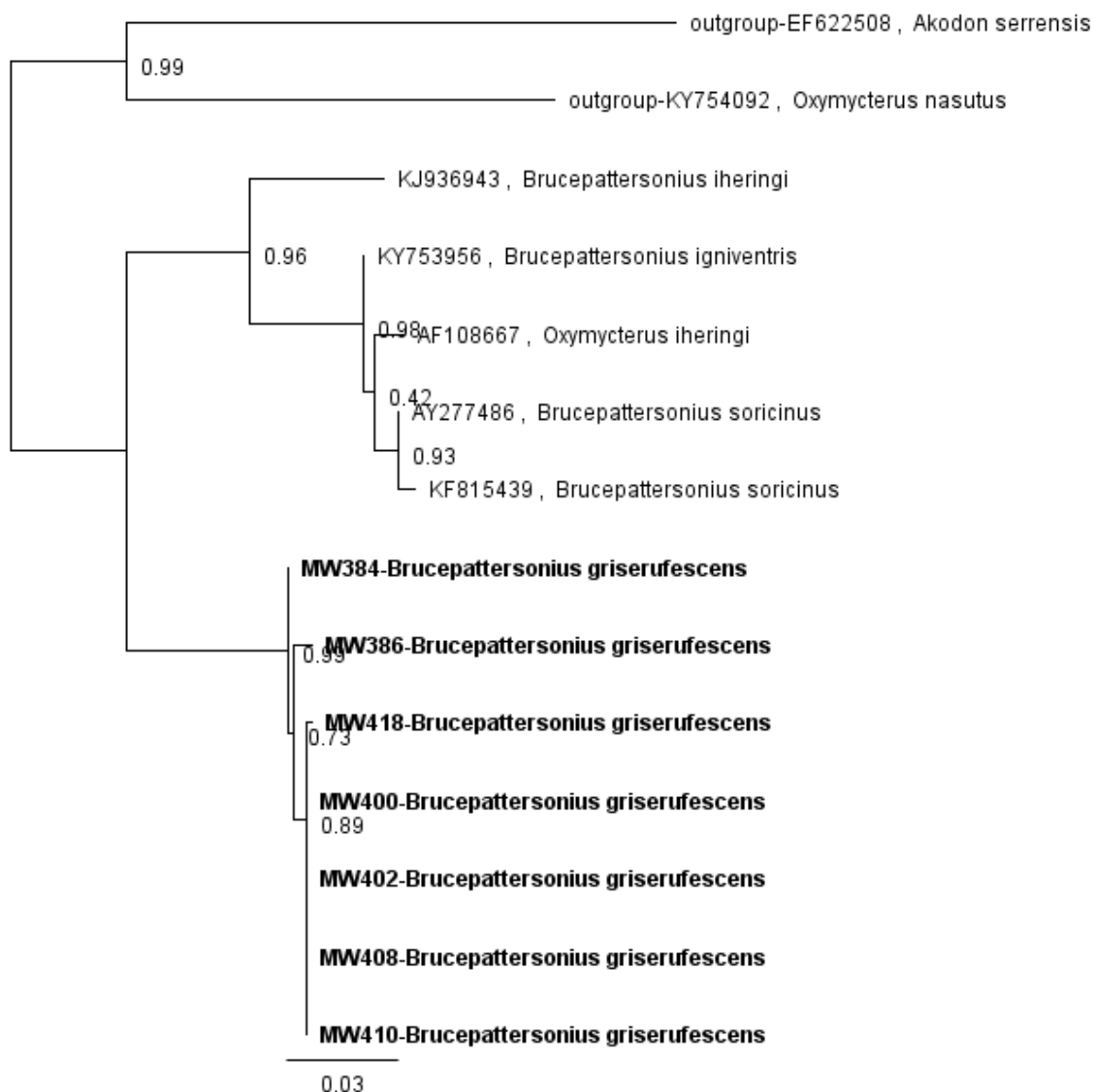


Figura 6: Árvore filogenética apresentando o resultado de *Bucepattersonius griserufescens* para o gene *Mt-Cytb* utilizando espécimes de *Castoria angustidens* (= *Akodon serrensis*) e *Oxymycterus nasutus* como grupo externo.



Figura 7: Espécime de *Brucepattersonius* sp. Foto: Paulo Ricardo de Oliveira Roth.

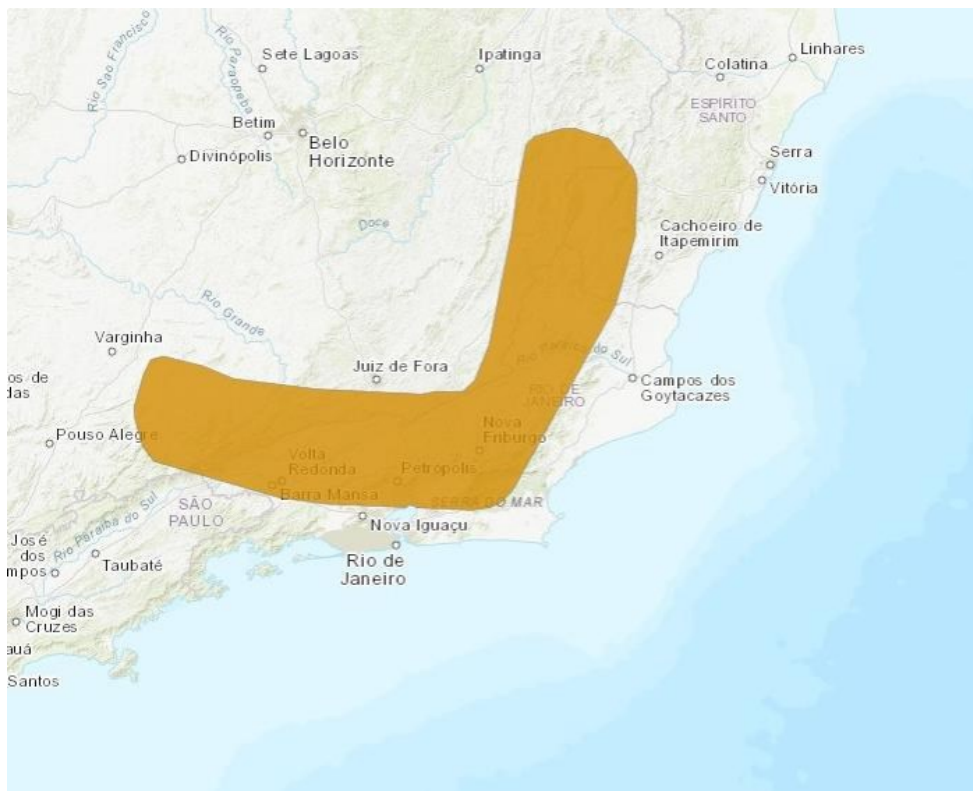


Figura 8: Mapa de distribuição de *Brucepattersonius griserufescens*. Fonte: modificado de IUCN.

