

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Evolução dos fenótipos pigmentação e estrutura do pelo em roedores:
uma abordagem dos genes *Mc1r* e *Edar***

GISLENE LOPES GONÇALVES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre

SETEMBRO DE 2011

INSTITUIÇÃO EXECUTORA

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Genética - Laboratório de Citogenética e Evolução

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

- Harvard University
Organismic and Evolutionary Department - Hoekstra Lab.
Museum of Comparative Zoology
- Smithsonian Institution
National Museum of Natural History
- University of California-Berkeley
Museum of Vertebrate Zoology

FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Bolsa de doutorado (36 meses)– Processo nº: 141604/2007-7; Bolsa de doutorado sanduíche (12 meses)– Processo nº: 200167/2009-0
- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UFRGS
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul–FAPERGS
- American Society of Mammalogists
- Museum of Comparative Zoology

AGRADECIMENTOS

Um estudo desenvolvido ao longo de quatro anos envolve a contribuição, colaboração e suporte de diversas pessoas e instituições. Agradeço ao Prof. Thales R. O. Freitas (UFRGS) pela orientação e confiança ao longo de 10 anos de trabalho. Também, a supervisão e suporte da Prof. Hopi E. Hoekstra (Harvard University) durante o doutorado-sanduíche, colaboração ao Capítulo 3 e sugestão do Capítulo 5, e contribuições relevantes às questões adaptativas da tese.

Diversos pesquisadores (muitos deles colaboradores) contribuíram com sugestões, leitura crítica e/ou materiais, aos quais sou muito grata; Gilson R. P. Moreira (UFRGS), Karen L. Haag (UFRGS), Nelson J. R. Fagundes (UFRGS), Eduardo Eizirik (PUCRS), Vanessa R. Paixão-Cortes (UFRGS), Matias S. Mora (Universidad Nacional de Mar del Plata), Enrique P. Lessa (Universidad de La Republica), Patrícia Mirol (Universidad de Buenos Aires), Vera S. Domingues (Harvard University), Eileen A. Lacey (University of California-Berkeley), Gabriela P. Fernandez (Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires) e Yuri L. R. Leite (UFES).

Colegas sempre contribuem muito, seja com o diálogo que permite a reorganização de ideias a partir de outro ponto de vista, seja com o compartilhamento da rotina (pouco) comum na pesquisa. Agradeço em especial a Camila S. Castilho, Carla M. Lopes, Tatiane C. Trigo, Paula R. Roratto, Fabiano A. Fernandes e Diego Hepp, do Laboratório de Citogenética e Evolução da UFRGS. Particularmente a Carla e a Paula pela coleta e armazenamento de tecidos para análise de expressão gênica no dorso, flanco e ventre do fenótipo melânico (*C. torquatus*) e escuro (*C. minutus*), e taxidermização das peles no formato “tapete”.

Colegas do *Hoekstra Lab.* (Harvard University), Emily Kay, Catherine Linnen, Jesse Weber, Lynne Mullen, Evan Kingsley, Emily Jacobs-Palmer, Marie Manceau, Hillery Metz, Heidi Fischer e Brant Peterson, auxiliaram no desenvolvimento de experimentos e em sugestões de análise. Sou grata, em particular, a Catherine Linnen e Vera Domingues pela oportunidade de colaborar com projetos em andamento naquele grupo, e dessa maneira observar e aprender a forma de fazer pesquisa nos Estados Unidos.

Agradeço imensamente a assistente de curadoria Judy Chupasko, pela oportunidade de trabalhar na coleção de mamíferos do *Museum of Comparative Zoology*. Em especial, pela experiência em coleções científicas, e convivência, extensiva aos demais profissionais do museu: Mark Omura, Alison Pirie e Adam J. Baldinger.

Diversos curadores gentilmente permitiram o acesso e cederam materiais de coleções para empréstimo que foram fundamentais para este estudo: Chris Conroy e Eileen Lacey (*Museum of Vertebrate Zoology*), Bruce Patterson (*Field Museum*), Kris Helgen (*Smithsonian Institution, National Museum of Natural History*) e Damián Romero (*Museo Municipal de Ciencias Naturales "Lorenzo Scaglia"*).

Agradeço também à *American Society of Mammalogists* e *Society for the Study of Evolution* pelos auxílios financeiros (*Grant-in-Aid* e *International Travel Grant*, respectivamente) concedidos em 2011, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelas bolsas (doutorado e doutorado-sanduíche) concedidas ao longo de 48 meses.

Por fim, serei eternamente grata pelo suporte e carinho da minha família, em especial ao Gilson pelo companheirismo, incentivo e extrema dedicação; fundamental para a consolidação deste trabalho.

Sumário

RESUMO/ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Evolução: genética e morfologia.....	1
O sistema de pigmentação em mamíferos	2
O gene receptor da Melanocortina (<i>Mc1r</i>).....	5
Genética adaptativa da pigmentação.....	13
Convergência evolutiva: pigmentação como modelo	18
Desenvolvimento do pelo e o gene receptor da Ectodisplasina (<i>Edar</i>).....	28
Variação na estrutura do pelo: roedores como estudos de caso.....	31
Escopo deste estudo	33
Referências Bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 2. STRIKING COAT COLOUR VARIATION IN TUCO-TUCOS (RODENTIA: CTENOMYIDAE): A ROLE FOR THE MELANOCORTIN-1 RECEPTOR?	58
Abstract.....	59
Introduction.....	60
Material and methods	62
Results	67
Discussion	71
Acknowledgments.....	77
References	78
CAPÍTULO 3. PATTERNS AND RATES OF EVOLUTION IN THE PIGMENTATION GENE <i>MC1R</i> IN MAMMALS: DO RODENTS HAVE INCREASED ACCELERATION? 96	
Abstract.....	97
Background.....	99
Results	101
Discussion	105
Conclusion	113
Material and Methods	114

Authors' contributions	119
Acknowledgments	119
References	119
CAPÍTULO 4. VARIAÇÃO ADAPTATIVA NA COLORAÇÃO DA PELAGEM ENTRE ESPÉCIES DE <i>CTENOMYS</i>.....	146
Resumo.....	147
Introdução	149
Material e Métodos.....	151
Resultados	155
Discussão.....	159
Agradecimentos	165
Referências Bibliográficas.....	166
CAPÍTULO 5. EVOLUÇÃO DO PELO TIPO ESPINHO EM ROEDORES: UMA ANÁLISE MOLECULAR E MORFOLÓGICA....	187
Introdução	188
Material e métodos.....	191
Resultados	196
Discussão.....	199
Agradecimentos	203
Referências.....	204
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO GERAL.....	214
Referências Bibliográficas.....	220
APÊNDICE	222

RESUMO

A variação morfológica está presente, em alguma maneira, em populações naturais de todos os organismos, sendo particularmente evidenciada na coloração da pelagem e a estrutura de pelos modificados em mamíferos, os quais apresentam grande diversidade e convergências entre as linhagens correspondentes. Neste estudo, é investigado o papel dos genes candidatos *Mc1r* e *Edar* na determinação dos fenótipos coloração da pelagem e estrutura espinhenta do pelo, respectivamente, tendo como hipótese o envolvimento de variações estruturais e/ou regulatórias na geração da diversidade morfológica observada. O estudo com o gene *Mc1r* incluiu a caracterização de variantes genéticas em fenótipos claro, escuro e melânico de espécies de roedores subterrâneos da família Ctenomyidae (tuco-tucos). Também, foram analisados os níveis de expressão do *Mc1r* nestes mesmos fenótipos em diferentes regiões corporais: dorso, flanco e ventre. Observou-se uma alta variabilidade nas seqüências do *Mc1r* em ctenomídeos, porém, nenhuma mudança foi associada a um determinado fenótipo, indicando que alterações na estrutura da proteína não estão envolvidas na determinação da coloração da pelagem neste grupo. Também não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão do *Mc1r* em diferentes fenótipos. Mas, entre as regiões corporais foram evidenciadas diferenças significativas em indivíduos claros e escuros, exceto na forma melânica.

Foram investigados padrões e taxas evolutivas do *Mc1r* ao longo de diferentes grupos de mamíferos, incluindo seqüências representativas de diversos táxons dentro de nove ordens, em particular roedores. A suposta aceleração nas taxas de substituição na

linhagem de roedores foi testada utilizando dados do *Mc1r*. Ainda, o grau de conservação da proteína ao longo dos 15 domínios, e pressões de seleção sobre este gene, foi analisado. Verificou-se um padrão de aceleração linhagem-específico nos mamíferos, sendo que os roedores não apresentaram aceleração conspícua quando comparados a múltiplos grupos. Os resultados indicaram que o *Mc1r* possui evolução rápida, onde as taxas de substituição não-sinônimas obtidas foram semelhantes aquelas reportadas para genes do sistema imune. Ainda, verificou-se um padrão de relaxamento funcional na maior parte da proteína, sendo que quatro sítios demonstraram estar sob seleção positiva.

Investigou-se a similaridade de colorações da pelagem e substrato, bem como características do habitat em dois pares de espécies de tuco-tucos com fenótipos convergentes claros (*C. australis*-*C. flamarioni*) e escuros (*Ctenomys talarum*-*C. minutus*), que ocorrem em simpatria no ambiente costeiro. Especificamente, foram caracterizadas variações nas regiões do dorso, flanco e ventre quanto ao padrão de distribuição e densidade de eumelanina e feumelanina depositadas no pelo, assim como a coloração do substrato e a cobertura vegetal entre os quatro habitats. Os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os fenótipos claro e escuro. Foram observados mecanismos similares na geração dos fenótipos, como o aumento proporcional no comprimento da banda terminal do dorso nas espécies claras, e redução nos fenótipos escuros. Também, verificou-se diferentes densidade da coloração do pelo, pelagem e substrato entre os fenótipos. Observou-se uma forte associação entre a coloração do substrato e da pelagem entre as quatro espécies analisadas para o dorso, flanco e ventre e diferenças entre os habitats em relação à cobertura vegetal. Juntos estes resultados evidenciaram mecanismos convergentes evolutivamente independentes nas quatro espécies para a

geração de fenótipos crípticos ao substrato, e a potencial ação da seleção atuando neste sistema.

Por fim, através de uma abordagem ampla utilizando as principais famílias que possuem táxons representativos do fenótipo espinhento, foram caracterizadas sequências do éxon 11 do gene *Edar* e a correspondente associação com aspectos ultraestruturais dos pelos-guarda ou espinhos, de forma a investigar o envolvimento dos padrões morfológicos obtidos com a presença/ausência do alelo 1540C no *Edar* e/ou de outras mutações. Quatro mudanças de aminoácidos foram identificadas em quatro famílias, sendo todas exclusivas em táxons com fenótipo espinhento, sugerindo um potencial envolvimento do *Edar*. Entretanto, nem todas as espécies espinhentas apresentaram mudanças de aminoácido. A análise morfométrica demonstrou que as variações existentes nos pelos-guarda e espinhos, entre e dentro das linhagens de roedores estudadas, são complexas. Assim, similarmente as mudanças encontradas no gene *Mc1r* neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação causal direta entre o *Edar* e determinadas variáveis morfológicas. Os efeitos destes genes não são completamente descartados, entretanto, são necessários ensaios funcionais que demonstrem a relação das mudanças de aminoácido observadas nas alterações da atividade dos receptores.

ABSTRACT

Morphological variation is present, in some way, in natural populations of all organisms, and is particularly evident in mammals, which has showed a high diversity on pelage coloration and hair structures among lineages. In this study, I investigated the role of the candidate genes *Mc1r* and *Edar* underlying morphological variation, such as on pigmentation and shape of modified guard-hairs (spines), respectively. Particularly, I characterized molecular variants of *Mc1r* for pale, brown and melanic phenotypes in the subterranean rodent lineage Ctenomyidae (tuco-tucos). Also, levels of *Mc1r* expression were analysed in those phenotypes for different body regions: dorsal, flank and ventral, as these regions had shown a gradient from dark to light coloration. High variability was observed in *Mc1r* sequences. However, changes could not be associated with any given phenotype in a causative way, indicating that variation in corresponding protein structure does not seem to be involved in determining coat color in tuco-tucos. Also, significant differences in levels of expression were not observed among phenotypes; however, distinct body regions showed significant differences across pale and brown specimens, except in the melanic form.

I also investigated the rate and patterns of *Mc1r* evolution across nine mammal orders, including sequences from different lineages within each order, particularly rodents. The expected acceleration in the rate of substitution for the rodent lineage reported in previous studies (based on other nuclear genes) was tested using *Mc1r* data. Additionally, the conservative degree throughout protein domains, as well as selective

pressures on such gene was analyzed. I observed a pattern of lineage-specific acceleration in mammals. Rodents did not show a conspicuous pattern of acceleration when compared to multiple groups, particularly when compared to several lineages within each of these groups. However, the results indicated that *Mc1r* is a fast evolved gene, as rates of non-synonymous substitution observed were similar to those reported for genes from the immune system. Also, a pattern of functional relaxation was evident for most of the protein domains, and four sites were under positive selection.

Additionally, I investigated the similarity of pelage and substrate coloration, and habitat characteristics in two pair of tuco-tuco species with convergent light (*C. australis-C. flamarioni*) and dark (*C. talarum-C. minutus*) phenotypes that occur in sympatry in coastal environments. Specifically, I characterized variation patterns of distribution and density of eumelanin and pheomelanin deposited in individual hairs in dorsal, flank and ventral regions, as well as background characteristics (color of substrate and plant coverage). The results showed significant differences between light and dark phenotypes. Interestingly, similar mechanisms were observed to reach these phenotypes by a proportional increase in the length of the terminal and subterminal hair bands to generate light pelage and reduction, to produce dark ones.

Also, different densities in hair and pelage, as well as substrate coloration between phenotypes were described. Not surprisingly, a strong association between substrate and pelage coloration among species was found, for either dorsal, flank or ventral comparisons. In addition, differences in vegetation coverage were observed across habitat, where a pattern of lesser coverage was evident in habitat of dunes, and greater in sandy fields. Together these results show similar independent mechanisms that generate

similar phenotypes in the species surveyed. The criptic pattern evident in tuco-tucos clearly demonstrates the putative role of natural selection in shaping those forms.

Finally, I investigated mutations in a highly pleiotropic gene and its association with morphological traits in hairs. Specifically, I worked with the *Edar* gene and its potential role in converting morphological guard hair features into spines and aristiformes hairs in different families of wild rodents. A broad scale approach in term of taxonomy, including major families with representative taxa of such phenotype was surveyed (Cricetidae, Echimyidae, Erethizontidae, Heteromyidae, Hystricidae and Muridae). A different pattern of spine/aristiform hairs was observed for each family, and two convergent traits were also identified, demonstrating a complex morphological evolution of modified guard-hairs. Four families (Cricetidae, Muridae, Echimyidae and Erethizontidae) showed unique amino acid changes in the corresponding taxa with spiny phenotype. Although some spiny taxa did not show amino acid changes, a role for *Edar* in shaping some morphological traits in guard-hairs was not completely ruled out. Nevertheless, similar to *Mc1r*, functional assays are needed to test differences in the receptors' activity for the amino acid replacements observed in these genes.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- 1-1.** Polimorfismos no gene *Mc1r* e a correspondente associação com a pigmentação da pele, escamas, penas e pêlos.....8
- 1-2.** Exemplos de polimorfismos em outros genes conspicuamente associados à coloração da pelagem em mamíferos.....12

Capítulo 2

- 2-1.** List of *Ctenomys* used in this study.....86
- 2-2.** Variable sites (n = 66) in *Mc1r* nucleotide and amino acid sequences from 21 species of tuco-tucos. Columns in grey represent 5' and 3'UTR regions.....87
- 2-3.** Estimated parameters of diverse codon substitution models of *Mc1r* in ctenomyid and other rodent families; ω , dN/dS ratio; p, proportion of codons in each ω class; M0-M3: χ^2 df = 4; M1a-M2a: χ^2 df = 2; M7-M8: χ^2 df = 2.....88
- 2-4.** Likelihood ratio test between models of codon substitution without selection (M0, M1, M7) and with selection or relaxation of functional constrains (M3, M2 and M8) for each of the 15 domains of the *Mc1r* protein in 30 rodent species. Asterisks indicate level of significance, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$; M0 vs M3: χ^2 df = 4; M1a vs. M2a: χ^2 df = 2; M7 vs. M8: χ^2 df = 2.....89

Capítulo 3

- 3-1.** Amino acid variability in the different domains of the *Mc1r* protein. ED: extracellular domain, ID: intracellular domain, TM: transmembrane domains. Groups used for distance comparison are mammals (M) vs. birds, reptiles and fishes..... 139
- 3-2.** Nucleotide composition (based only on GC content) of *Mc1r* sequences in mammals, birds, reptiles and fishes.....140

3-3. Log likelihood values and parameters estimates under models of variable ω ratios (dN/dS) among sites for entire <i>Mc1r</i> protein and separated domains; p: proportion of codons in each ω class.....	141
3-4. Branch-site clade model C values of ω (dN/dS ratio) estimated for three site classes.....	142
S3-1. Log likelihood values (LnL) estimates for each model comparison in different domains of the <i>Mc1r</i>	143
S3-2. Species used in this study with Genbank accession numbers for <i>Mc1r</i> sequences.....	144

Capítulo 4

4-1. Espécimes de <i>Ctenomys</i> utilizados neste estudo.....	176
4-2. Análise de variância entre espécies para diferentes parâmetros analisados.....	177
4-3. Estimativas de média \pm erro padrão da coloração do substrato e cobertura vegetal nos habitats das quatro espécies de <i>Ctenomys</i> amostradas neste estudo. O tamanho amostral é indicado entre parênteses.....	178

Capítulo 5

5-1. Amostras de roedores utilizadas para análise de pelos neste estudo.....	207
5-2. Lista de primers desenhados para amplificação do domínio da morte do gene <i>Edar</i>	208

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- 1-1.** Representação esquemática dos melanócitos, melanosomos e a base genética da alternância na produção de pigmento em mamíferos. A. corte transversal da pele representando o folículo piloso; B. melanócito; C. membrana celular e melanosomos. Modificado de Bradley & Mundy (2008).....3
- 1-2.** Representação dos tipos de pelo que geram a variação no padrão de coloração geral em mamíferos. Modificado de Hoekstra (2006).....4
- 1-3.** Árvore filogenética bayesiana representando as relações evolutivas e datas de divergência dos principais grupos e linhagens de *Ctenomys*. As barras representam intervalo de 95% de probabilidade posterior sobre as estimativas de tempo de divergência. Os números indicam milhões de anos. Táxons e grupos marcados em verde representam aqueles incluídos neste estudo. Modificado de Parada et al. (2011).....27
- 1-4.** Rota de ativação do gene *Eda* em mamíferos, evidenciando o receptor *Edar* e o domínio da morte. Modificado de Pantalacci et al. (2008).....29
- 1-5.** Similaridade de fenótipos para estrutura da pelagem em roedores. A, camundongo normal (*wild type*) e transgênico mutante (*Edar^{Tg951}*) representando os efeitos do aumento na sinalização do gene *Edar* na alteração da morfologia do pêlo, obtida de Mou et al. (2008); B, roedor silvestre *Acomys spinosissimus*.....30
- 1-6.** Relações filogenéticas entre os gêneros representativos das seis famílias de roedores utilizadas neste estudo, utilizando *Cuniculus* (Lagomorpha) como grupo externo. O cladograma foi reconstruído através do método bayesiano, com base em 865pb do gene *Citocromo-b*. As famílias estão identificadas sobre os ramos. Táxons em negrito representam fenótipos espinhentos.....32