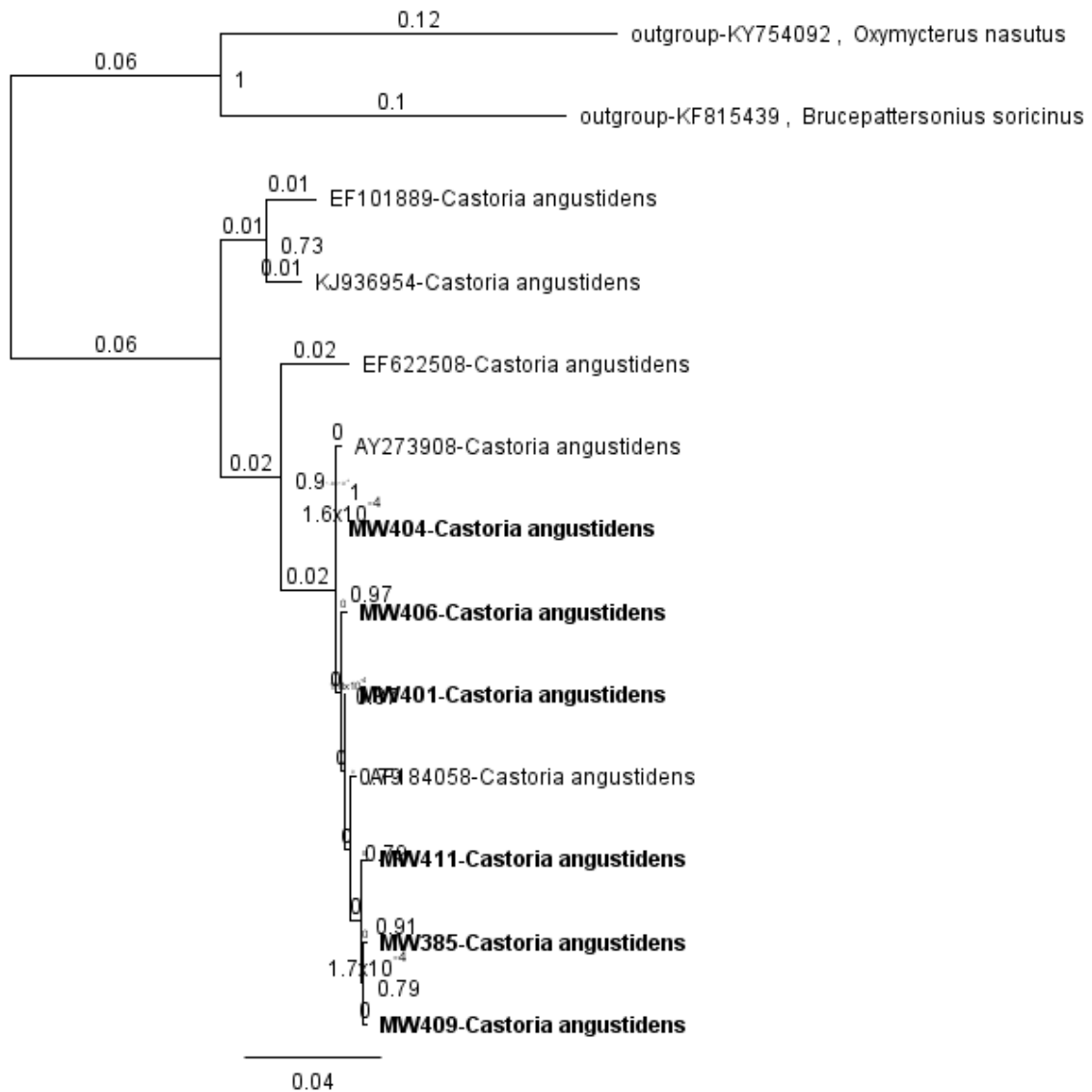


Figura 9: Árvore filogenética apresentando o resultado de *Castoria angustidens* (= *Akodon serrensis*) para o gene *Mt-Cytb* utilizando um espécime de *Bucepattersonius soricinus* e *Oxymycterus nasutus* como grupo externo.



Figura 10: Espécime de *Castoria angustidens* (= *Akodon serrensis*). Foto: André Felipe Testoni.

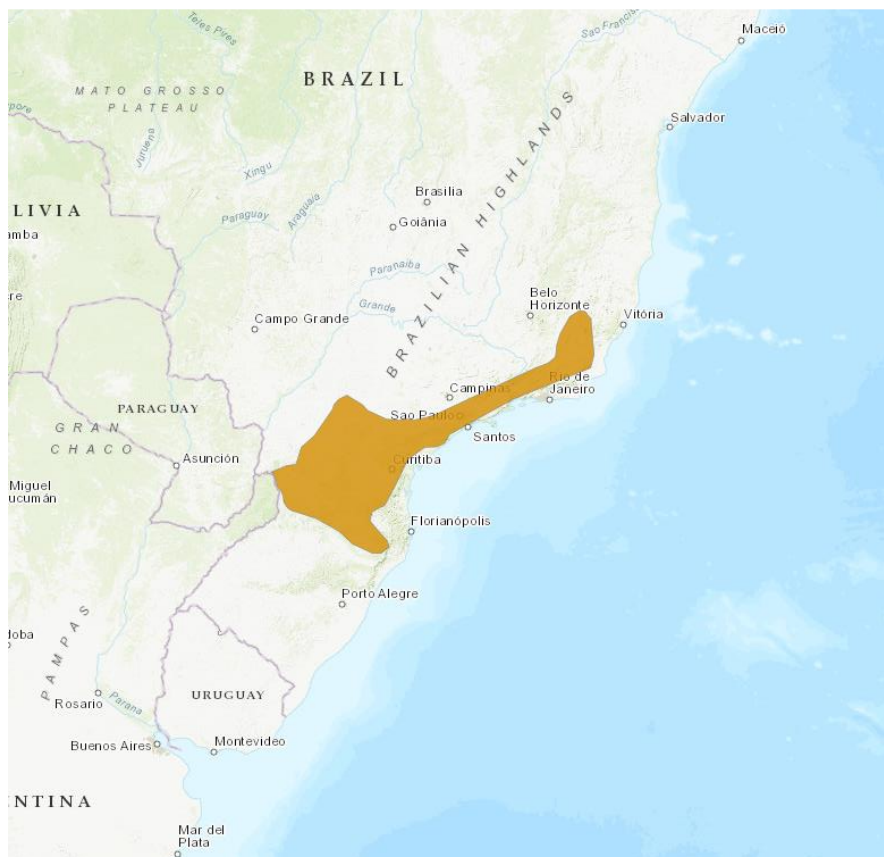


Figura 11: Mapa de distribuição da espécie *Castoria angustidens* (= *Akodon serrensis*). Fonte: modificado de IUCN.

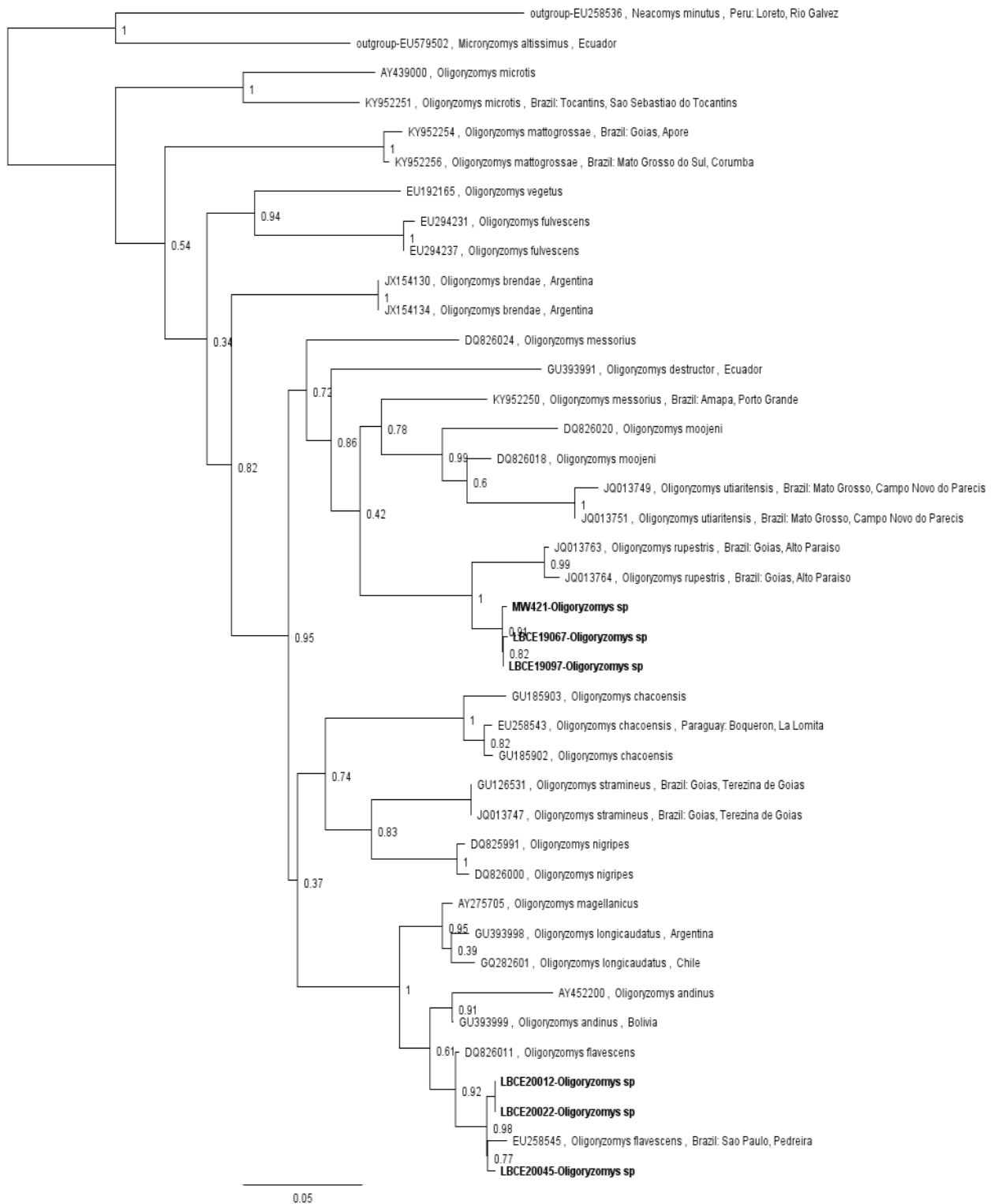


Figura 12: Árvore filogenética apresentando o resultado do gênero *Oligoryzomys* para o gene *Mt-Cytb* utilizando um espécime de *Neacomys minutus* e *Microryzomys altissimus* como grupo externo.



Figura 13: Espécime de *Oligoryzomys flavescens*. Foto: Mauro Teixeira Junior.



Figura 14: Mapa de distribuição da espécie *Oligoryzomys flavescens*. Fonte: modificado de IUCN.