Capítulo 2

- 2-1.** Convergent pelage coloration and local habitat of ctenomyids. 1 (*C. flamarioni*) and 2 (*C. australis*) are light forms; A and B represent Atlantic coastal dunes habitat; 3 (*C.*

<i>porteousi</i>) and 4 (<i>C. minutus</i>) are dark phenotypes; C and D represent Pampa grasslands habitat.....	90
2-2. Two-dimensional structure of the deduced <i>Ctenomys</i> Mc1r protein sequence. The 20 amino acid changes observed are represented by colors and site position. Domains: EL, extracellular regions; TM, transmembrane domains; IL, intracellular loops.....	91
2-3. Maximum likelihood tree constructed for 21 species of <i>Ctenomys</i> based on 1250bp of <i>Mc1r</i> using the HKY+G substitution model. Numbers above branches represent bootstrap support. Asterisks indicate values below 50%. Major phylogenetic groups recovered (Mendocinus, Bolivien-matogrossense, Torquatus) are consistent with Parada <i>et al.</i> (2011).....	92
2-4. Evolution of the <i>Mc1r</i> gene in 21 ctenomyid species. Amino acid substitutions were mapped on a phylogenetic tree constructed with the maximum likelihood method from cytochrome <i>b</i> gene data. Colors refer to the confidence index of each replacement. Representative coat colors for each species are depicted above taxa.....	93
2-5. <i>Mc1r</i> expression in three classes of phenotypes in <i>Ctenomys</i> : light (<i>C. australis/C. flamarioni</i>), dark (<i>C. minutus/C. torquatus</i>) and melanic (<i>C. torquatus</i>). Relative expression of <i>Mc1r</i> transcripts in dorsal, flank and ventral skin was measured by quantitative qPCR and standardized with β -actin. Distinct non-capital letters above bars indicate statistical significance among species, within a given body region.....	94
2-6. Analysis of the Naive Empirical Bayes (NEB) posterior probability under the model M3, from each codon of <i>Mc1r</i> in ctenomyids and other rodent families.....	95

Capítulo 3

3-1. The Mc1r protein structure and alignment across species. A, amino acid sequence in 20 mammal species, representative of all 9 orders surveyed and 6 vertebrates (see material and methods for details). Dots indicate identity to top sequence. The beginning position of each of the 15 Mc1r domains is indicated above the sequences: extracellular (ED) are coloured in green, transmembrane (TM) in red, and intracellular (ID) in blue. Domain boundaries are based on Robbins <i>et al.</i> (1993). Arrows indicates positively selected sites based on Bayesian probabilities. Amino acid residues completely conserved across the surveyed species are shaded. B, Bi-dimensional protein depiction, highlighting positions of the domains coloured as green, red and blue in the alignment data set.....	132
--	-----

- 3-2.** Graph showing estimated number of nonsynonymous substitutions rate for each *Mc1r* domain, at varying crescent levels of phylogenetic depth among mammalian groups. Substitutions and standard errors were estimated as the mean of pairwise nucleotide sequence comparisons in rodents (Rod) and primates (Pri) vs. lagomorphs (Lag), ferungulates (Fer), proboscids (Pro) and didelphimorphs + monotremes (Did-Mon). Primates were fixed as a control in relation to rodents, in order to evaluate the existence of acceleration in substitution rate in mouse lineage. Asterisks indicate significant difference between rodents and primates.....134
- 3-3.** Graph showing estimated number of nonsynonymous substitutions rate for each *Mc1r* domain, within rodent lineage. Substitutions and standard errors were estimated as the mean of pairwise nucleotide sequence comparisons in the three major lineages of this group: Mouse-related clade, Ctenohystrica and Squirrel related clade. Letters above bars indicate statistical significance among comparisons.....135
- 3-4.** Phylogenetic tree of 44 rodent *Mc1r* nucleotide sequences, generated using all codon positions (data set of 945 base pairs), and rooted using a rabbit (*Lepus capensis*) as outgroup. The topology and branch lengths were estimated using a ML approach, with T93 model of nucleotide evolution. Major phylogenetic groups proposed by Bangla-Kafi et al. (2009) are described on the right side of the tree. Ctenohystrica, in particular *C. leucodon*, showed an increased acceleration in substitution rate.....136
- 3-5.** Phylogenetic tree of 20 mammalian *Mc1r* nucleotide sequences, generated using all codon positions (data set of 945 base pairs), and rooted using a chicken as outgroup. The topology and branch lengths were estimated using a ML approach, with GTR + G model of nucleotide evolution. Different orders are indicated in the right side of the tree. Acceleration in the rodent lineage is evidenced by longer branch lengths in such clade.....137
- 3-6.** Posterior probabilities that each site is from the 11 sites classes (here grouped in only three classes, defined as 1: $\omega = 0.001-0.012$; 2: $\omega = 0.17-0.41$; 3, $\omega = 1$) under the M8 (selection) model, calculated using the Bayes empirical Bayes (BEB) procedure from each codon of *Mc1r* in mammals.....138

Capítulo 4

- 4-1.** Representação esquemática da convergência evolutiva em espécies de *Ctenomys* utilizadas neste estudo. A) coloração da pelagem e tipo de habitat; 1, *C. flamarioni* e 5, *C. australis* indicam formas claras; 2 e 6 representam habitat de dunas litorâneas; 3, *C. porteوسي* e 7, *C. minutus* indicam fenótipos escuros; 4 e 8 representam habitat

- de campos arenosos. B) Relações evolutivas entre espécies de ctenomídeos, ressaltando a distancia genética dos táxons analisados (em negrito) e a coloração (marrom = fenótipo escuro; amarelo = fenótipo claro). A árvore foi reconstruída utilizando o método de máxima verossimilhança com dados de sequencias parciais (670 pb) do gene citocromo b obtidas do Genbank.....179
- 4-2.** Representação esquemática da coloração da pelagem, e do substrato, nas quatro espécies de *Ctenomys* analisadas neste estudo, indicando a distribuição geográfica dos táxons.....180
- 4-3.** Representação das regiões analisadas em *Ctenomys* (dorso, flanco e ventre) em fotografia original usada para avaliar a coloração pelo método de densitometria, evidenciando o cartão de cores Munsell (X-Rite).....181
- 4-4.** Representação esquemática dos pelos do dorso, flanco e ventre de *Ctenomys*; A) *C. talarum*; B) *C. minutus*; C) *C. australis*; D) *C. flamarioni*.....182
- 4-5.** Representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada no comprimento da banda terminal (A), subterminal (B) e total (C) do pelo, nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo). O desenho esquemático no lado direito dos gráficos indica a região mensurada no pelo.....183
- 4-6.** Representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada no comprimento proporcional das bandas terminal (A) e subterminal (B) nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo).....184
- 4-7.** Representação por *Box-plots* da variabilidade na densidade do pelo para as bandas terminal (A) e subterminal (B), e para pelagem (C) nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo).....185
- 4-8.** Associação da coloração do substrato com a pelagem nas quatro espécies de *Ctenomys* analisadas: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*, FLA, *C.*

flamarioni. As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo). A) representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada na cor do substrato (*box* preenchidos) e da pelagem dorsal (*box* não-preenchidos), evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de uma dada região corporal analisada. B) regressão linear da coloração do substrato pela cor da pelagem. Os círculos representam as espécies *C. talarum* e *C. flamarioni*, e os triângulos *C. minutus* e *C. australis*.....186

Capítulo 5

- 5-1.** Representação esquemática de um espinho de *Atherurus macrourus*, em vista dorsal (A) e em secção transversal (B), com os principais componentes estruturais e respectivas medidas efetuadas. **a** = comprimento; **b** = profundidade do sulco; **c** = espessura; **d** = largura. Seta indica o sentido dorso-ventral.....209
- 5-2.** Alinhamento dos 244 sítios do éxon 11 do gene *Edar* nas espécies de roedores estudadas. As colunas sombreadas indicam mudanças que resultam em diferentes aminoácidos.....210
- 5-3.** Árvore filogenética bayesiana das 11 espécies (compreendendo seis famílias; identificadas sobre os ramos) dos roedores amostrados, reconstruída com base em sequências parciais do gene *Citocromo b*. As quatro substituições de aminoácidos estão mapeadas na filogenia, sendo representadas pelos quadrados marrons, como mudanças únicas em táxons com fenótipo espinhento.....211
- 5-4.** Micrografias de secções transversais dos pelos guardas (A, C, D) e espinhos dorsais estudados (B, D, F-K), em microscopia eletrônica de varredura. A, *Dipodomys panamintinus*; B, *Heteromys desmarestianus* (Heteromyidae); C, *Lophuromys aquilus*; D, *Acomys spinosissimus* (Muridae); E, *Peromyscus maniculatus*; *Neacomys spinosus* (Cricetidae); F, *Proechimys brevicauda*; G, *Proechimys semispinosus* (Echimyidae); H, *Atherurus macrourus* (Hystricidae); I, *Coendou spinosus*; J, *Erethizon dorsatum* (Erethizontidae). Barras = 10, 100, 20, 100, 5, 100, 100, 200, 200, 200 e 500µm, respectivamente.....212
- 5-5.** Variações morfométricas (média + erro padrão) nos pelos dentre os roedores estudados. Barras cinzas vazias e sólidas, respectivamente, são intercaladas consecutivamente para as espécies não-espinhentas (pelos - guarda) e espinhentas (espinhos) em Heteromyiidae, Muridae e Cricetidae. Em relação aos ratos espinhentos verdadeiros (Echimyidae) e ouriços (Hystricidae e Erethizontidae), são representados por barras verdes sólidas.....213

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Evolução: genética e morfologia

A variação morfológica está presente, em alguma forma, em populações naturais de todos os organismos (Lowe et al. 2006). A compreensão da origem e manutenção da desta diversidade é uma das grandes questões evolutivas, envolvendo conhecimentos das áreas de genética, desenvolvimento e biologia evolutiva, sob um contexto ecológico (Hoekstra 2006). Em geral, duas abordagens paralelas são utilizadas para investigar mudanças evolutivas: uma em nível fenotípico, a outra, genotípico (Lewontin 1974). A genética de populações tem como foco mudanças nas frequências alélicas e genotípicas ao longo do tempo e do espaço, enquanto a biologia do organismo aborda os traços que diferem indivíduos em ambientes naturais. A conexão genótipo-fenótipo, isto é, a identificação de mudanças moleculares associadas à adaptação fenotípica (e os mecanismos de desenvolvimento pelo qual os traços são codificados), é fundamental para compreender os processos responsáveis pela geração da diversidade genética e de organismos (e.g. Carroll et al. 2001; Brakefield et al. 2003).

A pigmentação é um sistema promissor para investigar as relações entre genótipo e fenótipo (Hoekstra 2006). Mutações na coloração da pelagem em camundongos são utilizadas como modelo para estudos sobre a ação gênica em diversos processos biológicos

(Silvers 1979), proporcionando uma riqueza de informações sobre genes envolvidos na pigmentação e as correspondentes interações de desenvolvimento. Similarmente, o aumento recente no conhecimento sobre genes envolvidos no desenvolvimento, tal como o receptor-A da ectodisplasina, responsável por estruturas como anexos epidérmicos, permite inferir sobre a contribuição de mudanças evolutivas em genes com efeitos pleiotrópicos sob a diversificação de fenótipos.

O sistema de pigmentação em mamíferos

A ampla variação natural em coloração em mamíferos é consequência, principalmente, da regulação e distribuição de dois tipos de pigmentos produzidos pelos melanócitos: eumelanina (pigmento preto/marrom) e feumelanina (pigmento amarelo/vermelho). Embora os processos celulares e moleculares que governam o padrão de pigmentação sejam pouco compreendidos, as bases genéticas e fisiológicas da síntese e deposição de pigmentos são amplamente estudadas neste grupo (Jackson 1994; Jackson et al. 1994). Diversos genes estão envolvidos na coordenação da mudança do tipo de pigmento entre a síntese de eumelanina e feumelanina nos melanócitos (Barsh 1996). Esta alternância é controlada, principalmente, pela interação de dois genes: o receptor da melanocortina (*melanocortin-1 receptor; Mc1r*), o qual possui sete domínios transmembrana expresso nos melanócitos, e a proteína sinalizadora agouti (*Agouti*), cujo produto é secretado próximo as células das papilas dérmicas, atuando na inibição da sinalização do Mc1r (Jackson 1994) (Fig.1-1). Na ausência da proteína Agouti, níveis basais de atividade do Mc1r mantém os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC) suficientemente altos para ativar a rota bioquímica da síntese de eumelanina. Entretanto, na presença da proteína Agouti a atividade do Mc1r é

inibida, os níveis de AMPc são reduzidos, e os melanócitos param de produzir eumelanina e começam a produzir feumelanina (Robbins et al. 1993; Jackson 1994; Barsh 1996). Assim, a interação dessas duas proteínas possui papel fundamental na determinação do tipo de pigmento depositado ao longo do pêlo.

Entretanto, sabe-se que outros genes também alteram a densidade e distribuição de melanossomos (grânulos de pigmento) presente nos melanócitos. Por exemplo, a tirosinase é uma enzima limitadora da melanogênese. Mais de 100 alelos já foram caracterizados, desde nulos (completa ausência de pigmentação; albinismo), até aqueles com função reduzida que limitam a produção de melanina (Beermann et al. 2004). Outros genes, como a proteína relacionada à tirosinase (*Tyrp1*) e a tautomerase dopacroma (*Dct* ou *Tyrp2*) regulam a rota de eumelanina. A proteína gamaglutamil codificadora da transpeptidase (*Ggt*) afeta a produção de feumelanina, bem como o *Slc7a11* (Chintala et al. 2005).

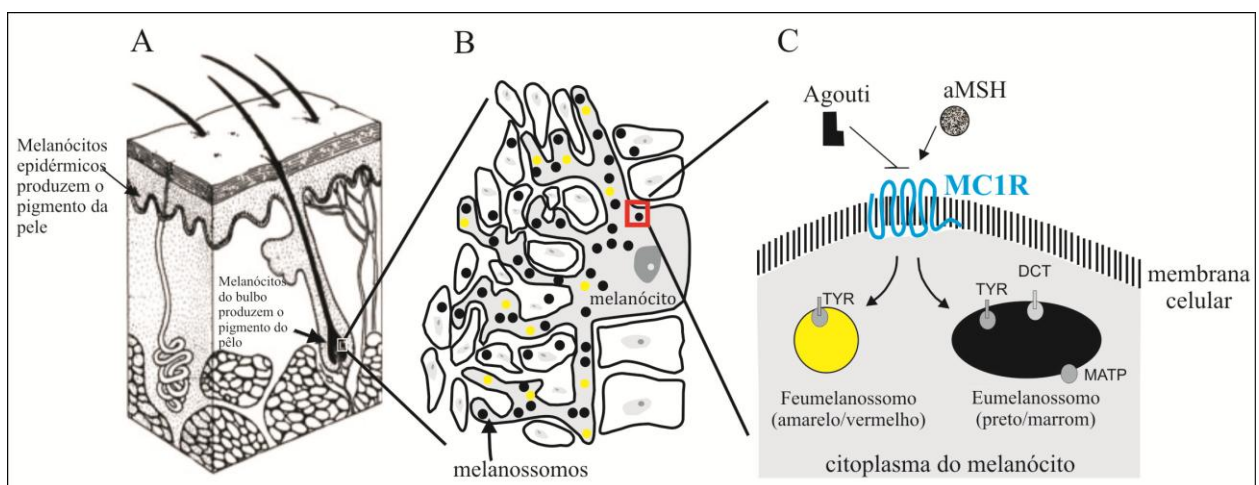


Figura 1-1. Representação esquemática dos melanócitos, melanossomos e a base genética da alternância na produção de pigmento em mamíferos. A. corte longitudinal representando o folículo piloso; B. melanócito; C. membrana celular e melanossomos. Modificado de Bradley & Mundy (2008).

Além disso, outros genes, como *Rab27a*, *Myo5a* e *Mplh* são modelos bem estudados que coordenam o transporte e distribuição de melanossomos nos melanócitos (Nascimento et al. 2003). Mutações nestes genes interrompem a organização melanossômica e podem “diluir” a coloração geral de um indivíduo (Hoekstra 2006). Diversas mudanças moleculares e de desenvolvimento podem afetar o tipo, densidade e distribuição de melanina depositada individualmente em um pelo, e resultar na variação da coloração geral da pelagem (Fig.1-2). Uma análise minuciosa do tipo de pigmento e padrão do pelo permite inferir sobre possíveis genes responsáveis pela coloração.

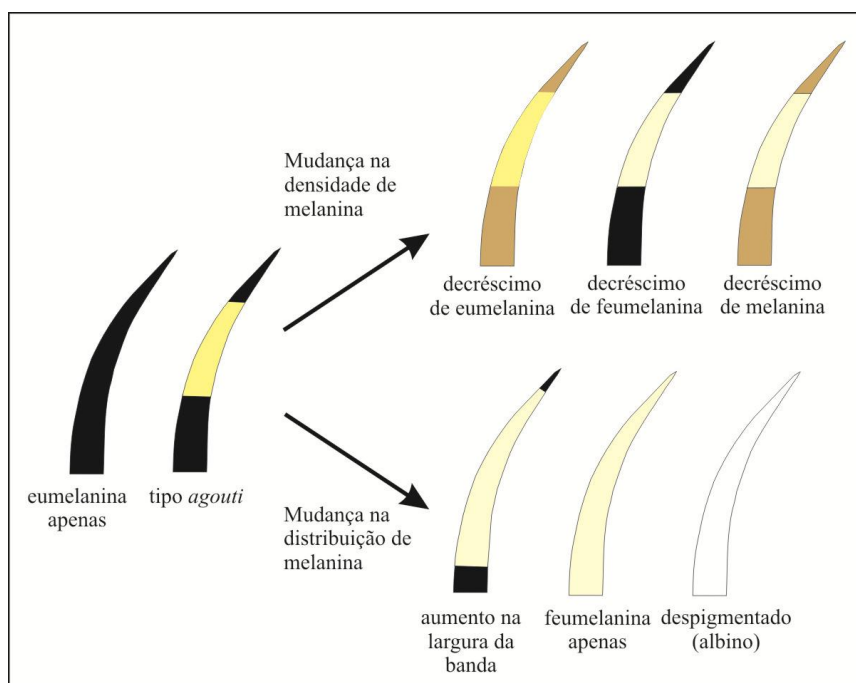


Figura 1-2. Representação dos tipos de pelo que geram a variação no padrão de coloração geral em mamíferos. Modificado de Hoekstra (2006).