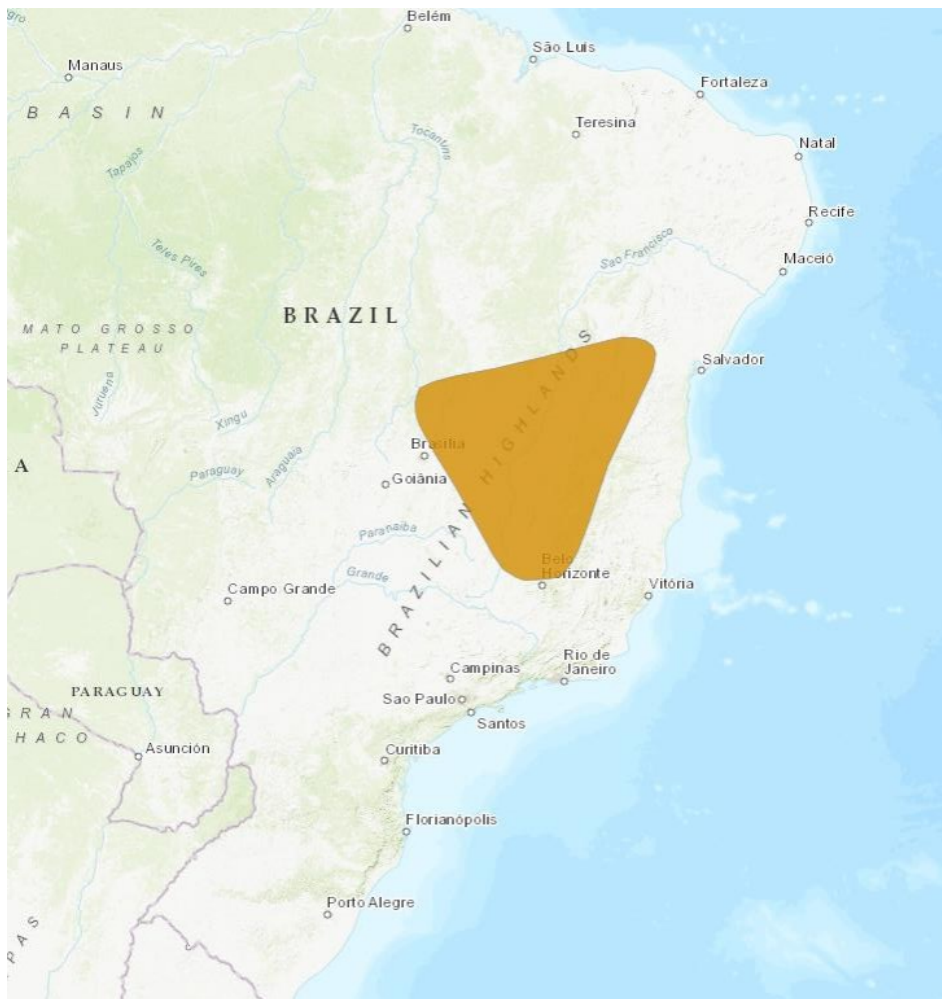


Figura 15: Mapa de distribuição da espécie *Oligoryzomys rupestris*. Fonte: modificado de IUCN.

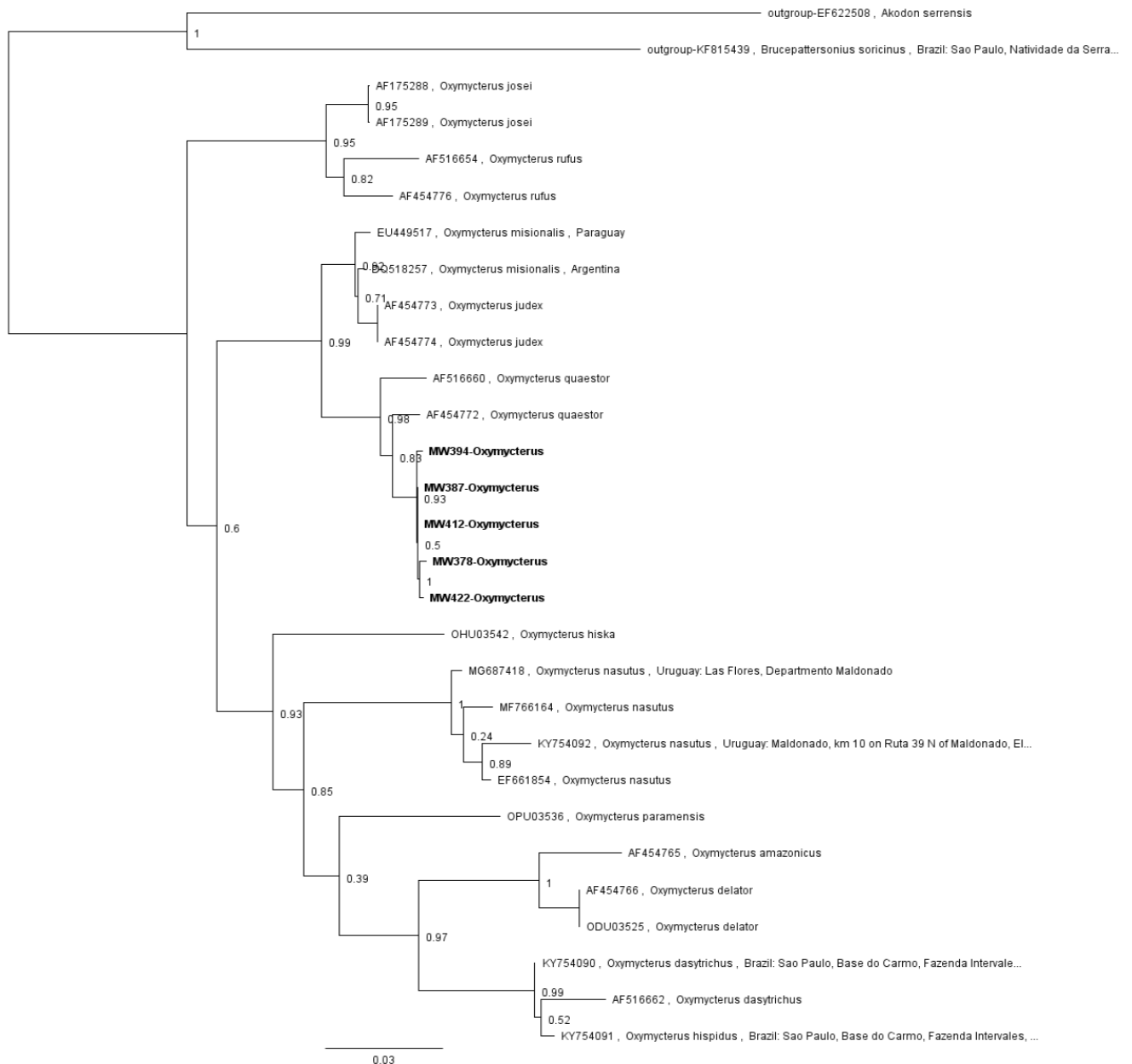


Figura 16: Árvore filogenética apresentando o resultado de *Oxymycterus quaeator* para o gene *Mt-Cytb* utilizando um espécime de *Akodon serrensis* e *Brucepattersonius soricinus* como grupo externo.



Figura 17: Espécime de *Oxymycterus quaestor*. Foto: Paulo Ricardo de Oliveira Roth.

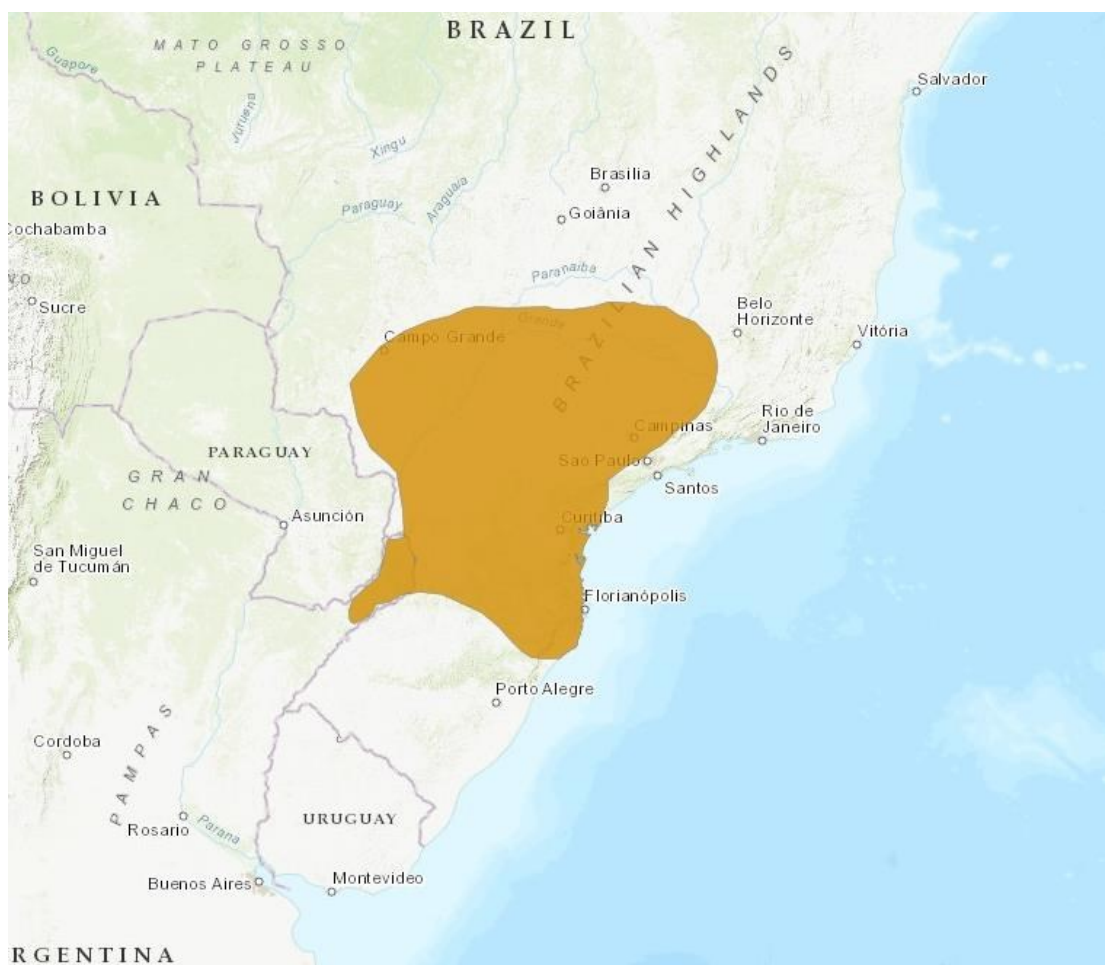


Figura 18: Mapa de distribuição da espécie *Oxymycterus quaestor*. Fonte: modificado de IUCN.