O gene receptor da Melanocortina (*Mc1r*)

Mais de 100 genes envolvidos na coloração da pelagem já foram identificados em camundongos de laboratório (Searle 1968; Silvers 1979; Jackson 1994), e aproximadamente 90 estão por ser caracterizados (Hofreiter & Schöneberg 2010). Em especial o gene *Mc1r* tem recebido maior atenção devido à identificação de variantes associadas à pigmentação em diversas espécies animais (Hoekstra 2006).

A estrutura de apenas um éxon codificante com aproximadamente um kilobase (Kb) facilita a obtenção de sequências completas a partir de DNA genômico, permitindo a investigação em diversas espécies silvestres. Além disso, a função protéica bem conhecida, bem como o efeito pleiotrópico reduzido tem feito deste gene o principal candidato em estudos de associação genótipo-fenótipo.

Em roedores, o *Mc1r* corresponde ao locus *extension* de coloração de pelagem, associado ao melanismo dominante e o amarelo recessivo (Barsh 1996; Jackson 1994; Robbins et al. 1993; Silvers 1979). Determinadas mutações neste gene têm sido associadas à variação na pigmentação em diferentes táxons de vertebrados (Tab.1-1). Os polimorfismos vinculados às alterações fenotípicas em determinadas espécies incluem tanto mutações de ganho-de-função, associadas ao melanismo dominante, como perda-de-função, relacionadas à coloração clara recessiva. Embora a validação funcional das mutações de *Mc1r* seja rara, diversos estudos demonstram que mutações em sítios homólogos são estatisticamente associadas a diferenças na coloração em táxons distintos. Por exemplo, cambacica (*Coereba*

flaveola) (Theron et al. 2001), codorna (*Coturnix japonica*) (Nadeau et al. 2006), galinha (*Gallus gallus*) (Ling et al. 2003) e camundongo (*Mus musculus*) (Robbins et al. 1993) compartilham a mesma substituição não-sinônima Glu⁹²Lys, que potencialmente leva a ativação constitutiva do *Mc1r*, e por consequência, ao fenótipo melânico. Ainda, a mutação Asp¹¹⁹Asn é associada ao melanismo na ave papa-moscas-monarca (*Monarcha castaneiventris*) (Uy et al. 2009), porco doméstico (*Sus scrofa*) (Kijas et al. 1998) e diversas raças de ovelhas (*Ovis* sp.) (Vage et al. 1999). Similarmente, ambas as formas melânicas da ave mandrião-parasítico (*Stercorarius parasiticus*) (Mundy et al. 2004) e do roedor *pocket mice* (*Chaetodipus intermedius*) (Nachman et al. 2003) possuem a mutação Arg²³³His. Por fim, a mesma deleção (*Mc1r*- Δ 24) na região codificante do gene em jaguarundi (*Puma yaguarondi*) (Eizirik et al. 2003), associada ao ganho-de-função, isto é, ativação constitutiva do *Mc1r*, também foi verificada em formas melânicas de mico-leão-dourado (*Leontopithecus chrysomelas*) (Mundy & Kelly 2003) e esquilo (*Sciurus carolinensis*) (McRobie et al. 2009). Tais estudos demonstram que o mesmo gene pode ser responsável por fenótipos convergentes, destacando que o *Mc1r* é um potencial modelo para a compreensão da convergência genética em nível de mecanismo.

No entanto, existem diversos exemplos onde não foi possível estabelecer o papel do *Mc1r* na variação da coloração da pelagem. Por exemplo, em determinadas populações do roedor *pocket mice* (Hoekstra & Nachman 2003), e *pocket gopher* (*Thomomys bottae*) (Wlasiuk et al. 2007), diversas espécies de mustelídeos (Hosoda et al. 2007) e primatas (Mundy & Kelly 2003), ovelha *Ovis dalli* (Loehr et al. 2008), ave uirapuru-de-chapéu-azul (*Lepidothrix coronata*) (Cheviron et al. 2006) e rã comum (*Rana temporaria*) (Herczeg et al. 2010).

Em particular, foram identificadas mutações em sítios funcionais importantes do *Mc1r* em espécies de primatas, entretanto os efeitos fenotípicos não estavam presentes. Por exemplo, diferentes espécies de bugio (*Alouatta* spp.) apresentam sequências distintas de *Mc1r*, porém, os padrões de mudanças de aminoácidos não são associados à pigmentação correspondente (Mundy & Kelly 2003). Ainda, espécies de lêmures com fenótipos preto-e-branco (*Varecia variegata*) e avermelhado (*Varecia rubra*) possuem a mesma mutação Glu94Lys que causa a ativação constitutiva e coloração escura em outras espécies, embora *V. rubra* possua pêlos predominantemente feumelânicos. Nestes casos em particular, é necessário também o conhecimento a cerca dos efeitos funcionais destas mutações, pois mesmo mudanças sutis na estrutura do gene podem influenciar a coloração, especialmente levando em consideração a possibilidade de interações epistáticas com outros loci, como por exemplo, *Agouti* (Mundy & Kelly 2003).

Tabela 1-1. Polimorfismos no gene *Mc1r* e a correspondente associação com a pigmentação da pele, escamas, penas e pelos.

Mutação	Espécie	Classe	Fenótipo	Referência
Arg ¹⁶⁴ Cys	<i>Astyanax mexicanus</i>	Actinopterygii	Pele escura	Gross et al. 2009
MC1R-Δ2 – deleção 2 bp	<i>Astyanax mexicanus</i>	Actinopterygii	Pele escura	Gross et al. 2009
Val⁸⁵Met	<i>Anser caerulescens</i>	Aves	Plumagem escura	Mundy et al. 2004
3' não-codificante 960	<i>Coereba flaveola</i>	Aves	Plumagem escura	Theron et al. 2001
*Glu⁹²Lys	<i>Coereba flaveola</i>	Aves	Plumagem escura	Theron et al. 2001
*Glu⁹²Lys	<i>Coturnix japonico</i>	Aves	Plumagem escura	Nadeau et al. 2006
*Glu⁹²Lys	<i>Gallus gallus</i>	Aves	Plumagem escura	Takeuchi et al. 1996; Ling et al. 2003
Ala ¹⁶ Thr	<i>Malurus leucopterus</i>	Aves	Plumagem escura	Doucet et al. 2004
Ile ³⁸ Asp	<i>Malurus leucopterus</i>	Aves	Plumagem escura	Doucet et al. 2004
Val ¹¹¹ Ile	<i>Malurus leucopterus</i>	Aves	Plumagem escura	Doucet et al. 2004
Glu ¹⁵⁷ Arg	<i>Malurus leucopterus</i>	Aves	Plumagem escura	Doucet et al. 2004
Val¹⁶⁶Ile	<i>Malurus leucopterus</i>	Aves	Plumagem escura	Doucet et al. 2004
Asp¹¹⁹Asn	<i>Monarcha astaneiventris</i>	Aves	Plumagem escura	Uy et al. 2009
Phe ²⁵⁶ del	<i>Numida meleagris</i>	Aves	Plumagem escura	Vidal et al. 2010
Arg ²³⁰ His	<i>Stercorarius parasiticus</i>	Aves	Plumagem escura	Mundy et al. 2004
Val⁸⁵Met	<i>Sula sula</i>	Aves	Plumagem escura	Baião et al. 2007
His ²⁰⁷ Arg	<i>Sula sula</i>	Aves	Plumagem escura	Baião et al. 2007
Gly ⁵ Cys	<i>Alopex lagopus</i>	Mammalia	Pelagem escura	Våge et al. 2005
Phe ²⁸⁰ Cys	<i>Alopex lagopus</i>	Mammalia	Pelagem escura	Våge et al. 2005
*Leu⁹⁹Pro	<i>Bos taurus</i>	Mammalia	Pelagem escura	Klungland et al. 1995
Arg ³⁰⁶ ter	<i>Canis lupus familiaris</i>	Mammalia	Pelagem avermelhada	Everts et al. 2000
Met ²⁶⁴ Val	<i>Canis lupus familiaris</i>	Mammalia	“Máscara” escura	Schmutz et al. 2003
Arg ¹⁰⁹ Trp ^{LD}	<i>Chaetodipus intermedius</i>	Mammalia	Pelagem escura	Nachman et al. 2003, Hoekstra & Nachman 2003
Arg ¹⁶⁰ Trp ^{LD}	<i>Chaetodipus intermedius</i>	Mammalia	Pelagem escura	Nachman et al. 2003, Hoekstra & Nachman 2003
Arg ¹⁸ Cys ^{LD}	<i>Chaetodipus intermedius</i>	Mammalia	Pelagem escura	Nachman et al. 2003, Hoekstra & Nachman 2003

Continuação

Mutação	Espécie	Classe	Fenótipo	Referência
Gln ²³³ His ^{LD}	<i>Chaetodipus intermedius</i>	Mammalia	Pelagem escura	Nachman et al. 2003, Hoekstra & Nachman 2003
Ser ⁸³ Phe	<i>Equus caballus</i>	Mammalia	Pelagem castanha	Rieder et al. 2001
MC1R-Δ24 – deleção 24pb	<i>Herpailurus yaguarondi</i>	Mammalia	Pelagem escura	Eizirik et al. 2003
Arg ³⁰⁷ Gly	<i>Homo neanderthalensis</i>	Mammalia	Pele ruiva?	Laluenza-Fox et al. 2007
MC1R-Δ24 – deleção 24pb	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mammalia	Pelagem escura	Mundy e Kelly 2003
Arg ⁶⁷ Cys	<i>Mammuthus primigenius</i>	Mammalia	Pelagem escura?	Römpler et al. 2006
Asp ¹¹⁹ Asn ^{LD}	<i>Ovis aries</i>	Mammalia	Pelagem escura	Våge et al. 1999
Met ⁷³ Lys ^{LD}	<i>Ovis aries</i>	Mammalia	Pelagem escura	Våge et al. 1999
MC1R-Δ15 – deleção 15pb	<i>Panthera onca</i>	Mammalia	Pelagem escura	Eizirik et al. 2003
Arg ⁶⁵ Cys	<i>Peromyscus polionotus</i>	Mammalia	Pelagem clara	Hoekstra et al. 2006
Asp¹²¹Asn^{LD}	<i>Sus scrofa</i>	Mammalia	Pelagem escura	Kijas et al. 1998
*Leu⁹⁹Pro^{LD}	<i>Sus scrofa</i>	Mammalia	Pelagem escura	Kijas et al. 1998
MC1R-Δ24 – deleção 24pb	<i>Sciurus carolinensis</i>	Mammalia	Pelagem escura	McRobie et al. 2009
Tyr ²⁹⁸ Cys	<i>Ursus americanus</i>	Mammalia	Pelagem clara	Ritland et al. 2001
Cys ¹²⁵ Arg	<i>Vulpes vulpes</i>	Mammalia	Pelagem escura	Våge et al. 1997
Thr ¹⁷⁰ Ile	<i>Aspidoscelis inornata</i>	Reptilia	Escamas claras	Rosenblum et al. 2004, 2010
Val¹⁶⁸Ile	<i>Holbrookia maculata</i>	Reptilia	Escamas claras	Rosenblum et al. 2004, 2010
His ²⁰⁸ Tyr	<i>Sceloporus underlatus</i>	Reptilia	Escamas claras	Rosenblum et al. 2004, 2010

*Mutações também encontradas no camundongo de laboratório; ^{LD} indica mutações ligadas; mutações em negrito indicam mutações homólogas encontradas em diferentes espécies; espécies em negrito indicam estudos onde mais de uma mutação foi associada com a coloração e o desequilíbrio de ligação não foi avaliado.

Embora inicialmente tenha sido caracterizado como altamente conservado (e.g. Klungland et al. 1999; Vage et al. 1999), o aumento em número de seqüências disponíveis para alinhamento em diferentes espécies, publicadas nos últimos 10 anos, indica que o *Mc1r* possui considerável variabilidade, tanto interespecífica (e.g. Ayoub et al. 2009; Eizirik et al. 2003; Hosoda et al. 2005; Hull et al. 2010; Mundy & Kelly 2003; Roseblum et al. 2004, 2010), quanto intraespecífica (e.g. Hoekstra et al. 2006; Kingsley et al. 2009; Manceau et al. 2010; Nachman et al. 2003; Steiner et al. 2007, 2009), em particular em populações humanas (e.g. Gerstenblith et al. 2007; Harding et al. 2000; Makova & Norton 2005; Rana et al. 1999; Savage et al. 2008). Estudos de variabilidade do *Mc1r* em humanos indicam que a alta diversidade em populações não-Africanas provavelmente é derivada do relaxamento das restrições seletivas nestas regiões geográficas (Harding et al. 2000; Rees et al. 2000) e/ou seleção diversificadora (Rana et al. 1999; Sturm et al. 2001; Sturm 2009).

Mudanças funcionais na região codificante do *Mc1r* representam uma significativa exceção dentro do consenso crescente de que a maior parte das alterações na morfologia é governada por substituições em regiões regulatórias (Hoekstra 2006). Todas as mudanças conhecidas neste gene, tanto de aminoácidos como pequenas deleções, muitas delas adaptativas, ocorrem na região codificante (Mundy & Kelly 2003; Hoekstra 2006). Entretanto, é possível que a regulação da transcrição do *Mc1r* também possa afetar o fenótipo pigmentação (Moro et al. 1999; Makova et al. 2001; Smith et al. 2001; Eizirik 2003).

Uma análise comparativa da variação de seqüências do *Mc1r* entre espécies com diferentes níveis de divergência permite inferir sobre padrões de restrições funcionais que atuam na proteína, auxiliando na interpretação das variantes observadas em táxons específicos. No entanto, poucos estudos têm focado na utilização de diferentes espécies (e.g. Cadena et al. 2011; Eizirik et al. 2003; Hosoda et al. 2005; Mundy & Kelly 2003; Mundy 2005; Pointer & Mundy 2008; Rosemlum et al. 2010), sendo que alguns recentes são específicos de abordagens filogenéticas e filogeográficas (e.g. Ayoub et al. 2009; Hull et al. 2010; Rato et al. 2010; Drovetski et al. 2009), e populacionais (e.g. Haas et al. 2008).

Além do *Mc1r*, uma lista crescente de genes de pigmentação identificados em modelos de laboratório são potencialmente responsáveis pela convergência de fenótipos de coloração em mamíferos (Hoekstra 2006; Hofreiter & Schöneberg 2010; Hubbard et al. 2010) (Tab.1-2). Em particular o gene *Agouti*, antagonista a ativação do *Mc1r*, e o *Tyrp1*, também foram amplamente investigados em mamíferos. Estudos realizados em *Mus* demonstraram que o *Agouti* está envolvido tanto no padrão como no tipo de pigmento gerado, através da produção de duas isoformas de transcrição: a primeira, expressa no ventre é associada a diferenças na pigmentação dorso-ventral (Bultman et al. 1994; Manceau et al. 2011; Vrieling et al. 1994); a segunda, é expressa em pulsos durante o crescimento do pêlo, sendo responsável pelo padrão *Agouti* de bandeamento do pelo (Vrieling et al. 1994).

Tabela 1-2. Exemplos de polimorfismos em outros genes conspicuamente associados à coloração da pelagem em mamíferos.

Gene	Mutação	Espécie	Fenótipo	Referência
<i>ASIP</i>	Arg ⁹⁶ Cys	<i>Canis lupus familiares</i>	Pelagem escura	Kerns et al. 2004
	ASIP-Δ11 – exon 2	<i>Equus caballus</i>	Pelagem escura	Ludwig et al. 2009
	ASIP-Δ2 – exon 2	<i>Felis catus</i>	Pelagem escura	Eizirik et al. 2003
	Mutação não codificadora desconhecida	<i>Ovis aries</i>	Pelagem escura	Norris & Whan 2008
	Deleção – exon 2	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Pelagem escura	Kingsley et al. 2009
	Códon de parada prematuro –exon 4	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Pelagem escura	Kingsley et al. 2009
	Mudanças cis-regulatória	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Pelagem clara	Linnen et al. 2009
	Deleção Ser - exon 2	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Pelagem clara	Linnen et al. 2009
	ASIP-Δ19 – exon 2	<i>Rattus</i>	Pelagem escura	Kuramoto et al. 2001
	ASIP-Δ166 – exon 2	<i>Vulpes vulpes</i>	Pelagem escura	Vage et al. 1997
<i>K</i> locus	CBD103 ^{ΔG23} (deleção 1pb)	<i>Canis latrans</i>	Pelagem escura	Anderson et al. 2009
	CBD103 ^{ΔG23} (deleção 1pb)	<i>Canis lupus</i>	Pelagem escura	Anderson et al. 2009
<i>TYRP1</i>	His ⁴³ Tyr	<i>Bos taurus</i>	Pelagem clara	Berryere et al. 2003
	Cys ⁴¹ Ser	<i>Canis lupus familiares</i>	Pelagem clara	Schmutz et al. 2002
	Ala3Gly	<i>Felis catus</i>	Pelagem clara	Schmidt-Küntzel et al. 2005
	Cys ²⁹⁰ Phe	<i>Ovis aries</i>	Pelagem clara	Gratten et al. 2007

Genética adaptativa da pigmentação

Diversos animais, em especial mamíferos, exibem grande variação de padrões e tipos de coloração tanto inter- quanto intraespecífica, que podem ser quantificados (Endler 1990), e potencialmente são afetados pela seleção natural (Caro 2005). Em particular, forças seletivas como comportamento críptico, aposematismo, termorregulação e sinalização sexual direcionam a variação tanto em termos da pigmentação como no padrão de coloração (Cott 1940). As variações naturais na cor da pelagem também permitem inferir sobre adaptação local e processos de divergência e especiação mediados por fatores ecológicos (Hoekstra 2006).

Diversos estudos com diferentes táxons associaram a variação na coloração com heterogeneidades ambientais. Aqui serão destacados dois exemplos clássicos e um recente. O primeiro refere-se ao polimorfismo na coloração da concha do molusco terrestre *Cepaea nemoralis* (Sheppard 1951). Esta espécie possui marcada variação na pigmentação (amarelo, rosa ou marrom) e padrão de bandeamento (até cinco bandas horizontais). *Cepaea nemoralis* habita áreas naturalmente florestadas e campos. Populações da Inglaterra foram intensamente estudadas, em particular entre 1950 e 1980, de forma a compreender como esta variabilidade era mantida. *Cepaea nemoralis* apresenta padrões conspícuos de adaptação local; caramujos amarelos com cinco bandas são mais prevalentes em habitats de campo, enquanto os escuros e sem bandas são mais frequentes em florestas. A consistência deste padrão ao longo de centenas de colônias na Inglaterra, bem como em outras populações europeias, indicou que a seleção natural deveria estar atuando sobre este processo (Cain & Sheppard 1954). Inicialmente, sugeriu-

se que diferentes morfologias da concha proporcionariam camuflagem críptica sob habitats distintos (Sheppard 1951; Cain & Sheppard 1954). Assim, a pressão seletiva imposta pelos predadores seria visual; porém, uma vez que o predador não ocorre ao longo de toda distribuição de *C. nemoralis*, outros fatores deveriam estar envolvidos (Jones et al. 1977; Clarke et al. 1978; Cain 1983; Cook 1998). Estudos posteriores sugeriram que a seleção climática imposta por diferentes habitats contribuía para os padrões de adaptação local uma vez que diferenças morfológicas da concha possuem propriedades térmicas distintas (Lamotte 1959; Jones et al. 1977; Cain 1983; Cameron 1992). Quando dados regionais de frequência foram comparados em escala ampla de variação climática observou-se forte associação de conchas amarelas com climas mais quentes (Jones et al. 1977). Entretanto, este padrão não foi absoluto; mesmo quando um morfotipo em particular era mais prevalente em uma colônia, outros tipos também persistiam, embora em menor frequência. Atualmente, diversos autores concordam que não existe uma única causa evolutiva para as formas e diferentes frequências observadas nas populações de *C. nemoralis* (Cameron 1992; Cook 1998; Ozgo 2005). Este exemplo ilustra a complexa inter-relação entre mecanismos e processos envolvidos na geração de adaptações locais.

O outro caso clássico é o estudo de Kettlewell (1955, 1956), sobre o melanismo industrial na mariposa de Manchester (*Biston betularia*). Até 1848, o conhecimento sobre a coloração destas mariposas envolvia apenas registros de espécimes brancos, ou de fundo branco mesclado com preto, caracterizado como a forma *típica*. No entanto, em 1848, foi observada a ocorrência de um tipo escuro, ou melânico, intitulada forma *carbonaria* (Edleston 1864). Já em 1895, 98% das mariposas eram da forma melânica.

Sugeriu-se que o rápido aumento da forma *carbonaria* era decorrente da revolução industrial, em que o entorno de muitas áreas urbanas na Inglaterra foi influenciado por dois poluentes: dióxido de enxofre, o qual eliminaria os líquens que crescem principalmente no tronco das árvores, e a fuligem no ar, que escureceria a superfície onde é depositada (Tutt 1896). Especificamente, foi proposto que, com a mudança da superfície dos troncos, a mariposa melânica tornava-se mais camuflada do que a forma clara, e assim era menos predada. Kettlewell (1955, 1956) testou esta hipótese conduzindo uma série de experimentos sobre predação através da técnica de captura-liberação-recaptura em dois tipos de ambientes: uma floresta altamente poluída (no município de Birmingham), onde líquens não sobreviviam nos troncos, e outra natural (no município de Dorset), com ampla diversidade de líquens. Em termos simplificados o experimento foi montado da seguinte forma: Kettlewell liberou mariposas da forma *típica* e *carbonaria* em troncos no início da manhã, e retornou ao final do dia para verificar quantas estavam presentes no local onde foram liberadas. Como estas mariposas em geral não voam durante o dia, o desaparecimento de indivíduos seria interpretado como resultado direto da predação. Uma proporção significativamente maior da forma *carbonaria* (62.57%) foi recapturada em comparação a forma *típica* (45.79%) no experimento realizado em Birmingham (Kettlewell 1955). Inversamente, quando efetuado em Dorset a taxa de recaptura foi de 12.5% na forma *típica* e 6.3% em *carbonaria* (Kettlewell 1956). Tais resultados levaram a sugerir de que a forma *carbonaria* possui vantagem seletiva sobre a *típica* em um ambiente alterado, e o inverso em relação a um ambiente natural.

Entretanto, embora este seja reconhecido como um exemplo clássico de mudança evolutiva contemporânea em populações naturais, os mecanismos genéticos responsáveis

pelo melanismo permaneciam desconhecidos até recentemente. Assim, um estudo utilizando abordagem de genes candidatos envolvidos na melanização em insetos (e.g. *aaNAT*, *DOPA-decarboxylase*, *ebony*, *tan*, *tyrosine hydroxylase*, *yellow* e *yellow2*) demonstrou não haver influência de mudanças estruturais ou elementos cis-regulatórios sobre a coloração em *B. betularia* (van't Hof & Saccheri 2010). No entanto, muito recentemente, van't Hof et al. (2011) mapearam em *carbonaria* uma região ortóloga de 200Kb ao segmento do cromossomo 17 no bicho-da-seda (*Bombyx mori*), demonstrando que um grupo de sequências únicas em uma dada região foram identificadas na variante *carbonaria*, com fortes indícios de seleção recente. A região verificada coincide com *loci* determinantes do padrão da asa em outros sistemas de lepidópteros (e.g. gênero *Heliconius*), sugerindo a existência de reguladores basais do padrão de coloração em tal região (van'tHof et al. 2011). Estes resultados indicam uma potencial mutação de origem única e recente a ser investigada, e evidencia o quão complexos são os mecanismos responsáveis pelo melanismo em *B. betularia*, a semelhança daqueles com o caramujo *C. nemoralis*.

Uma vez que a base genética do melanismo industrial ainda não tenha sido claramente estabelecida, a relação genótipo-fenótipo não pode ser vinculada neste caso. Entretanto, alguns poucos exemplos fazem tal conexão, sendo que a maior parte deles envolve características sob forte seleção causada pela influencia humana: resistência à pesticida em ratos e insetos (Daborn et al. 2002), resistência aos antibióticos em bactérias (Walsh 2000) e tolerância a metais pesados em plantas (MacNair 1987).

No entanto, recentemente, Nachman et al. (2003) propuseram um exemplo de seleção darwiniana através da conexão genótipo-fenótipo para uma característica

adaptativa em populações naturais de roedores, na qual a seleção não é influenciada por fatores humanos. Este estudo envolve o roedor *rock pocket mice* (*Chaetodipus intermedius*), que possui variação na coloração da pelagem dorsal associada ao substrato rochoso onde ocorre, no deserto do Arizona, Estados Unidos. A correlação mais marcante foi estabelecida com o substrato onde rochas claras mesclam-se aos derrames de lava vulcânica escura (Benson 1933). A similaridade da coloração dorsal destes roedores com o substrato é adaptativa, proporcionando ao animal proteção críptica contra predadores (Sumner 1934; Dice 1947). Nachman et al. (2003) investigaram as bases genéticas moleculares do melanismo em populações de *C. intermedius* em dois derrames de lava e solos claros isolados entre os Estados do Arizona e Novo México. Em um estudo complementar, Hoekstra & Nachman (2003) analisaram mais duas populações melânicas, através da abordagem do gene candidato *Mc1r*. Dentre estas, encontrou-se associação exata entre mutações no *Mc1r* e o fenótipo melânico na localidade do deserto de Pinacate. Foram detectados 24 SNPs na região codificante do *Mc1r* ao longo de todas as populações, gerando nove polimorfismos de aminoácidos. Dentre estes, quatro (Arg-18, Arg-109, Arg-160 e Gln-233) foram encontrados apenas em *Pinacate*. As variantes investigadas foram presença/ausência. Assim, dentre os 17 roedores melânicos amostrados, 11 foram homocigotos para todas as mudanças de aminoácidos, e seis heterocigotos. Tal padrão é consistente com a herdabilidade dominante de alelos melânicos do *Mc1r* identificados em outras espécies (e.g. porcos domésticos, Kijas et al. 1998). Assim, este estudo demonstra a evolução contemporânea, com um claro agente de seleção estabelecido, e natural.

Convergência evolutiva: pigmentação como modelo

A convergência – evolução repetida de fenótipos semelhantes em dois ou mais táxons, com a mesma função ecológica – é uma das grandes questões evolutivas. Por um lado, a convergência fenotípica entre populações e espécies expostas a pressões ambientais semelhantes sugere que tais características evoluíram por seleção natural (Harvey & Pagel 1991). Por outro lado, a convergência em nível genético, isto é, os mesmos genes e/ou mutações responsáveis por fenótipos semelhantes, indica que determinadas restrições genéticas limitam a variação disponível na qual a seleção natural pode atuar, influenciando o curso da mudança evolutiva (Wake 1991; Gould 2002). Portanto, a evolução convergente proporciona inferências sobre os prováveis mecanismos responsáveis pela geração de diversidade, bem como a extensão da repetibilidade e previsibilidade do processo evolutivo (Gould 2002; Morris 2003). Análises filogenéticas moleculares em diversas espécies demonstram que a seleção natural resulta múltiplas vezes na evolução de fenótipos convergentes tanto dentro (e.g. Brower 1994; Wang & Shaffer 2008) como entre espécies (e.g. Losos et al. 1998; Blackledge & Gillespie 2004). No entanto, o recente aumento na capacidade de identificação de genes responsáveis por características adaptativas em populações naturais (Ellegren & Sheldon 2008; Mackay et al. 2009; Slate et al. 2009; Stinchcombe & Hoekstra 2008) contribui significativamente para a inferência dos prováveis mecanismos de convergência (Hoekstra & Coyne 2007; Stern & Orgogozo 2009; Gompel & Prud'homme 2009). Segundo Arendt & Reznick (2008), existem diversos exemplos em que os mesmos genes são responsáveis pela adaptação em táxons distantes e,

contrariamente, casos em que diferentes genes produzem fenótipos similares em espécies proximamente relacionadas. Assim, a distância evolutiva não necessariamente prevê os mecanismos genéticos subjacentes às adaptações convergentes (Arendt & Reznick 2008). Por essa razão, os termos *convergência* e *evolução paralela* são considerados aqui como sinônimos. Entretanto, uma vez que poucos estudos caracterizaram com precisão as mudanças responsáveis pela variação fenotípica adaptativa, não se sabe o quão freqüente a convergência genética, isto é, o mesmo gene, é reproduzido em nível mutacional e funcional.

A pigmentação é um dos caracteres morfológicos mais bem estudados em populações naturais em termos de amplitude taxonômica, mecanismo genético e de desenvolvimento, e função ecológica (Hoekstra 2006; Hubbard et al. 2010; Protas & Patel 2008). Tal riqueza de conhecimento permitiu a investigação da convergência na coloração em vários níveis de organização biológica, desde o fenótipo até o mecanismo mutacional. Estudos recentes sobre pigmentação em populações naturais demonstram que fenótipos convergentes podem ocorrer em diferentes táxons através de diversos mecanismos, como: (i) diferentes genes, (ii) mesmo gene e mesmas mutações, (iii) mesmo gene, porém mutações distintas e funcionalmente diferentes, e (iv) mesmo gene e mutações diferentes, mas funcionalmente equivalentes (Losos 2011).

Genes diferentes geram fenótipos similares

Existem diversos estudos demonstrando que mutações em diferentes genes podem resultar em efeitos fenotípicos semelhantes. Um exemplo é o roedor *oldfield mice* (*Peromyscus polionotus*) que vem sendo amplamente estudado pelo grupo da

pesquisadora Hopi E. Hoekstra (Harvard University). Tal espécie possui coloração dorsal da pelagem similar ao substrato local. Vignieri et al. (2010) mensuraram as taxas de predação, onde foram observadas diferenças significativas entre ataques a indivíduos com fenótipos conspícuos. *Peromyscus polionotus* habita áreas de vegetação tipicamente densa (conhecido como “*oldfields*”) e solos escuros no sudeste dos Estados Unidos, onde possuem coloração castanho escuro no dorso e, cinza, no ventre. No entanto, indivíduos que colonizaram dunas costeiras do Golfo do México e da costa do Atlântico na Flórida possuem pigmentação mais clara (Mullen & Hoekstra 2008). Os espécimes que ocorrem em ambientes litorâneos diferem na distribuição, tipo e densidade de pigmento em relação aqueles do continente (Steiner et al. 2007). Embora todos os indivíduos litorâneos sejam mais claros que os do continente, as subespécies da costa do Atlântico são mais semelhantes em termos de padrão de coloração à subespécie do Golfo do que às respectivas subespécies vizinhas (Steiner et al. 2009). No entanto, a reconstrução filogética intraespecífica incluindo subespécies do Golfo e do Atlântico demonstrou que indivíduos litorâneos não são monofiléticos, portanto, rejeitou-se a hipótese de uma única origem de fenótipos claros na costa da Florida (Steiner et al. 2009). Assim, a coloração clara de subespécies do Golfo e do Atlântico provavelmente indica eventos independentes de evolução.

Tal sistema representa uma importante base para investigar os possíveis mecanismos de convergência, i.e. se os mesmos genes foram alvos de múltiplas mudanças adaptativas, ou se modificações em diferentes genes produziram fenótipos semelhantes. Em 2006, o grupo de pesquisa da Dra. Hoekstra iniciou a determinação das bases genéticas na variação da coloração em *Peromyscus* através de cruzamentos entre a

subespécie continental (*P. polionotus subgriseus*) e a do Golfo (*P. p. leucocephalus*). Através da abordagem de *quantitative trait loci* (QTL) foram identificadas três regiões genômicas que explicaram a maior parte da variação na coloração entre as duas subespécies (Steiner et al. 2007). Cada uma das regiões compreendia um gene candidato a pigmentação: *Mc1r* (Hoekstra et al. 2006), *Agouti* (Steiner et al. 2007) e *Corin* (Jacobs-Palmer et al. submetido), que codifica uma protease sérica agindo a montante na cascata de sinalização do *Agouti* (Enshell-Seijffers et al. 2008). Mudanças em nível de expressão de mRNA em ambos os genes *Corin* e *Agouti* foram estatisticamente associados a diferenças de coloração, entretanto mutações causativas não foram identificadas. Embora diferenças significativas na expressão do *Mc1r* não tenham sido detectadas entre indivíduos do litoral e do continente (Steiner et al. 2007), a substituição de um único aminoácido (Arg⁶⁵Cys) foi associada a diferenças de coloração. Ensaio funcionais confirmaram que tal mutação causa diminuição na sinalização do receptor e, por conseguinte, redução na produção de eumelanina (Hoekstra et al. 2006). Esta mutação única explicou aproximadamente 30% da diferença de coloração entre os indivíduos do continente e do litoral em cruzamentos estabelecidos. Quando investigado em populações naturais, constatou-se que a mutação Cys-65 é fixa em indivíduos da costa do Golfo, e ausente nas populações continentais (Hoekstra et al. 2006; Mullen et al. 2009).

Assim, apesar da semelhança no padrão de coloração, os indivíduos do Atlântico não possuem a mutação Cys-65 (Hoekstra et al. 2006), sugerindo que este fenótipo claro possui uma provável base genética diferente. A comparação de seqüências de *Mc1r* entre indivíduos do continente e do Atlântico revelaram quatro novas mutações de aminoácidos, porém, nenhuma se sobrepôs às mutações anteriormente descritas que

afetam a coloração, e não foram correlacionadas com a coloração clara. Além disso, não foram identificadas alterações na função do receptor (Steiner et al. 2009). Dessa forma, embora não seja descartado o envolvimento do *Mc1r* nos fenótipos claros em indivíduos da costa do Atlântico (e.g. através de mudanças regulatórias), os resultados obtidos até o presente sugerem que diferentes genes são responsáveis por fenótipos convergentes de subespécies litorâneas da costa do Atlântico e do Golfo.

Mesmos genes e mesmas mutações geram fenótipos similares

Diferentes trajetórias genéticas podem ser tomadas dentro de uma espécie, entretanto, a mesma mutação pode, muitas vezes, contribuir para a convergência fenotípica entre táxons não relacionados. Diversos exemplos a respeito envolvem o gene *Mc1r*. Römpler et al. (2006) publicaram recentemente a sequência completa da região codificante do *Mc1r* em uma espécie de mamute (*Mammuthus primigenius*). O indivíduo sequenciado apresentou três polimorfismos de aminoácidos, incluindo a mesma mutação (nucleotídeo C→T e aminoácido Arg→Cys) identificada em *P. p. leucocephalus* (Arg⁶⁵Cys). O efeito desta mutação foi verificado funcionalmente utilizando vetores de expressão contendo os dois diferentes alelos de *Mc1r*, onde se demonstrou diferenças na sinalização do receptor, semelhante em magnitude ao observado em subespécies de *Peromyscus* do litoral (Römpler et al. 2006). Tais resultados sugerem que os mamutes pleistocênicos foram polimórficos para a coloração do pelo, entretanto, a relevância ecológica desta variação não é clara.

Mesmo gene, porém mutações distintas geram fenótipos similares

Fenótipos semelhantes também podem ser produzidos por diferentes mutações no mesmo gene, que podem ter tanto o mesmo efeito, como efeitos distintos, e ainda assim produzir fenótipos ecologicamente equivalentes. Em especial dois estudos recentes demonstram como diferentes mutações produzem fenótipos semelhantes em lagartos (Rosenblum et al. 2010) e roedores do gênero *Peromyscus* (Linnean et al. 2009). Especificamente, três espécies de lagartos (*Sceloporus undulatus*, *Aspidoscelis inornata* e *Holbrookia maculata*), que habitam dunas brancas do Estado do Novo México, Estados Unidos, possuem coloração dorsal clara em comparação aos indivíduos do deserto de Chihuahuan, localizado no entorno, em um comportamento tipicamente críptico (Rosenblum 2006). A comparação de sequências do *Mc1r* entre formas claras e escuras em cada espécie indicou mudanças de aminoácido (His²⁰⁸Tyr, Thr¹⁷⁰Ile, Val¹⁶⁸Ile) presente na forma pálida de cada táxon (Rosenblum et al. 2004). Ensaios funcionais demonstraram não haver efeito da mutação Val168Ile ocorrente em *H. maculata*, apesar da associação significativa entre a mutação e a coloração do indivíduo, indicando que a variante clara encontrada nesta espécie possivelmente é causada por mutações em outros genes (Rosenblum et al. 2010). Entretanto, nas outras duas espécies a substituição de aminoácido causou mudanças na atividade do *Mc1r*; em Thr¹⁷⁰Ile houve redução, e em His²⁰⁸Tyr ocorreu comprometimento funcional do receptor (Rosenblum et al. 2010). Este estudo, tal como aquele com *Peromyscus* no litoral da Florida, demonstra que fenótipos similares podem ser produzidos por mutações distintas no mesmo gene, e também, através de diferentes mecanismos funcionais.

Além de mudanças na região codificante, mutações em regiões regulatórias também podem ser responsáveis por fenótipos convergentes. Por exemplo, o roedor *deer mice* (*Peromyscus maniculatus*) que ocorre em dunas continentais no Estado de Nebraska (caracterizadas como *Sand Hills*), Estados Unidos, possui coloração dorsal semelhante ao substrato. A coloração dourada desta espécie é causada principalmente por uma mudança no tipo e distribuição de pigmentos ao longo do pelo (Linnen et al. 2009). Pelos tipicamente *Agouti*, caracterizado por uma banda subterminal de feumelanina, ocorrem nesta espécie, porém, nas populações de Nebraska tal banda é significativamente maior em relação às outras populações da mesma espécie. Através de cruzamentos em laboratório demonstrou-se associação do fenótipo “banda larga” com a variação nucleotídica no gene *Agouti* (Linnen et al. 2009). Além disso, os níveis de mRNA foram mais elevados em *P. maniculatus* que portavam o alelo para banda larga em relação ao tipo selvagem. Tal diferença na expressão foi mantida em indivíduos heterozigotos para banda larga e tipo selvagem, demonstrando que uma mutação cis-regulatória no gene *Agouti*, ou ligada a ele, é causativa do fenótipo claro (Linnen et al. 2009).