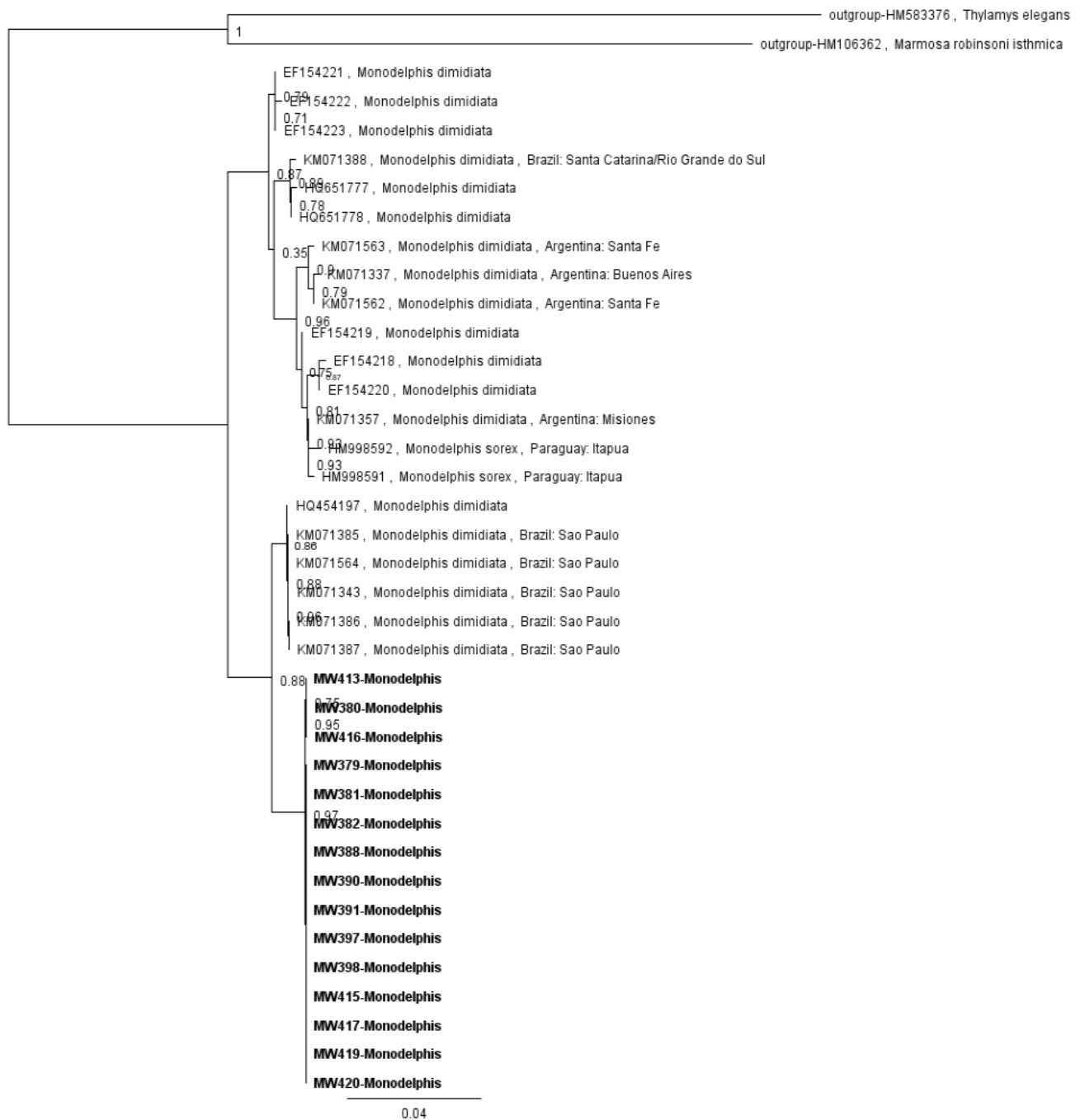


Figura 20: Árvore filogenética apresentando o resultado de *Monodelphis sorex* e *Monodelphis dimidiata* para o gene *Mt-Cytb* utilizando um espécime de *Thylamys elegans* e *Marmosa robinsoni* como grupo externo.



Figura 21: Espécime de *Monodelphis dimidiata*. Foto: João Alves de Oliveira.

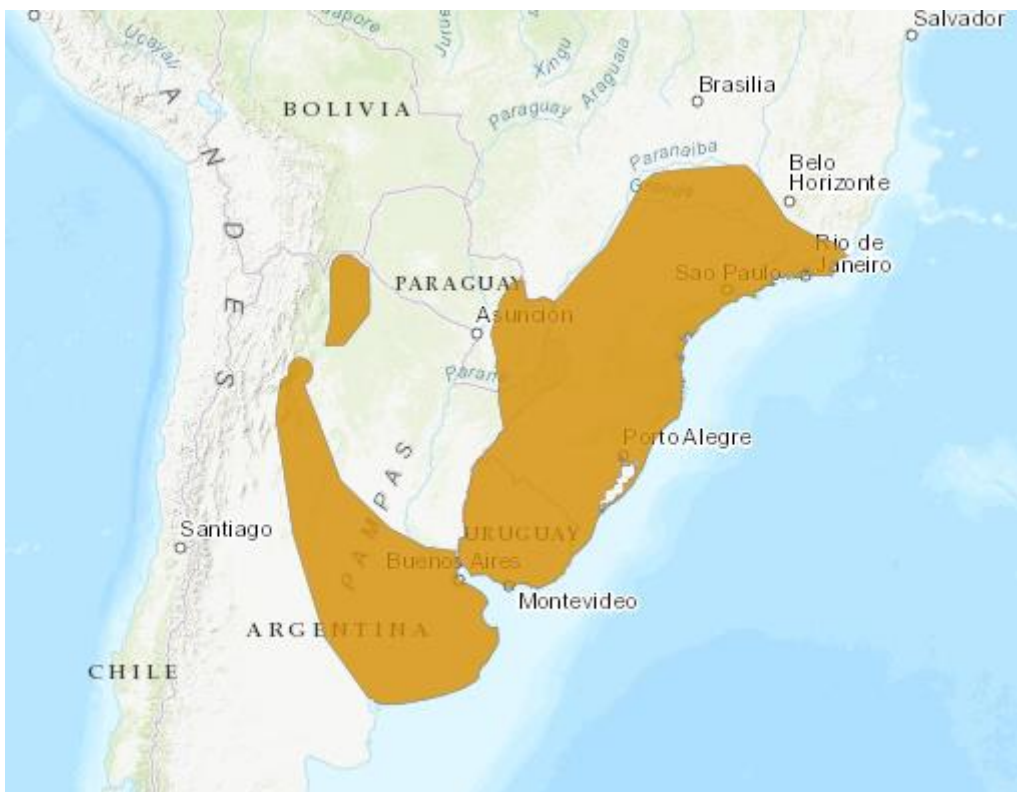


Figura 22: Mapa de distribuição da espécie *Monodelphis dimidiata*. Fonte: modificado de IUCN.

TABELAS:

Tabela 1: Lista de espécimes coletados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

MW/nº campo	MNRJ/nº coleção	Espécie	Localidade	Latitude	Longitude	Altitude
378	81222	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
379	81223	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.68907'S	043°03.30463'W	2050
380	81224	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.68907'S	043°03.30463'W	2050
381	81225	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.52359'S	043°03.28537'W	2010
382	81226	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
384	81228	<i>Bucepattersonius griserufescens</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.906'S	43°03.481'W	2069
385	81229	<i>Castoria angustidens</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
386	81230	<i>Bucepattersonius griserufescens</i>	Vale da Luva	22°28.52359'S	043°03.28537'W	2010
387	81231	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Vale da Luva	22°28.63263'S	043°03.29667'W	2050
388	81232	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.52359'S	043°03.28537'W	2010
390	81234	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.68907'S	043°03.30463'W	2050
391	81235	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.68907'S	043°03.30463'W	2050
392	81236	<i>Bucepattersonius griserufescens</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.906'S	43°03.481'W	2069
394	81238	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153

395	81239	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.906'S	43°03.481'W	2069
397	81241	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
398	81242	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
400	81244	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
401	81245	<i>Castoria angustidens</i>	Vale da Luva	22°28.63263'S	043°03.29667'W	2050
402	81246	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
404	81248	<i>Castoria angustidens</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
405	81249	<i>Castoria angustidens</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
406	81250	<i>Castoria angustidens</i>	Vale da Luva	22°28.52359'S	043°03.28537'W	2010
408	81252	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
409	81253	<i>Castoria angustidens</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.902'S	43°03.459'W	2069
410	81254	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.902'S	43°03.459'W	2069
411	81255	<i>Castoria angustidens</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
412	81256	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Vale da Luva	22°28.63263'S	043°03.29667'W	2050
413	81257	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.52359'S	043°03.28537'W	2010
415	81259	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820