Os exemplos anteriormente mencionados foram ressaltados por caracterizar mutações específicas responsáveis por fenótipos semelhantes, e não apenas a determinação dos genes, o que permite testar a convergência em nível mutacional e funcional. Estes estudos expandiram significativamente o conhecimento sobre os mecanismos que geram a variação fenotípica adaptativa, além de fornecer novas perceptivas sobre os motivos de determinados “produtos” evolutivos serem mais comuns (e.g. hotspots mutacionais, dominância, epistasia e pleiotropia).

A convergência evolutiva não é limitada apenas aos níveis de organização biológica que foram discutidos anteriormente. Por exemplo, mutações nucleotídicas diferentes, ou iguais, podem produzir substituições de aminoácidos convergentes. Também, o mesmo gene, ou genes diferentes (porém na mesma via de desenvolvimento) podem ter impactos semelhantes sobre a interação gênica, e conseqüentemente, no fenótipo.

Portanto, os estudos com os roedores *oldfield mice* e *deer mice*, bem como os lagartos, demonstram que a mudança evolutiva não é previsível. Entretanto, sugerem que, embora a evolução possa algumas vezes ser repetitiva, onde os mesmos genes são alvos de mudança adaptativa, as mutações exatas e os correspondentes efeitos na função protéica podem ser diferentes.

***Ctenomys* como modelo de estudo de pigmentação**

Os tuco-tucos (*Ctenomys*) compreendem a família Ctenomyidae, um dos grupos mais diversos de roedores (Reig et al. 1990). Distribui-se ao longo da América do Sul ocupando o nicho subterrâneo, e representa um sistema notável para investigar as bases genéticas de traços ecologicamente importantes, tal como a pigmentação. Os ctenomídeos são caracterizados pela conspícua diversidade ecológica e morfológica (Busch et al. 2000; Lacey et al. 2000; Mora et al. 2003). Habitam áreas extensas, em geral abertas, como campos naturais, pastagens e pradarias pouco florestadas (Lacey et al. 2000), e ocorrem em uma grande variedade de habitats. Por exemplo, estepes de altitude (acima de 4.000 m), dunas da costa Atlântica, planícies, deserto ou semi-desertos, áreas abertas entre florestas subtropicais e estepes da Terra do Fogo (Reig et al. 1990). Além disso, os tuco-

tucos têm uma ampla variação intra e interespecífica da coloração da pelagem, por exemplo: clara, marrom, marrom com manchas brancas, castanho-escuro, cinza e melânica (Langguth & Abella 1970; Freitas & Lessa 1984; Gonçalves & Freitas 2009). Na maior parte dos casos, a coloração geral coincide com o substrato (Langguth & Abella 1970). Além disso, alguns táxons representam claramente exemplos de convergência fenotípica. Por exemplo, as espécies do mesmo grupo filogenético (Mendocinus), porém distantemente relacionadas, *C. australis* e *C. flamarioni* habitam dunas arenosas litorâneas, sendo a primeira na Argentina e a segunda no sul do Brasil (Mora et al. 2006; Fernandez-Stolz et al. 2007), e ambas são caracterizadas por pelagem clara. Além disso, espécies de linhagens filogeneticamente distantes, como *C. talarum* (Grupo Talarum) e *C. minutus* (Grupo Torquatus), que ocupam campos arenosos adjacentes às dunas costeiras, também na Argentina e no Brasil (Freitas 1995; Busch et al. 2000), são comparativamente mais escuros. Estes dois grupos de táxons proximamente e distantemente relacionados representam um potencial evento de repetida adaptação local contra a predação através da coloração críptica. No entanto, se desconhece as bases genéticas de tal convergência, se existente, tanto em nível fenotípico como genotípico; por exemplo, se o padrão da pelagem e de pigmentação do pelo é semelhante, e/ou se mutações no mesmo gene estão envolvidas na determinação deste fenótipo. Assim, este estudo tem como um dos objetivos investigar a evolução do *Mc1r* e o respectivo papel subjacente na variação da coloração da pelagem *Ctenomys*. Para isso, foram utilizadas 21 espécies, compreendendo grande parte dos grupos filogenéticos e linhagens reconhecidas (Parada et al. 2011; Fig. 1-3), e incluindo a maior amplitude de variação fenotípica encontrada neste grupo.

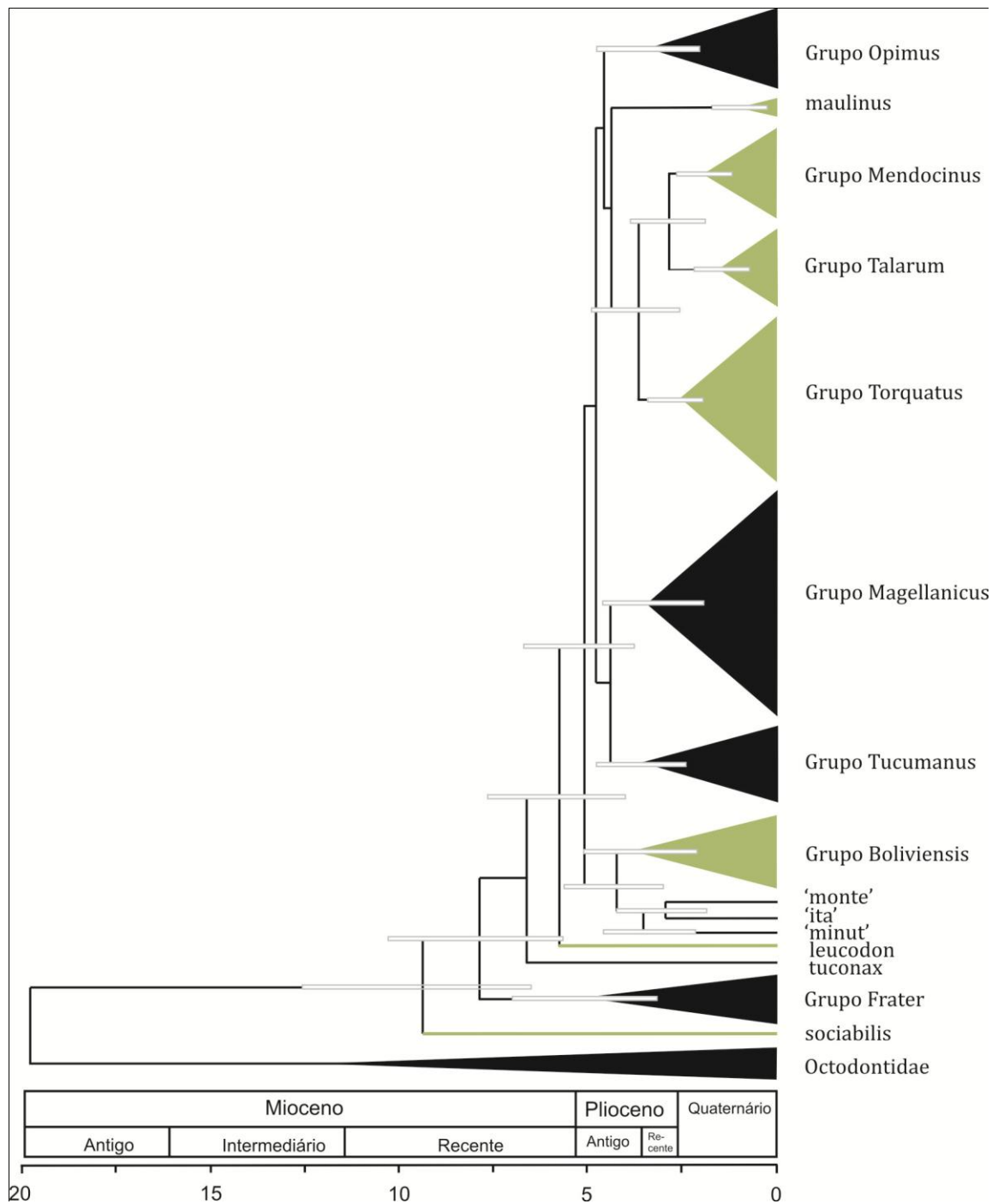


Figura 1-3. Árvore filogenética bayesiana representando as relações evolutivas e datas de divergência dos principais grupos e linhagens de *Ctenomys*. As barras representam intervalo de 95% de probabilidade posterior sobre as estimativas de tempo de divergencia. Os números indicam milhões de anos. Táxons e grupos marcados em verde representam aqueles incluídos neste estudo. Modificado de Parada et al. (2011).

Desenvolvimento do pelo e o gene receptor da Ectodisplasina (*Edar*)

Os pelos são produzidos pelo folículo capilar, os quais são submetidos às fases de crescimento cíclico e regressão em peles adultas (Mou et al. 2008). O ciclo do folículo capilar recapitula os eventos que ocorrem durante a morfogênese folicular embrionária (Alonso & Fuchs 2006; Muller-Rover et al. 2001). O folículo capilar inicia o desenvolvimento em condensações de células locais, as quais são formadas na superfície embrionária ectodérmica (Millar 2005; Schmidt-Ullrich & Paus 2005). Determinadas deficiências na regulação desses sinais indutivos causam displasia ectodérmica hipohidrótica, caracterizada pela ausência de folículos capilares e estruturas relacionadas, como glândulas sudoríparas e dentes. A identificação de genes responsáveis pela respectiva síndrome indica uma nova rota de sinalização para o desenvolvimento do folículo capilar (Botchkarev & Fessing 2005).

O gene receptor da ectodisplasina-A (*ectodysplasin-A receptor; Edar*), equivalente ao locus *Downless* em camundongos, codifica uma proteína transmembrana que regula a rota de desenvolvimento de estruturas ectodérmicas, cujos domínios são homólogos aos da família de receptores do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor; TNF*) (Headon & Overbeek 1999; Mikkola & Thesleff 2003) (Fig.1-4). Tais receptores sinalizam predominantemente através do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e fatores de transcrição (Mikkola & Thesleff 2003). Neste processo de sinalização, o *Edar* é recrutado pelo *Eda* (Ectodisplasina-A), causando o recrutamento do *EdarDD* (*EDAR death domain*) associado ao *Edar* e, por fim, a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. As mutações que inibem a ação desta rota metabólica impedem a formação do folículo capilar em

camundongos e humanos (Botchkarev & Fessing 2005; Courtois & Smahi 2006), demonstrando o completo envolvimento deste gene na formação e estrutura de anexos epidérmicos. Recentemente, identificou-se um SNP (*single nucleotide polymorphism*) não sinônimo no gene *Edar* (1540C). Esta mudança causa a substituição Val³⁷⁰Ala, sob forte seleção positiva em populações humanas do leste Asiático (Carlson et al. 2005; Myles et al. 2008; Sabeti et al. 2007; Tang et al. 2007; Voight et al. 2006; Williamson et al. 2005). Fujimoto et al. (2008a, b) demonstraram existir uma associação entre a espessura do cabelo em populações humanas asiáticas e o alelo 1540C.

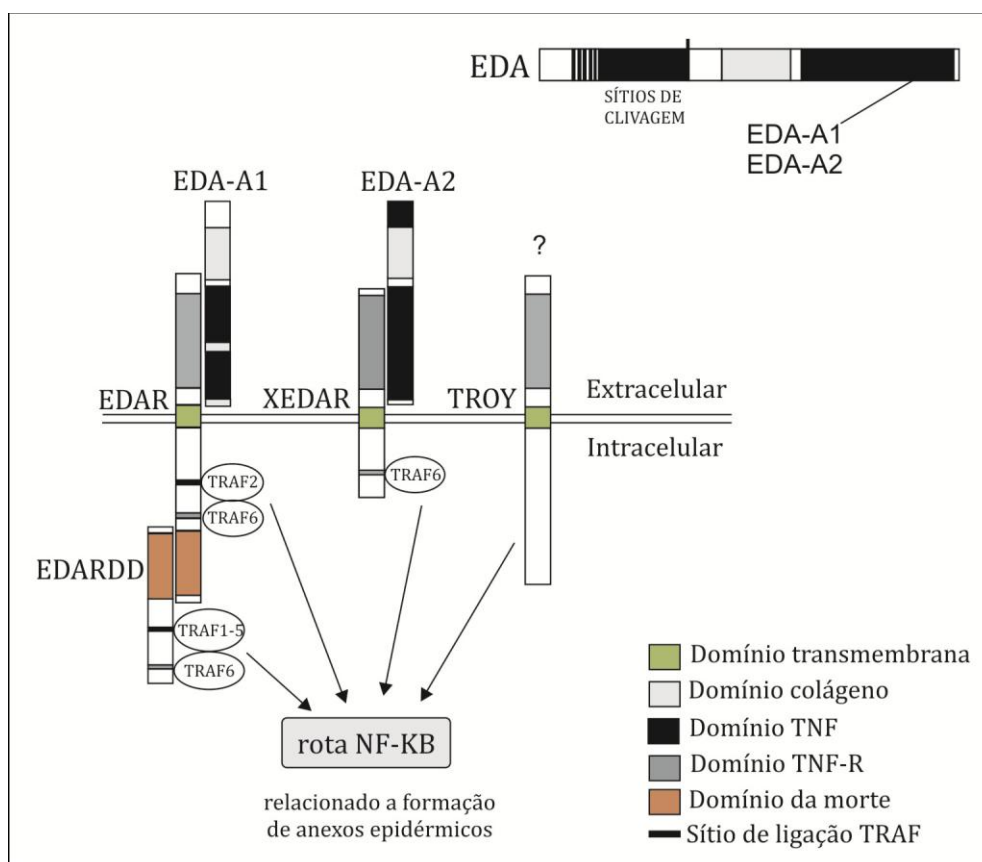


Figura 1-4. Rota de ativação do gene *Eda* em mamíferos, evidenciando o receptor *Edar* e o domínio da morte. Modificado de Pantalacci et al. (2008).

Mou et al. (2008) relevaram que este SNP aumenta a sinalização do *Edar* in vitro, e a elevação da função original do *Edar* em camundongos (ativada pelo aumento do número de cópias do *Edar*) converte múltiplos aspectos da morfologia do pelo; por exemplo, altera o diâmetro e elipticidade do pelo, em corte transversal, para a forma asiática (Fig. 1-5a).

Estes estudos apresentam uma conexão relevante entre genótipo (uma única mutação) e um fenótipo potencialmente “adaptativo” em humanos (embora haja um sinal positivo para seleção, o agente é desconhecido). Ainda, indica que mudanças de aminoácidos em genes importantes para o desenvolvimento de fato ocorrem, e podem causar mudanças fenotípicas. Este é um caso particularmente interessante, uma vez que o gene *Edar* possui efeitos altamente pleiotrópicos. Além disso, o camundongo mutante para o *Edar* produzido por Mou et al. (2008) apresentou a pelagem convertida, aparentemente, no fenótipo dos roedores silvestres que possuem pelos do tipo espinho, tal como *Acomys spinosissimus* (Fig. 1-5b). Entretanto, se desconhece a evolução molecular deste gene em mamíferos silvestres, em especial, o papel do *Edar* na convergência fenotípica de diferentes famílias de roedores espinhentos.



Figura 1-5. Similaridade de fenótipos para estrutura da pelagem em roedores. A, camundongo normal (*wild type*) e transgênico mutante (*Edar*^{Tg951}) evidenciando os efeitos do aumento na sinalização do gene *Edar* na alteração da morfologia do pelo, obtida de Mou et al. (2008); B, espécie silvestre *Acomys spinosissimus*.

Variação na estrutura do pelo: roedores como estudos de caso

Os pelos possuem variação estrutural e são divididos principalmente em duas grandes categorias: pelos-guardas e subpelos (Teerink 1991). Os pelos-guardas são mais longos, numerosos, grossos, sobressaindo-se e produzindo o padrão geral de coloração da pelagem. Apresentam função mecanorreceptora e dissimuladora no ambiente (Brunner & Coman 1974). Os subpelos são mais curtos, finos, ondulados e numerosos, contribuindo para a termorregulação e proteção (Mathiak 1938). A grande maioria dos estudos com pelagem de roedores utiliza este caráter como base para abordagens de cunho sistemático (Anderson 2001; Broeck et al. 2000; Ingberman & Monteiro-Filho 2006; Mayer 1952; Mathiak 1938; Teerink 1991; Porta & Llanesa 2001). A morfologia do pelo também tem sido alvo em estudos de ecologia (Cypher 1993; Quadros 1998; Hilton & Kutscha 1978) e paleontologia (Meng & Wiss 1997). Entretanto, as bases genéticas e os genes responsáveis pela variação morfológica da estrutura da pelagem, bem como os padrões evolutivos em populações naturais, permanecem desconhecidos para mamíferos em geral. Diversas espécies de roedores possuem pelos modificados em espinhos aristiformes (Hoey et al. 2004). Tais modificações epidérmicas evoluíram independentemente diversas vezes ao longo da história evolutiva e são representativas de táxons em pelo menos seis famílias: Cricetidae, Heteromyidae, Muridae, Hystricidae, Erethizontidae e Echimyidae. Os porcos-espinhos comumente conhecidos (Erethizontidae e Hystricidae) apresentam o corpo coberto por longos espinhos, de formato cilíndrico, que possuem função de proteção contra predadores (Hoey et al. 2004), cuja estrutura foi estudada em detalhes por Chernova & Kuznetsov (2001) e Sokolov & Chernova (1998). Por outro lado, os espécimes

representativos das outras quatro famílias, em geral, possuem espinhos menos desenvolvidos (chamados pelos aristiformes), cuja função e estrutura são amplamente desconhecidos. Assim, este estudo busca analisar a estrutura dos pelos-guarda modificados em espinhos e pelos aristiformes nas seis famílias de roedores que apresentam tal fenótipo sob um contexto filogeneticamente controlado, onde pares de táxons foram amostrados por família, sendo um com fenótipo espinhento, e outro não espinhento (Fig. 1-6), de forma a associá-los com variantes moleculares do gene *Edar*.

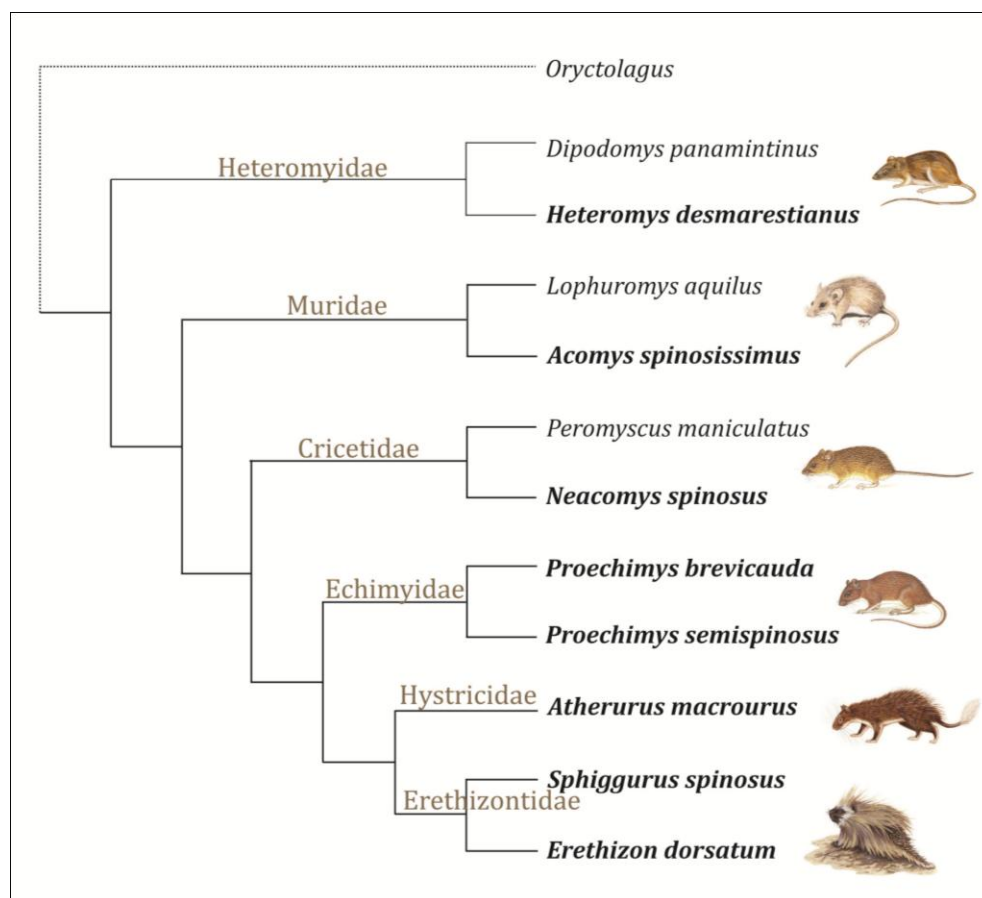


Figura 1-6. Relações filogenéticas entre os gêneros representativos das seis famílias de roedores utilizadas neste estudo, utilizando *Oryctolagus* (Lagomorpha) como grupo externo. O cladograma foi reconstruído através do método bayesiano, com base em 865pb do gene *Citocromo-b*. As famílias estão identificadas sobre os ramos. Táxons em negrito representam fenótipos espinhentos.

Escopo deste estudo

O objetivo deste estudo foi investigar a evolução e potencial associação genótipo-fenótipo dos genes *Mc1r* e *Edar*, previamente caracterizados como responsáveis por variações na coloração da pelagem e modificações em pelos-guarda, respectivamente. Em particular, elaborou-se a hipótese de mudanças estruturais e regulatórias nestes genes candidatos como mecanismo de diversificação morfológica e convergência fenotípica em mamíferos silvestres, especialmente roedores. Para isso, buscou-se caracterizar variantes moleculares e os correspondentes caracteres de pigmentação e pelos-guarda modificados em espinhos e pelos aristiformes em diferentes linhagens evolutivas.

Para o gene *Mc1r*, as análises tiveram como foco em particular os roedores ctenomídeos de forma a (i) caracterizar sequências em diversas espécies com variação na coloração da pelagem, (ii) investigar o envolvimento deste gene em fenótipos melânicos, (iii) mensurar níveis de expressão em diferentes localizações corporais sob três classes fenotípicas (clara, escura e melânica) e (iv) descrever características de coloração da pelagem e substrato, bem como cobertura vegetal dos habitats, em dois sistemas de espécies com fenótipos convergentes. Ainda, foram caracterizados padrões e taxas de evolução molecular e pressões seletivas sob o *Mc1r* em nove ordens de mamíferos. Para o estudo com o gene *Edar* utilizou-se 11 espécies de roedores, compreendendo as seis principais famílias que apresentam fenótipo espinhento (= pelos-guarda modificados em espinhos e/ou pelos aristiformes), tendo em vista caracterizar sequências do éxon 11, e descrever aspectos ultraestruturais da morfológica dos pelos.

No capítulo 2, é descrita a variabilidade na região codificante e porções adjacentes do gene *Mc1r* em ctenomídeos, onde as mudanças de aminoácidos foram mapeadas sob uma filogenia construída com sequências de um gene neutro para aspectos de coloração (*Citocromo-b*). Investigou-se também a evolução molecular deste gene em tal família de roedores através de modelos de evolução com base em códons. A expressão gênica foi quantificada em diferentes fenótipos, de forma a investigar o papel do *Mc1r* em mudanças regulatórias. A utilidade deste gene como marcador filogenético também é inferida.

No capítulo 3, descreve-se a evolução molecular do gene *Mc1r* em mamíferos, utilizando uma análise comparativa das taxas de substituição de nucleotídeos e aminoácidos em nove ordens de mamíferos. Em particular, inclui a caracterização de porções relaxadas versus conservadas do gene *Mc1r*. Também, foram testadas diferentes pressões seletivas ao longo dos 15 domínios da proteína, com base em modelos de códons, através de abordagem de máxima verossimilhança sob um contexto filogenético. Considerações sobre o aumento na taxa de substituição para a linhagem dos roedores são inferidas.

No capítulo 4, são descritos aspectos morfológicos e ecológicos em dois sistemas convergentes. Quantificou-se o padrão de distribuição do pigmento no pelo (i.e. comprimento das bandas terminal e subterminal), e densidade da coloração da pelagem e do substrato, bem como a associação entre estas variáveis. Aspectos ecológicos gerais como a cobertura vegetal nos quatro habitats são analisados.

No capítulo 5, é testada a hipótese de que mutações previamente conhecidas, e novas, no gene *Edar* estejam associadas ao padrão morfológico espinhento encontrado em roedores silvestres.

Através de uma abordagem integrativa, utilizando genética molecular e morfologia, foram caracterizados aspectos ultraestruturais dos pelos-guarda modificados em seis famílias de Rodentia.

No capítulo 6, são retomados os resultados obtidos neste estudo sob um contexto evolutivo.

Referências Bibliográficas

- Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J. 2009. Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) in Cetartiodactyla. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 550–557.
- Alonso L, Fuchs E. 2006. The hair cycle. *Journal of Cell Science* 119:391–393.
- Anderson MJ. 2001. The use of hair morphology in the classification of *Galagos* (Primates, Subfamily Galagoninae). *Primates* 42: 113-121.
- Anderson TM, vonHoldt BM, Candille SI, Musiani M, Greco C, Stahler DR, et al. 2009. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science* 323: 1339-1343.
- Arendt J, Reznick D. 2008. Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Trends in Ecology and Evolution* 23: 26–32.
- Baião PC, Schreiber EA, Parker PG. 2007. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed boobies (*Sula sula*): a melanocortin-1 receptor (*Mc1r*) analysis. *Journal of Heredity* 98: 287–292.
- Barsh GS. 1996. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends in Genetics* 12: 299–305.

- Beermann F, Orlow SJ, Lamoreux ML. 2004. The *Tyr* (albino) locus of the laboratory mouse. *Mammalian Genome* 15: 749–758.
- Benson SB. 1933. Concealing coloration among some desert rodents of the Southwestern United States. *University of California Publications in Zoology* 40: 1–70.
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM, Potter J. 2003. *TYRP1* is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Animal Genetics* 34: 169-175.
- Blackledge TA, Gillespie RG. 2004. Convergent evolution of behavior in an adaptive radiation of Hawaiian web-building spiders. *Proceedings of National Academy of Science USA* 101: 228–16 233.
- Botchkarev,VA, Fessing MY. 2005. Edar signaling in the control of hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 10: 247–251.
- Bradley BJ, Mundy NI. 2008. The primate palette: the evolution of primate coloration. *Evolutionary Anthropology* 17: 97-111.
- Brakefield PM, French V, Zwaan BJ. 2003. Development and the genetics of evolutionary change within insect species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 633–660.
- Broeck WV, Mortier P, Simoens P. 2000. Scanning electron microscopic study of different hair types in various breeds of rabbits. *Folia morphologica* 60: 33-40.

- Brower AV. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 6491–6495.
- Brunner H, Coman BJ. 1974. *The identification of mammalian hair*. Inkata Press: Melbourne.
- Bultman SJ, Klebig ML, Michaud EJ, Sweet HO, Davisson MT, Woychik RP. 1994. Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes & Development* 8: 481–490.
- Busch C, Antinuchi CD, Valle CJ, Kittle MJ, Malizia AI, Vassalo AI, Zenuto R. 2000. Population ecology of subterranean rodents. In: *Life underground, the biology of subterranean rodents*. In: LaceyEA, PattonJL, CameronGN, eds. *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: University of Chicago Press, 183-226.
- Cadena CD, Cheviron ZA, Funk WC. 2011. Testing the molecular and evolutionary causes of a 'leapfrog' pattern of geographical variation in coloration. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 402–414.
- Cain AJ, Sheppard PM. 1954. Natural selection in *Cepaea*. *Genetics* 39: 89-116.
- Cain AJ. 1983. Ecology and ecogenetics of terrestrial molluscan populations. In: Russell-Hunter WD, editor. *The Mollusca Vol. 6*. Academic Press: London. Pp. 597-647.
- Cameron RAD. 1992. Change and stability in *Cepaea* populations over 25 years: a case of climatic selection. *Proceedings of the Royal Society of London B* 248: 181-187.

- Carlson CS, Thomas DJ, Eberle MA, Swanson JE, Livingston RJ, Rieder MJ, Nickerson DA. 2005. Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data. *Genome Research* 15: 1553–1565.
- Caro T. 2005. The adaptive significance of coloration in mammals. *Bioscience* 55: 125–136.
- Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD. 2001. From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design. Blackwell: Oxford, UK.
- Chernova OF, Kuznetsov GV. 2001. Structural features of spines in some rodents (Rodentia: Myomorpha, Hystricomorpha). *Biology Bulletin* 28: 371–382
- Cheviron ZA, Hackett SJ, Brumfield RT. 2006. Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (*Mc1r*) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 273: 1613–1618.
- Chintala S, Li W, Lamoreux M, Ito S, Wakamatsu K, Sviderskaya E, et al. 2005. Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proceedings of National Academy of Science USA* 102: 10964–10969.
- Clarke B, Arthur W, Horsley DT, Parkin DT. 1978. Genetic variation and natural selection in pulmonate molluscs. In: Fretter V, Peake J, editors. *Pulmonates*. Academic Press: New York. p. 219-270.
- Cook LM. 1998. A two-stage model for *Cepaea* polymorphism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 1577-1593.
- Cott H. 1940. *Adaptive Colouration in Animals*. Methuen and Co.: London, UK.

- Courtois G, Smahi A. 2006. NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Death and Differentiation* 13: 843–851.
- Cypher BL, Woolf A, Yancy DC. 1993. Summer food habits of coyotes at Union County Conservation Area, Illinois. *Transactions Illinois State Academy Science* 86: 145-152
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, et al. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253–2256.
- Dice LR, Blossom PM. 1937. Studies of mammalian ecology in southwestern North America, with special attention to the colors of the desert mammals. Carnegie Institution of Washington Publication 485: 1–25.
- Dice LR. 1947. Effectiveness of selection by owls on Deermice (*Peromyscus maniculatus*) which contrast in colour with their background. *Contribution from the Laboratory of Vertebrate Biology University of Michigan* 34: 1–20
- Doucet SM, Shawkey MD, Rathburn MK, Mays HL, Montgomerie R. 2004. Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proceedings of the Royal Society of London B* 271: 1663–1670.
- Drovetski SV, Zink RM, Mode NA. 2009. Patchy distributions belie morphological and genetic homogeneity in rosy-finches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 437-445.
- Edleston RS. 1864. First *carbonaria* melanic of moth *Biston betularia*. *Entomologist* 2:150.

- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, et al. 2003. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology* 13: 448–453.
- Ellegren H, Sheldon BC. 2008. Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* 452: 169–175.
- Endler JA. 1990. On the measurement and classification of color in studies of animal coloration. *Biological Journal of the Linnean Society* 41: 315–352.
- Enshell-Seijffers D, Lindon C, Morgan BA. 2008. The serine protease Corin is a novel modifier of the Agouti pathway. *Development* 135: 217–225.
- Everts RE, Rothuizen J, van Oost BA. 2000. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (*Mc1r*) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Animal Genetics* 31: 194-199.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomysflamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88: 935–945.
- Freitas TRO, Lessa EP. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomystorquatus* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 65: 637–642.
- Freitas TRO. 1995. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 55-59.

- Fujimoto A, Kimura R, Ohashi J, Omi K, Yuliwulandari R, et al. 2008a. A scan for genetic determinants of human hair morphology: *EDAR* is associated with Asian hair thickness. *Human Molecular Genetics* 17: 835-843.
- Fujimoto A, Ohashi J, Nishida N, Miyagawa T, Morishita Y, et al. 2008b. Replication study confirmed the *EDAR* gene to be a major contributor to population differentiation regarding head hair thickness in Asia. *Human Genetics* 124: 179-185.
- Gerstenblith MR, Goldstein AM, Fagnoli MC, Peris K, Landi MT. 2007. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of *MC1R* variants across populations. *Human Mutation* 28: 495–505.
- Gompel N, Prud'homme B. 2009. The causes of repeated genetic evolution. *Developmental Biology* 332: 36–47.
- Gonçalves GL, Freitas TRO. 2009. Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomystorquatus*) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90: 1020-1031.
- Gould SJ. 2002. *The structure of evolutionary theory*. Harvard University Press: Cambridge, MA.
- Gratten J, Beraldi D, Lowder BV, McRae AF, Visscher PM, et al. 2007. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in *TYRP1* is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings. Biological sciences*, 274: 619–626

- Gross JB, Borowsky R, Tabin CJ. 2009. A novel role for *Mc1r* in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genetics* 5: e1000326.
- Haas F, Pointer MA, Saino N, Brodin A, Mundy NI, Hansson B. 2009. An analysis of population genetic differentiation and genotype–phenotype association across the hybrid zone of carrion and hooded crows using microsatellites and *Mc1r*. *Molecular Ecology* 18: 294-305.
- Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, et al. 2000. Evidence for variable selective pressures at *Mc1r*. *American Journal of Human Genetics* 66: 1351-1361.
- Harvey PH, Pagel MD. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press: Oxford, UK.
- Headon DJ, Overbeek PA. 1999. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nature Genetics* 22: 370–374.
- Herczeg G, Matsuba C, Merila J. 2007. Sequence variation in the melanocortin-1 receptor gene (*Mc1r*) is not associated with the level of dorsal melanism in a widespread anuran. *Annales Zoologici Fennici* 47: 37-45
- Hilton HJ, Kutscha NP. 1978. Distinguishing characteristics of the hairs of eastern coyote, domestic dog, red fox and bobcat in Maine. *American Naturalist* 100: 223-227.
- Hoekstra HE, Nachman MW. 2003. Different genes underlie adaptive melanism in different populations of pocket mice. *Molecular Ecology* 12:1185-94

- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bundry RA, Insel PA, Crossland JP. 2006 A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science* 313: 101–104.
- Hoekstra HE. 2006 Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97: 222–234.
- Hoekstra HE, Coyne JA. 2007. The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution* 61: 995–1016.
- Hoey KA, Wise RR, Adler GH. 2004. Ultrastructure of echimyid and murid rodent spines. *Journal of Zoology* 263: 307–315.
- Hofreiter M, Schöneberg T. 2010. The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 2591-603
- Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL, Suzuki H. 2005. Independent nonframeshift deletions in the *Mc1r* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *Journal of Heredity* 96: 607–613.
- Hubbard JK, Uy JA, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26: 231–239.
- Hull JM, Mindell DP, Talbot SL, Kay EH, Hoekstra HE, Ernest HB. 2010. Population structure and plumage polymorphism: the intraspecific evolutionary relationships of a polymorphic raptor, *Buteo jamaicensis harlani*. *BMC Evolutionary Biology* 10: 224.
- Ingberman B, Monteiro-Filho ELA. 2006. Identificação microscópica dos pêlos das espécies brasileiras de *Alouatta* Lacépède, 1799 (Primates, Atelidade Alouattinae). *Arquivos Museu Nacional* 64: 61-71

- Jackson IJ, Budd P, Horn JM, Johnson R, Raymond S, Steel K. 1994. Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. *Pigment Cell Research* 7: 73–80.
- Jackson IJ. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics* 28: 189–217.
- Jacobs-Palmer E, Domingues VS, Manceau M, Hoekstra HE. (Submetido). Ascending a fitness peak: the fixation of three adaptive pigmentation alleles.
- Jones JS, Leith BH, Rawlings P. 1977. Polymorphism in *Cepaea*: problem with too many solutions? *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 8: 109-143.
- Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng JF, Schmutz SM, Barsh GS. 2004. Characterization of the dog *Agouti* gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome* 15: 798-808.
- Kettlewell HBD. 1955. Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* 9: 323–42.
- Kettlewell HBD. 1956. Further selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* 10: 287–301.
- Kijas JMH, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L. 1998 Melanocortin receptor 1 (*Mcr1*) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150: 1177–1185.
- Kingsley EP, Manceau M, Wiley CD, Hoekstra HE. 2009. Melanism in *Peromyscus* is caused by independent mutation in *Agouti*. *PLoS One* 4: e6435.

- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. 1995. The role of the melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* 6: 636–639.
- Kuramoto T, Nomoto T, Sugimura T, Ushijima T. 2001. Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. *Mammalian Genome* 12: 469-471
- Lacey EA, Patton JL, Cameron GN. 2000. *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Lalueza-Fox C, Römpler H, Caramelli D, Stäubert C, Catalano G, et al. 2007. A melanocortin-1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science* 318: 1453-1454.
- Lamotte M. 1959. Polymorphism of natural populations of *Cepaea nemoralis*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 24: 65-86.
- Langguth A, Abella A. 1970. Sobre una poblacion de tuco-tucos melánicos (Rodentia-Octodontidae). *Acta Zoologica Lilloana*, 27:101-108.
- Lewontin R. 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press: New York, NY.
- Ling MK, Lagerstrom MC, Fredriksson R, Okimoto R, Mundy NI, Takeuchi S, Schioth H. B. 2003. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *European Journal of Biochemistry* 270: 1441–1449.
- Linnen CR, Kingsley EP, Jensen JD, Hoekstra HE. 2009. On the origin and spread of an adaptive allele in deer mice. *Science* 325: 1095–1098.