416	81260	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
417	81261	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Abrigo do Açú	22°29.041'S	43°03.642'W	2153
418	81262	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
419	81263	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Vale da Luva	22°28.59123'S	043°03.27801'W	1820
420	81264	<i>Monodelphis dimidiata</i>	Ravina entre Morro Açú e Morro do Marco	22°28.906'S	43°03.481'W	2069
421	81265	<i>Oligoryzomys</i> sp.	Vale da Luva	22°28.68907'S	043°03.30463'W	2050
422	81266	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Vale da Luva	22°28.63263'S	043°03.29667'W	2050

Tabela 2: Lista de espécimes coletados de *Oligoryzomys* sp. do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional do Itatiaia.

nº de campo	Espécie	País	Estado	Município/Região
LBCE19067	<i>Oligoryzomys</i> sp.	BRASIL	RJ	Parque Nacional da Serra dos Órgãos
LBCE19097	<i>Oligoryzomys</i> sp.	BRASIL	RJ	Parque Nacional da Serra dos Órgãos
LBCE20012	<i>Oligoryzomys</i> sp.	BRASIL	MG	Parque Nacional do Itatiaia
LBCE20022	<i>Oligoryzomys</i> sp.	BRASIL	MG	Parque Nacional do Itatiaia
LBCE20045	<i>Oligoryzomys</i> sp.	BRASIL	MG	Parque Nacional do Itatiaia

Tabela 3: Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeos	Sequência	pb	Fonte
MVZ05	F: CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	801	Smith & Patton (1993)
MVZ16	R: AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	801	Smith & Patton (1993)

Tabela 4: Grupos externos utilizados para cada táxon.

Táxons	Grupo externo
<i>Bucepattersonius griserufescens</i>	<i>Oxymycterus nasutus</i> <i>Castoria angustidens</i>
<i>Castoria angustidens</i>	<i>Oxymycterus nasutus</i> <i>Bucepattersonius soricinus</i>
<i>Monodelphis</i> sp.	<i>Thylamys elegans</i> <i>Marmosa robinsoni</i>
<i>Oligoryzomys</i> sp.	<i>Neacomys minutus</i> <i>Microryzomys altissimus</i>
<i>Oxymycterus quaestor</i>	<i>Castoria angustidens</i> <i>Bucepattersonius soricinus</i>

APÊNDICES:

APÊNDICE A: Protocolo de Extração de DNA – Promega Wizard® Tail Modificado

1. Preencher o livro de extração;
2. Preparar 2 conjuntos de tubos Eppendorfs de 1,5 mL identificados para cada amostra;
3. Numerar a tampa e lateral do primeiro conjunto de Eppendorfs (ex.: 1, 2, 3,...);
4. Tirar Proteinase K do freezer e mantê-la resfriada em gelo;
5. Preparar estoque de EDTA ($120\ \mu\text{L} \times N$) + Solução de Lise de Núcleo ($500\ \mu\text{L} \times N$) em tubo Falcon. (Onde N é a quantidade de amostras/tubos Eppendorfs);
5. Resfriar até turvar (aprox. 5 min);
6. Colocar $600\ \mu\text{L}$ de EDTA + Solução de Lise de Núcleo no primeiro conjunto de Eppendorfs;
7. Extrair um fragmento de aproximadamente 10 mg do tecido origem (se grande, cortar em pedaços pequenos). Adicionar o tecido ao Eppendorf contendo EDTA/ Solução de Lise de Núcleos;
8. Adicionar $10\ \mu\text{L}$ de Proteinase K ao primeiro conjunto de Eppendorfs (usar ponteira com filtro, uma ponteira por amostra);
9. Incubar a $55\ ^\circ\text{C}$ no shaker por no mínimo 3 horas ou overnight;
10. Vortexear os Eppendorfs quando retirados do shaker; anotar a cor do extrato;
11. Esperar esfriar até a temperatura ambiente por 10 minutos;
12. Numerar a tampa e a lateral do segundo conjunto de Eppendorfs e adicionar $600\ \mu\text{L}$ de isopropanol a temperatura ambiente;
13. Adicionar $200\ \mu\text{L}$ de Solução de Precipitação de Proteínas (usar ponteira com filtro);
14. Vortexear vigorosamente por 20 segundos;

15. Resfriar a amostra em gelo por 10 minutos;
16. Centrifugar por 4 minutos a 16.000 RCF. A proteína precipitada vai formar um *pellet* branco firme;
17. Transferir o sobrenadante contendo o DNA (deixando o *pellet* = sedimento de proteína para trás) para o Eppendorf contendo isopropanol (cuidado ao transferir o sobrenadante; não deixar o *pellet* descolar, é melhor deixar um pouco de sobrenadante para trás);
18. Homogeneizar gentilmente a solução, por inversão 50 vezes;
19. Centrifugar por 1 minuto em 16.000 RCF (a temperatura ambiente);
20. Descartar com precaução o sobrenadante;
21. Adicionar 600 µL de etanol 70% (1ª lavagem);
22. Inverter gentilmente o tubo várias vezes para lavar o DNA;
23. Centrifugar por 1 minuto em 16.000 RCF (a temperatura ambiente);
24. Desprezar o etanol cuidadosamente, pois o *pellet* de DNA está um pouco solto;
25. Adicionar 600 µL de etanol 70% (2ª lavagem);
26. Inverter gentilmente várias vezes o tubo para lavar o DNA;
27. Centrifugar por 4 minutos em 16.000 RCF (a temperatura ambiente);
28. Desprezar o etanol cuidadosamente;
29. Colocar o Eppendorf aberto no SpeedVac por 15 min para secar. Checar se está seco;
30. Adicionar 200 µL de Solução de Reidratação de DNA (TE) ou água ultra-pura;
31. (1) Hidratar o DNA por incubação a 65 °C por 1 hora, periodicamente misturar a solução batendo no tubo com gentileza ou (2) hidratar o DNA incubando a solução durante a noite (overnight), a temperatura ambiente ou refrigerada a 4 °C;
32. Quantificar a amostra no Nanodrop;
33. Diluir a amostra se estiver muito concentrada;