- Loehr J, Worley K, Moe J, Carey J, Coltman DW. 2008. *MC1R* variants correlate with thinhorn sheep colour cline but not individual colour. *Canadian Journal of Zoology* 86: 147–150.
- Losos JB, Jackman TR, Larson A, Queiroz K, Rodriguez-Schettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science* 279: 2115–2118.
- Losos JB. 2011. Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution* 65-7: 1827–1840.
- Lowe A, Harris S, Ashton P. 2004. *Ecological genetics: design, analysis and application*. Blackwell: Oxford, UK.
- Ludwig, A. et al. 2009 Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* 324, 485
- Mackay TF, Stone EA, Ayroles JF. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics* 10: 565–577.
- Macnair MR. 1987. Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. *Trends in Ecology and Evolution* 2: 354-359
- Makova KD, Norton HL. 2005. Worldwide polymorphism at the *Mc1r* locus and normal pigmentation variation in humans. *Peptides* 26: 1901-1908.
- Makova KD, Ramsay M, Jenkins T, Li W-H. 2001. Human DNA sequence variation in a 6.6-kb region containing the melanocortin-1 receptor promoter. *Genetics* 158: 1253-1268.

- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HE. 2010. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 2439-2450
- Manceau M, Domingues VS, Mallarino R, Hoekstra HE. 2011. The developmental role of *Agouti* in color pattern evolution. *Science* 331: 1062.
- Marklund L, Moller KJ, Sandberg K, Andersson L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*Mc1r*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome* 7: 895–899.
- Mathiak HA. 1938. A key to hairs of the mammals of southern Michigan. *Journal of Wildlife Management* 2: 251-268.
- Mayer WV. 1952. The hair of California mammals with keys to the dorsal guard hairs of California mammals. *American Naturalist* 48: 480-512.
- McRobie H, Thomas A, Kelly J. 2009. The genetic basis of melanism in the Gray Squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Journal of Heredity* 100: 709–714.
- Meng J, Wiss AR. 1997. Multituberculate and other mammal hair recovered from palaeogene excreta. *Nature* 385:712-714.
- Mikkola ML, Thesleff I. 2003. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Review* 14: 211–224.
- Millar SE. 2005. An ideal society? Neighbors of diverse origins interact to create and maintain complex mini-organs in the skin. *PLoS Biology* 3:e372.

- Mora M, Olivares AI, Vassallo AI. 2003. Size, shape and structural versatility of the skull of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): functional and morphological analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 85–96
- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy*, 87: 1192-1203.
- Moro O, Ideta R, Ifuku O. 1999. Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (*Mcl1r*) gene. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 262: 452–460.
- Morris, SC. 2003. *Life's solution: inevitable humans in a lonely universe*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Mou C, Thomason HA, Willan PM, Clowes C, Harris WE, et al. 2008. Enhanced Ectodysplasin-a receptor (*Edar*) signaling alters multiple fiber characteristics to produce the east asian hair form. *Human Mutation* 29: 1405-1411
- Mullen LM, Hoekstra HE. 2008. Natural selection along an environmental gradient: a classic cline in mouse pigmentation. *Evolution* 62: 1555–1570.
- Mullen LM, Vignieri SN, Gore JA, Hoekstra HE. 2009. Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 3809–3818.

- Muller-Rover S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmuller S, Foitzik K, et al. 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *Journal of Investigative Dermatology* 117:3–15
- Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Scribner K, Janssen K, Nadeau NJ. 2004 Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 303: 1870–1873.
- Mundy NI, Kelly J. 2003. Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *American Journal of Physical Anthropology* 121: 67–80
- Mundy NI. 2005. A window on the genetics of evolution: *Mc1r* and plumage coloration in birds. *Proceedings of the Royal Society Series B* 272: 1633-1640.
- Myles S, Tang K, Somel M, Green RE, Kelso J, Stoneking M. 2008. Identification and analysis of high *F_{st}* regions from genome-wide SNP data from three human populations. *Annals of Human Genetics* 72: 99–110.
- Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL. 2003 The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proceedings of National Academy of Science USA* 100: 5268–5273.
- Nadeau NJ, Minvielle F, Mundy NI. 2006. Association of a Glu92Lys substitution in *MC1R* with extended brown in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Genetics* 37: 287–289.
- Nascimento AA, Roland JT, Gelfand VI. 2003. Pigment cells: a model for the study of organelle transport. *Annual Review of Cell and Development Biology* 19: 469–491.
- Norris B, Whan V. 2008. A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research* 18: 1282-1293

- Ozgo M. 2005. *Cepaea nemoralis* (L.) in southeastern Poland: Association of morph frequencies with habitat. *Journal of Molluscan Studies* 71: 93-103.
- Pantalacci S, Chaumot A, Benoit G, Sadier A, Delsuc F, Douzery EJP, Laudet V. 2008. Conserved features and evolutionary shifts of the EDA signaling pathway involved in vertebrate skin appendage development. *Molecular Biology and Evolution* 25: 912–928.
- Parada A, D'Elía G, Bidau CJ, Lessa EP. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92: 671-682
- Pointer MA, Mundy NI. 2008. Testing whether macroevolution follows microevolution: are colour differences among swans (*Cygnus*) attributable to variation at the *Mc1r* locus? *BMC Evolutionary Biology* 8: 249.
- Porta X, Llana L. 2001. Diferencias macroscópicas entre pelos de perro (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) y lobo ibérico (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907). *Galemys* 13: 205-215.
- Protas ME, Patel NH. 2008 Evolution of coloration patterns. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 425–446.
- Quadros J. 1998. Identificação microscópica de pelos de mamíferos brasileiros e sua aplicação no estudo de dieta de carnívoros. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH-J, Sambughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li W-H, 1999. High polymorphism at the human melanocortin-1 receptor locus. *Genetics* 151: 1547-1557.
- Rato C, Carranza S, Perera A, Carretero MA, Harris DJ. 2010. Conflicting patterns of nucleotide diversity between mtDNA and nDNA in the Moorish gecko, *Tarentola mauritanica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 962-971.
- Rees, JL. 2000. The melanocortin-1 receptor (*Mc1r*): more than just red hair. *Pigment Cell Research* 13: 287-296.
- Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology and speciation in *Ctenomys*. In: *Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels* (Nevo, E. and Reig, O.A., eds.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 71-96.
- Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B, Uerin G. 2001. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* 12: 450-455.
- Ritland K, Newton C, Marshall HD. 2001. Inheritance and population structure of the white-phased "Kermode" black bear. *Current Biology* 11: 1468-1472
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72: 827-834.

- Römpler H, Rohland N, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Kuznetsova T, et al. 2006 Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths. *Science* 313: 62.
- Rosenblum EB, Hoekstra HE, Nachman MW. 2004. Adaptive reptile color variation and the evolution of the *Mc1r* gene. *Evolution* 58: 1794–1808.
- Rosenblum EB, Römpler H, Schöneberg T, Hoekstra HE. 2010 Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 2113–2117.
- Rosenblum EB. 2006. Convergent evolution and divergent selection: lizards at the White Sands ecotone. *American Naturalist* 167: 1–15.
- Sabeti PC, et al., The International HapMap Consortium. 2007. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449: 913-8.
- Savage SA, Gerstenblith MR, Goldstein AM, Mirabello L, Fagnoli MC, Peris K, Landi MT. 2008. Nucleotide diversity and population differentiation of the Melanocortin 1 Receptor gene, *Mc1r*. *BMC Genetics* 9: 31
- Schmidt-Küntzel A, Eizirik E, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M. 2005. Tyrosinase and Tyrosinase Related Protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *Journal of Heredity* 96: 289-301
- Schmidt-Ullrich R, Paus R. 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays* 27: 247–261.
- Schmutz SM, Berryere TG, Ellinwood NM, Kerns JA, Barsh GS. 2003. *Mc1r* studies in dogs with melanistic mask or brindle patterns. *Journal of Heredity* 94: 69–73.

- Schmutz SM, Berryere TG, Goldfinch AD. 2002. *TYRP1* and *MC1R* genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mammalian Genome* 13: 380-387.
- Searle AG. 1968. *Comparative Genetics of coat colour in Mammals*. Logos Press: London.
- Sheppard PM. 1951. Fluctuations in the selective value of certain phenotypes in the polymorphic land snail *Cepea nemoralis*. *Heredity* 5: 125-134.
- Silvers WK. 1979. *The coat colors of mice: a model for mammalian gene action and interaction*. Springer-Verlag: New York, NY.
- Slate J, Gratten J, Beraldi D, Stapley J, Hale M, Pemberton JM. 2009. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* 136: 97-107
- Smith AG, Box NF, Marks LH, Chen W, Smit DJ, et al. 2001. The human melanocortin-1 receptor locus: analysis of transcription unit, locus polymorphism and haplotype evolution. *Gene* 281: 81-94.
- Sokolov VE, Chernova OF. 1998. New data on porcupine spine structure (Hystricomorpha, Rodentia). *Biology Bulletin* 363: 429-432.
- Steiner CC, Römler H, Boettger LM, Schöneberg T, Hoekstra HE. 2009. The genetic basis of phenotypic convergence in beach mice: similar pigment patterns but different genes. *Molecular Biology and Evolution* 26: 35-45.
- Steiner CC, Weber JN, Hoekstra HE. 2007 Adaptive variation in beach mice produced by two interacting pigmentation genes. *PLoS Biology* 5: 1880-1889.
- Stern DL, Orgogozo V. 2009. Is genetic evolution predictable? *Science* 323: 746-751.

- Stinchcombe JR, Hoekstra HE. 2008 Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* 100: 158–170.
- Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. 2001. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277: 49–62
- Sturm, R. 2009. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics* 18: 9-17.
- Sumner FB. 1934. Does 'protective coloration' protect? Results of some experiments with fishes and birds. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 20: 559–564
- Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, Takahashi S. 1996. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1308: 164-168
- Tang K, Thornton KR, Stoneking M. 2007. A new approach for using genome scans to detect recent positive selection in the human genome. *PLoS Biology* 5:e171.
- Teerink BJ. 1991. *Hair of west European mammals: atlas and identification*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Theron E, Hawkins K, Bermingham E, Ricklefs RE, Mundy NI. 2001. The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Current Biology* 11: 550–557.
- Tutt JW. 1896. *British moths*. London George: Routledge, UK.

- Uy JA, Moyle RG, Filardi CE, Cheviron ZA. 2009. Difference in plumage color used in species recognition between incipient species is linked to a single amino acid substitution in the melanocortin-1 receptor. *American Naturalist* 174: 244–254.
- Vage DI, Fuglei E, Snipstad K, Beheima J, Veslemøy ML, Klungland H. 2005. Two cysteine substitutions in the *Mc1r* generate the blue variant of the arctic fox (*Alopex lagopus*) and prevent expression of the white winter coat. *Peptides* 26: 1814–1817
- Vage DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome* 10: 39–43.
- Vage DI, Lu D, Klungland J, Lien S, Adalsteinsson S, Cone RD. 1997. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nature Genetics* 15: 311–315.
- van't Hof AE, Edmonds N, Dalíková M, Marec F, Saccheri IJ. 2011. Industrial melanism in British Peppered Moths has a singular and recent mutational origin. *Science* 6032: 958-960
- van't Hof AE, Saccheri IJ. 2010. Industrial melanism in the Peppered Moth is not associated with genetic variation in canonical melanisation gene candidates. *PLoS ONE* 5: e10889.
- Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz N, Pla C. 2010. Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the *MC1R* gene. *Animal Genetics* 41: 656–658.

- Vignieri SN, Larson J, Hoekstra HE. 2010. The selective advantage of cryptic coloration in mice. *Evolution* 64: 2153-2158.
- Voight BF, Kudravalli S, Wen X, Pritchard JK. 2006. A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biology* 4:e72.
- Vrieling H, Duhl DM, Millar SE, Miller KA, Barsh GS. 1994. Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 5667–5671.
- Wake DB. 1991. Homoplasy—the result of natural selection, or evidence of design limitations. *American Naturalist* 138: 543–567.
- Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775–781.
- Wang IJ, Shaffer HB. 2008. Rapid color evolution in an aposematic species: a phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poisondart frog. *Evolution* 62: 2742–2759.
- Williamson SH, Hernandez R, Fledel-Alon A, Zhu L, Nielsen R, Bustamante CD. 2005. Simultaneous inference of selection and population growth from patterns of variation in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 7882–7887.
- Wlasiuk G, Nachman MW. 2007. The genetics of adaptive coat color in gophers: Coding variation at *Mc1r* is not responsible for dorsal color differences. *Journal of Heredity* 98: 567-574

CAPÍTULO 2

STRIKING COAT COLOUR VARIATION IN TUCO-TUCOS (RODENTIA: CTENOMYIDAE): A ROLE FOR THE MELANOCORTIN-1 RECEPTOR?

Gislene L. Gonçalves¹, Hopi E. Hoekstra² and Thales R. O. Freitas¹

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9.500, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

²Department of Organismic and Evolutionary Biology and The Museum of Comparative Zoology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA

Artigo aceito para publicação: *Biological Journal of the Linnean Society*

ABSTRACT

South American tuco-tucos (*Ctenomys*) are characterized by striking variation in coat colour. A range of phenotypes, from pale blonde to dark black, is observed across species, some of them matching their local substrate colour. Moreover, phenotypic convergence is evident in some taxa that occupy similar habitats. The present study investigated a role for the *melanocortin-1 receptor* (*Mc1r*) in determining coat-colour variation in a wide range of *Ctenomys* species. We sequenced 1250 base pairs, including the entire *Mc1r* coding region and a portion of the adjacent 5' and 3' UTRs in 21 species. In total 20 amino acid replacements were identified in *Mc1r*. However, our findings suggest that these changes have not contributed to coat-colour differences among tuco-tucos, since no amino acid replacement was associated with pigmentation phenotype in a simple way. Levels of *Mc1r* expression were measured in skin samples from dorsal, flank and ventral body regions in pale, brown and melanic individuals. We did not observe any significant difference in transcript abundance among phenotypes, but we identified a significant reduction of expression level from the dorsal to ventral region in both pale and brown morphs, although not in the melanic form. Thus, a role for *Mc1r* regulation in tuco-tucos colour pattern cannot be completely ruled out, although further functional assays are needed. Finally, selection analysis suggests that *Mc1r*, in a majority of lineages, has evolved under purifying selection but with relaxation in functional constrain in some regions, especially in the fourth transmembrane domain. In summary, our results suggest that this trait may have a complex basis, and that other pigmentation genes are involved in generating the dramatic diversity in coat-colour phenotypes observed among *Ctenomys* species.

KEYWORDS: adaptation – crypsis - *Mc1r* – pigmentation - purifying selection

INTRODUCTION

Coat-colour variation is one of the most conspicuous phenotypic traits in mammals. The investigation of this trait specifically allows us to make inferences about the mechanisms that generate phenotypic diversity more generally. For example, we can determine the kind of genes involved in phenotypic change, whether trait variation is caused primarily by changes in gene structure or gene regulation, and finally, if similar phenotypes are produced by similar genetic changes (Hoekstra, 2006). Targeting genes that are known to control hair colour in laboratory populations may provide insights into the mechanisms driving coat-colour evolution in the wild (Hofreiter & Schöneberg, 2010; Hubbard *et al.*, 2010).

One promising candidate gene is the *melanocortin-1 receptor (Mc1r)*. Hair and skin colour in mammals is largely determined by the amount, type, and distribution of melanin packaged in the melanosomes of epidermal cells and hair follicles (Jackson, 1997). *Mc1r* acts as a pigmentary switch in the production of melanin: when activated by α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), it signals the production of eumelanin (black/brown pigment) and in the absence (or inhibition) of α -MSH, pheomelanin (red/yellow pigment) is synthesized (Jackson, 1997). In mice, *Mc1r* dominant mutations are often associated with a hyperactive or constitutively active receptor resulting in predominantly black coat colour (Jackson *et al.*, 1994), whereas recessive loss-of-function mutations tend to trigger the production of pheomelanin, which leads to predominantly yellow or red coat colour (Robbins *et al.*, 1993). In addition, several pigmentation polymorphisms in domestic and wild mammals have been attributed to variation in *Mc1r*, for example: beach mice (Hoekstra *et al.*, 2006), black bears (Ritland *et al.*, 2001), cattle (Klungland *et al.*, 1995), dogs (Newton *et al.*, 2000), foxes (Våge *et*

al., 1997), gray squirrels (McRobie, Thomas & Kelly, 2009), horses (Marklund *et al.*, 1996), jaguars and jaguarundis (Eizirik *et al.*, 2003), pigs (Kijas *et al.*, 1998), golden lion tamarins (Mundy & Kelly, 2003), rock pocket mice (Nachman, Hoekstra & D'Agostino, 2003) and sheep (Våge *et al.*, 1999). Intraspecific studies suggest that the *Mc1r* may be a target of positive selection—it underlies adaptive melanism in rock pocket mice (Nachman *et al.*, 2003) and adaptive pale colouration in beach mice (Hoekstra *et al.*, 2006). Despite the many cases of intraspecific pigment polymorphism associated with *Mc1r* mutations, much less is known about its role in the evolutionary pattern of colouration among more diverged mammalian species (e.g. Ayoub *et al.*, 2009; Eizirik *et al.*, 2003; Mundy & Kelly, 2003).

South American tuco-tucos (Ctenomyidae) represent a remarkable system for investigating the genetic basis of ecologically important traits like pigmentation. This family of subterranean rodents is characterized by conspicuous ecological and morphological diversity (Busch *et al.*, 2000; Lacey, Patton & Cameron, 2000; Mora, Olivares & Vassallo, 2003). Ctenomyids occur in a wide variety of habitats and across extensive areas (Lacey *et al.*, 2000). They can be found, for example, in the pampas of Puna (above 4,000 m), the high mountain steppes, low valleys of the west, the dunes of the Atlantic coast of the east, mesic and humid plains, desert or semi-deserts, open areas among subtropical forests and the steppes of Terra del Fuego (Reig *et al.*, 1990). In addition, tuco-tucos have a wide range of pelage colouration that vary both inter- and intraspecifically, ranging from pale blonde to brown with white spots and even melanic phenotypes (Freitas & Lessa, 1984; Gonçalves & Freitas, 2009; Langguth & Abella 1970). In most cases, their dorsal colouration matches the substrate in which they live (Langguth & Abella, 1970). In addition, some taxa represent clear examples of phenotype convergence (Fig. 1). For example, the closely related species *C. australis* and *C. flamarioni*

inhabit pale coastal dunes in Argentina and Brazil respectively (Fernandez-Stolz, Stolz & Freitas, 2007; Mora *et al.*, 2006), and both are characterized by pale coats. The more distantly related species *C. talarum* and *C. minutus* occupy darker sand habitats adjacent to the coastal dunes and are significantly darker than their coastal counterparts (Busch *et al.*, 2000; Freitas, 1995). These two pairs of closely and distantly related cryptically coloured taxa may represent a case of adaptation to minimize predation. To date, the genetic basis of this convergence has not been explored; it is unknown, for example, whether mutations in the same gene or different genes cause such similar coat colours.

This study investigates the evolution of *Mc1r* and its possible role underlying coat-colour diversity in *Ctenomys*. Specifically, we aim to: (1) identify amino acid replacements associated with coat-colour differences, (2) measure levels of gene expression between extreme pale and dark phenotypes, and (3) quantify patterns of selective constraint and positive selection acting on this protein.