34. Armazenar a amostra no freezer (-18 °C).

APÊNDICE B: Preparação do Gel de Agarose a 2% para PCR

1. Colocar a base acrílica no suporte plástico;
2. Colocar os pentes na base acrílica na posição correta (devidamente encaixados no suporte);
3. Colocar a placa de Petri na balança e tarar (zerar);
4. Pesar no papel alumínio 1,41g de agarose;
5. Separar em uma proveta 70mL de TAE 1X (para cada 1g de agarose, adiciona-se 50mL de TAE);
6. Colocar a agarose em pó dentro de um frasco Erlenmeyer, e em seguida o TAE 1X;
7. Misturar lentamente e levar ao micro-ondas durante aproximadamente 90s (verificar a formação de bolhas durante o aquecimento);
8. Utilizando luvas de proteção, retirar o frasco quente do micro-ondas;
9. Misture com cuidado, para resfriar mais rápido aconselha-se colocar embaixo da torneira, sempre mexendo;
10. Ao chegar a uma temperatura morna, (isto é possível ao toque) colocar o gel na base acrílica já com os pentes e aguardar 20-25 minutos para solidificação;
11. Retirar os pentes do gel verticalmente com muito cuidado, sem fazer movimentos bruscos laterais para não estragar o gel. Ao retirar é possível visualizar os poços alinhados;
12. Retirar a base acrílica do suporte plástico;
13. Não retirar o gel da base acrílica;
14. Inserir gel + base na cuba (vide instruções no apêndice C).

Obs.: Usar pentes de acordo com o número de amostras. Sempre incluir um espaço para a Escala.

APÊNDICE C: Protocolo de Eletroforese para PCR

1. Identificar e anotar as amostras e a escala como ficarão dispostas no gel;
2. Colocar a base acrílica com o gel na cuba da eletroforese;
3. Acrescentar o TAE 1X na cuba em uma quantidade suficiente para cobrir o gel;
4. Preparar 1 µL de corante-marcador para cada amostra de DNA no recipiente separado para a mistura (Corante-marcador utilizado: mistura proporcional de Blue Green e Blue Orange, 0,5 µL de cada);
5. Pipetar 2 µL da amostra de DNA e misturar bem ao corante com a mesma ponteira, sempre evitando bolhas;
6. Colocar a mistura no poço do gel respectivo para cada amostra;
7. No último poço de cada linha colocar a mistura de 3 µL da escala mais 1 µL do corante-marcador (Escala utilizada: DNA Ladder 100 pb);
8. Após o carregamento das amostras, ligar a cuba, conferir se os valores que apareceram no visor correspondem com as especificações abaixo:

$U = 90 \text{ V}$

$I = 200 \text{ mA}$

$P = 75 \text{ W}$

Caso não, corrigir antes de dar continuidade. Lembrando sempre que o DNA corre para o lado positivo (vermelho);

9. Após 45 minutos, desligar a cuba, retirar o gel da base acrílica colocando-o no transiluminador de UV;
10. Utilizar óculos de proteção para visualizar as bandas do DNA;
11. Tirar uma fotografia;
12. Fazer esquema do gel e imprimir para catalogação;

13. Jogar fora o gel e todo material utilizado no procedimento em saco plástico separado do lixo comum.

Obs.: Trocar o TAE 1X da cuba após algumas utilizações.

Obs. 2: Ter sempre o cuidado de não deixar ar (espaço entre a ponta e líquido na ponteira quando for aplicar o gel).

APÊNDICE D: Protocolo de Purificação do DNA (Peg 20%)

1. Transferir o produto de PCR para tubos de 1,5 mL enumerados, acrescentar a mesma quantidade de Peg (1:1). Exemplo: 20 µl de PCR + 20 µL de PEG (sem fazer bolhas);
2. Colocar os tubos a 37°C por 15 minutos em incubadora e agitador (velocidade média);
3. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 RPM;
4. Com a pipeta, descartar o sobrenadante com muito cuidado;
5. Agregar 45 µL de etanol 80% gelado (para 20 µL de PCR). Esperar 1 minuto e centrifugar por 1 minuto;
6. Com a pipeta, descartar o sobrenadante com muito cuidado;
7. Repetir os passos 5 e 6;
8. Colocar no SpeedVac até secar (em média, 15 minutos). Verificar;
9. Acrescentar 15 µL de água ultrapura aos tubos;
10. Vortexear e centrifugar por 30 segundos. Guardar na geladeira;
11. Correr um gel de 2% utilizando 4 µL de DNA, ou quantificar no Nanodrop;
12. Congelar normalmente;

Obs.: Vortexear e centrifugar por 30 segundos toda vez que descongelar o DNA.

APÊNDICE E: Protocolo de sequenciamento

Precipitação das reações em placas de sequenciamento:

1. Preparo: se possível, juntar 2 placas para precipitar (melhor balanceamento da centrífuga);
2. Reservar a centrífuga e ligar para estabilizar temperatura a 4°C;
3. Preparar camadas de papel-toalha para descarte do sobrenadante;
4. Manter placas sempre ao abrigo da luz;
5. Se bem seladas e protegidas da luz, placas precipitadas podem ser mantidas a -20°C por 30 dias.

Etapa precipitação da reação de sequenciamento (etanol/isopropanol):

1. Centrifugar: 600 RPM X 1 min (spin) - placa fechada com borrachinha de vedação ou fita;
2. Adicionar: 30 µL de Isopropanol 75%, recolocar borracha;
3. Ressuspender as amostras: movimentos circulares rápidos sobre bancada;
4. Incubar a placa (4°C): 15 min (ao abrigo da luz);
5. Centrifugar (4°C): 4.000 RPM por 45 min;
6. Descartar o sobrenadante vertendo a placa na pia;
7. Centrifugar (4°C): placa aberta e invertida sobre papel-toalha 600 RPM por 1min (spin);
8. Adicionar: 50 µL de Etanol 75%, recolocar borrachinha (não ressuspender);
9. Centrifugar (4°C): 4.000 RPM por 15 min;
10. Descartar o sobrenadante vertendo a placa na pia;
11. Centrifugar (4°C): placa aberta e invertida sobre papel-toalha 600 RPM por 1 min (spin);
12. Termociclador (para secagem): placa aberta, 60°C X 10 min (ao abrigo da luz).