MATERIAL AND METHODS

Experimental procedure

A total of 21 ctenomyid species were surveyed in this study. Their phenotypes were classified by considering overall appearance (dorsal colouration) and grouped into three classes: (i) pale, (ii) dark: brown, brown with white spots and dark brown and (iii) melanic. Tissue samples were obtained either from live caught specimens or from scientific collections (Table 1).

Genomic DNA (gDNA) was isolated using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) following manufacturer instructions. Comparative analysis was performed using both nucleotide and amino acid sequences of *Mc1r* from additional rodents obtained from the GenBank (*Chaetodipus intermedius*, AY247634; *Eothenomys melanogaster*, GU001573; *Meriones unguiculatus*, AY800269; *Mus musculus*, AB306322; *Onychomys torridus*, DQ482899; *Peromyscus maniculatus*, GQ337977; *Sciurus carolinensis*, EU604831; *Thomomys bottae*, EF488834; *Rattus norvegicus*, AB306978).

Specific primers were designed for *Ctenomys*, targeting the *Mc1r* coding region, based on alignment of sequences across all rodents available in GenBank. Initially, six sets of primers were tested in all possible combinations with different annealing temperature and MgCl₂ concentration. Primers GLF1 (5'-CCAAGAACCGAAACCTGCAC-3') and GLR5 (5'-AAAGCATAGATGAGGGGGTC-3') amplified a 710 base pairs (bp) expected product using a touchdown PCR profile (decreasing annealing temperatures from 60°C to 50°C) with AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) and 1.8 mM MgCl₂. PCR products were purified using Exonuclease I (GE Healthcare) and Shrimp Alkaline Phosphatase, sequenced with a BigDye chemistry and analyzed on a ABI3730XL. Resulting sequences were checked using BLAST (Altschul *et al.*, 1990) and used to design primers that would capture the complete *Mc1r* coding region (954bp), as well as a small portion of the 5' and 3' untranslated regions (5'UTR and 3'UTR, respectively). The genome-walking technique was performed with a Universal Genome Walking kit (Clontech) and a sample of high molecular weight gDNA with from *C. flamarioni*. First, we built a pool of gDNA fragments bound to adapters, defined as "libraries", using restriction enzymes Dra I, EcoRI, Pvu II, Stu I. Then, two amplifications were performed by polymerase chain reaction (PCR) for each library. A single positive band (i.e. specific PCR product) was identified in three

of four libraries and selected for further characterization. Each fragment was cut from a 1.5% agarose gel, purified by columns (Invitrogen) and directly sequenced. Finally, a new set of 6 pairs of primers was designed to amplify the entire *Mc1r* coding region and neighboring UTRs in *Ctenomys* (1250 bp). Nucleotide sequences of primers are available upon request. This segment was amplified using recombinant Taq polymerase (Invitrogen), an annealing temperature of 67°C, and 1.2 mM MgCl₂ and sequenced as previously described.

Gene structure and expression analysis

Mc1r nucleotide sequences from all 21 species were aligned using Codon Code Aligner (CodonCode Corp.), and all chromatograms were manually visualized and checked. Analyses were performed in the Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) and PAUP* 4.0 (Swofford, 2002) programs, including analysis of nucleotide composition, codon usage bias and phylogenetic relationships. To reconstruct *Mc1r* gene genealogies, we used the 1250 bp, which includes the entire *Mc1r* coding region. A tree was constructed using maximum likelihood (ML) method with heuristic search option, tree bisection-reconnection and an initial neighbor-joining clustering. Branch support was estimated by 1000 bootstrap replications using a heuristic search of nearest-neighbor interchange. Nucleotide substitution model was estimated using jModeltest (Posada, 2008), following the Akaike information criterion. All the amino acid changes were tracked along branches of a phylogenetic tree, which was reconstructed based on cytochrome b (*cytb*) data using a ML method, with MacClade 4.0 (Maddison & Maddison, 2000). Several species already had *cytb* sequences available in GenBank; for all others we sequenced a fragment of the gene (ca. 500 bp) using primers MVZ05 and TUC006 (Wlasiuk *et al.*, 2003) (Table 1).

Because *Mc1r* plays a key role in the type and distribution of melanin throughout the hair, we hypothesized that transcript levels of messenger RNA (mRNA) may be higher in darker species compared to paler ones. Similarly, transcript abundance may vary across body regions within individuals: high on the dark-coloured dorsal region, intermediate on flank, and lowest on pale ventrum, following the colour gradient generally observed in tuco-tucos. Thus, we quantified levels of *Mc1r*-mRNA in the three classes of phenotypes: pale (*C. australis* and *C. flamarioni*, n = 4), dark (*C. minutus* and *C. torquatus*, n = 4) and melanic (*C. torquatus*, n = 2) using quantitative PCR (qPCR). Skin tissue samples of 5 mm³ were collected on dorsal, flank and ventral from field trapped adults, preserved in RNA later (Ambion) and stored at -80°C. RNA extraction was performed using RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen). This RNA then served as a template for complementary DNA (cDNA) synthesis, using random hexamer oligonucleotides primers (poly-dT 20) and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). We purified the cDNA using columns (Invitrogen). We next designed a custom TaqMan assay (Invitrogen) to measure *Mc1r* transcript abundance in a Realplex2 Mastercycler (Eppendorf). The “housekeeping” gene (β -actin, *act*) was used as a control for starting RNA amounts. These experiments were carried out in duplicate. PCR was initiated with a “hot start” of 15 min at 95°C followed by 50 cycles of denaturation (94°C, 15 s), annealing (50°C, 30 s) and extension (72°C, 30 s). We calculated the relative *Mc1r*-mRNA levels using the ratio of *Mc1r*-mRNA to *act*-mRNA. We compared relative expression levels of each gene with Student’s t-test (two-tailed, unequal variance).

Test for *Mc1r* selection

Variation in selective pressure (e.g. positive selection) acting on *Mc1r* was characterized by estimating the ratios of nonsynonymous to synonymous substitution rates

(dN/dS or ω) using the *codeml* program of PAML 4.2 (Yang, 1997; Yang, 2007). When the ω ratio is significantly less than 1, this is consistent with the action of purifying selection. Neutral evolution is considered likely, if the ratio is approximately equal to 1. Positive selection is inferred ω is significantly greater than 1. The dataset comprised 21 sequences of *ctenomyids* and other nine rodent species. The latter were included to compare the evolution of *Mc1r* in *ctenomyids* to other families and specifically to test if there is acceleration of nonsynonymous substitution rate in *tuco-tucos*. The phylogeny used for this analysis was a consensus of published data (Blanga-Kanfi *et al.*, 2009).

The data set was adjusted to six models of codon substitution (Yang *et al.*, 2000): M0 (one ratio), fitting a single value of ω across all sites; M1, which allows for two site classes ($\omega = 1, 0 < \omega < 1$); M2 (positive selection) with three site classes ($\omega = 1, 0 < \omega < 1$ and $\omega > 1$); M3 (discrete) that has three discrete site classes with different ω values; M7 (β), which assumes a β distribution of class sites that does not allow for selection ($0 < \omega < 1$); and M8 (continuous) that is similar to M7 but has an additional class with $\omega > 1$. We calculated Bayesian posterior probabilities for positively selected sites using either Naïve empirical Bayes (NEB) for model M3 or Bayes empirical Bayes (BEB) in case of models M2 and M8. We also conducted a Likelihood ratio test (LRT) to compare the corresponding models with and without selection (i.e. M2 vs. M1, M3 vs. M0 and M8 vs. M7). Finally we performed tests to evaluate variation in selective pressures in each domain of the *Mc1r* protein defined as: extracellular (EL1-EL4), intracellular (IL1-IL4) and transmembrane (TM1-TM7), using all *Ctenomys* and other 35 rodent sequences. In addition, we performed branch-site models types A and D. These analyses allow the ω ratio to vary among branches in the phylogeny and are useful for detecting selection acting on particular lineages (Yang, 1998; Yang & Nielsen, 1998). All statistical significance was

determined by comparing twice the log-likelihood scores ($2\Delta\text{LnL}$) to a χ^2 distribution with degrees of freedom equal to the difference in the number of parameters between the models to be compared (Yang, 1997).

RESULTS

***Mc1r* variability and coat-colour**

In ctenomyids, the *Mc1r* gene consisted of a single exon of 948 bp (315 amino acids). The complete coding region and a small 5' and 3' UTR fragments (ca. 150bp on each side) were successfully aligned for all species but *C. leucodon*, for which only a partial sequence was obtained. High levels of *Mc1r* variability were observed among species, including 66 variable nucleotide sites and 20 amino acid changes (Table 2, Fig. 2). UTR segments were almost entirely conserved across species with only 3 substitutions of C/T: site 90 at 5'UTR and sites 1114 and 1119 at 3'UTR (Table 2). Two indels were identified in the *Ctenomys* coding region when compared with other rodents, corresponding to a 6-bp deletion and a 3-bp insertion (Fig. 2). Intraspecific variability was not observed, except for *C. torquatus*, in which a T/C mutation was identified at nucleotide site 612 (Table 2). The existence of heterogeneity in evolutionary rates was apparent among both lineages and *Mc1r* domains (Table 2, Fig. 2). Fourteen replacements were located in transmembrane domains (mainly TM3 and TM4), four in the extracellular regions (EL1 and EL2), and only one in the intracellular loops (IL3) (Fig. 2). Most of the variation was identified in one species, *C. leucodon*, including 15 unique nonsynonymous substitutions (Table 2, Fig. 2). Assessment of nucleotide composition in *Ctenomys* sequences

revealed high GC content: 59% in the 5' non-coding fragment, 61% in the 3' fragment, and 63% in the coding region. When the three different codon positions were analyzed separately, the GC content was 58% in the first, 40% in the second and 83% in the third position. Finally, phylogenetic analysis using *Mc1r* nucleotide sequences recovered major groups of ctenomyids previously determined by published phylogenies (e.g. Parada *et al.*, 2011), but with limited internal resolution of relationships (Fig. 3); only a few clades of the tree were resolved with high bootstrap support. Basal positions of *C. leucodon* and *C. sociabilis* identified in previous studies (e.g. Lessa & Cook, 1998; Parada *et al.*, 2011) were also recovered. However, *C. haigi* also showed a basal position, not consistent with previous results (e.g. Castillo *et al.*, 2005; Parada *et al.*, 2011)

There was no simple association between the 20 amino acid replacements and coat-colour phenotypes among species (Fig. 4). *C. australis* showed a unique, but conservative, amino acid change, Ile⁹⁸Val, although this was not present in *C. flamarioni*, the other member of this clade with similar coat colour. In addition, both melanic forms of *C. rionegrensis* and *C. torquatus* had *Mc1r* sequences identical to brown morphs of the same species (Fig. 4). *Ctenomys boliviensis*, *C. nattereri* and some members of the *Mendocinus* group showed the same replacements including Try¹⁶³Arg and Iso¹⁷⁷Thr (Fig. 4). In addition, we identified a unique Thr⁹⁵Met mutation in *C. maulinus* and *C. sociabilis*. The most surprisingly result was the 15 amino acid replacements observed only in *C. leucodon* (Table 2; Fig. 2). Finally, none of the 20 amino acid changes observed in *Ctenomys* overlapped with those previously shown to be associated with coat-colour variation in other species.

Levels of *Mc1r* expression

Mc1r transcript levels were not significantly different between body regions when we compared pale and brown morphs: the dorsal (average \pm standard error = 6.21 ± 0.15 and 6.26 ± 0.28) and flank regions (4.47 ± 0.31 and 4.54 ± 0.17) showed similar expression levels (Fig. 5). However, comparison of the ventral regions indicated a significant increase in *Mc1r* transcript abundance ($P < 0.01$) in the melanic morph (3.92 ± 0.14) compared to pale (2.97 ± 0.43) and brown (2.97 ± 0.19) morphs. Moreover, when transcript abundance was compared within each phenotype but across body regions, there was a significant reduction ($P < 0.01$) in *Mc1r* transcript in both the pale and brown forms (from high in dorsal to low in ventral), but not in the uniformly melanic form (Fig. 5).

Purifying selection and relaxation of functional constraints in *Mc1r*

Site-specific models identified variation in selection pressure among rodent lineages (Table 3, Fig. 6). Model M0 (one ratio) assumes the same ratio for all sites and fits the data more poorly than any of the other models, which is likely due to variable ω ratios across sites. The M3 (discrete) model involves four more parameters than M0, and the LRT statistic $2\Delta\ln L = -4508.53$ is greater than the critical value with $df = 4$ (Table 3). M0 was rejected when compared to M3 ($P < 0.01$), which is consistent with variation in selection pressure among sites. All the three models that allow for the presence of positive selection sites, i.e. M2a (positive selection), M3 (discrete) and M8 (beta & ω) failed to detect the presence of such sites in *Ctenomys* (Table 3). Only one site was identified as positively selected (199 T) in the

Chaetodipus intermedius sequence, but the posterior probability (BEB and NEB) for this case was lower than 95%.

Allowing for the presence of positively selected sites (with $\omega > 1$) significantly improves the fit of some models. The comparison of models M1a and M2a can be considered a test of the null hypothesis of neutral evolution versus the alternate hypothesis that some sites are also under negative selection ($\omega < 1$) and some under positive selection ($\omega > 1$). The neutral model (M1a) does not allow sites with $\omega > 1$, while the positive selection model (M2a) adds an additional site class, with the ω ratio estimated to be 3.866. The log-likelihood improvement was low ($2\Delta\ln L = 4547.98$) and hence not a better fit than M1a ($P > 0.01$). Comparison between M7 (beta) and M8 (beta and ω) produced similar results. Most of *Mc1r* domains showed variable ω ratio among sites (Table 4). We observed a signal of positive selection in transmembrane 4 (TM4) and extracellular loop 3 (EL3), where model M2 (selection) was a significantly better fit ($P < 0.01$) for the data than M1 (neutral). Comparison between M7 (beta) and M8 (beta and ω) in TM4 produced a similar result.

We next used the branch-site models A and D to detect possible heterogeneity of selective constraint between two rodent clades (Clade 1: ctenomyids, Clade 2: other rodents). Model A was not significantly better model than M1a ($P < 0.01$) in either clade, consistent with purifying selection. In addition, the low estimated ω value ($\omega=0.1956$) and no significant difference between models A and A0 ($P > 0.01$) suggests that relaxed selection is a likely explanation for high ω values.

DISCUSSION

Coat-colour variation and *Mc1r*

Comparisons among both closely and distantly related taxa suggest *Mc1r* has not played a major role in producing the dramatic pigmentation differences observed across species of tuco-tucos. In several interspecific comparisons, taxa with differing coat colours had identical *Mc1r* sequences. In addition, a preliminary analysis indicated intraspecific variability is also not associated with coat-colour variation found by Gonçalves & Freitas (2009) for southern Brazilian populations of *C. torquatus*. Thus, in these cases, a role for mutations in the *Mc1r* coding region in pigment diversity clearly can be ruled out.

In other comparisons, however, conclusions are more difficult to make. For example, several species have unique amino-acid mutations, although most are conservative changes (e.g. similar amino acid size, polarity and/or charge) and none overlap with those previously shown to affect coat-colour. However, any conclusions linking those mutations to colour differences require additional data, like functional assays to measure *Mc1r* signaling potential and/or ligand binding. Even these cell-based functional assays may be difficult to interpret because of possible epistatic interactions with other pigmentation loci (e.g. *Agouti*) (Mundy & Kelly, 2003) and *Mc1r* may have different effects on pigment-switching in different regions of the body.

In the present study, we also had focused on the convergent evolution of cryptic phenotypes that likely confer the same ecological function (Nevo, 1979). We first hypothesized

a genetic convergence in *Mc1r* in *C. australis* and *C. flamarioni*, since other studies had shown that similar blanched phenotypes can be produced by different mutations in the same gene (e.g. sand lizard species and beach mice, Rosenblum *et al.*, [2010] and Hoekstra *et al.*, [2006], respectively). Surprisingly, our data indicated that there was no convergence at mutational level in the *Mc1r* coding region associated with such cryptic pattern identified in these species. This result differs from previous work, which suggests that *Mc1r* is a “hotspot” for evolutionary change, and hence an emerging model for understanding convergence at the mechanistic level (Manceau *et al.*, 2010).

The majority of *Mc1r* variants previously described in mammals are either loss-of-function mutants associated with only yellow/red hair (e.g. mice, horses, black bears, dogs) or gain-of-function mutants with completely melanic hair (e.g. fox, jaguar and jaguarundi, gray squirrel, cattle, pig, sheep). Among the tuco-tuco species studied here, we hypothesized the pale *C. australis* may have a loss-of-function mutation(s), and melanic forms of *C. torquatus* and *C. rionegrensis* have a gain-of-function mutation(s), but in neither case are the unique mutations in these lineages associated with changes in coat colour. Importantly, however, such gross changes in *Mc1r* function caused by complete loss- or gain-of-function mutation do not easily allow for the simple control of the spatial distribution of hair colour as observed in some species of tuco tucos (see below).

However, several studies also have demonstrated that *Mc1r* was not responsible for pigmentation phenotypes. For example, in pocket gophers (*Thomomys bottae*) there was no consistent association between replacement polymorphisms and coat-colour, suggesting that *Mc1r* is not a major determinant of variation within this species (Wlasiuk & Nachman, 2007). In the same way, association between *Mc1r* coding region and differences in eumelanin and

pheomelanin in some species of primate (Mundy & Kelly, 2003) and cetartiodactyls (Ayoub *et al.*, 2009) and lizards or snakes (Rosenblum *et al.*, 2004) was ruled out. We also hypothesized an amino acid change and/or an in frame indel in *Mc1r* sequence of melanic forms of tuco-tucos (*C. torquatus* and *C. rionegrensis*). However, similar to other studies such as Kingsley *et al.* (2009), we observed that *Mc1r* amino acid changes are not responsible for melanism in tuco-tucos. However, changes in the regulatory regions of *Mc1r* may be involved, or alternatively, other loci may contribute to this conspicuous pattern of colouration, such as the *Agouti* gene (Kingsley *et al.* 2009).

Thus, a central question becomes: why is structural variation in *Mc1r* not involved in color variation in tuco-tucos? In many of the species in which *Mc1r* has been implicated in colour variation differences are relatively discrete rather than continuous. For example, in black bears, *Mc1r* mutations are associated with a blonde or “ghost” morph, and intermediates have not been observed. Similarly, of 200 pocket mice captured on and adjacent to lava flows in Arizona, all were easily categorized as light or dark, although some minor variation within the classes is also evident (Hoekstra *et al.*, 2004). In such cases, *Mc1r* alleles seem to have a large effect, and therefore phenotypic variants segregate roughly as Mendelian traits. In other situations, however, *Mc1r* mutations explain a smaller amount of phenotypic variation, and the observed colour variation is more quantitative. For example, in beach mice, *Mc1r* mutations account for 10–36% (depending on trait) of the variation in pigmentation (Hoekstra *et al.*, 2006). Studies on coat-colour in tuco-tucos suggest that they can be easily classified into discrete groups (as done here) in most cases, however, there is more colour variation than can be explained by a single locus, perhaps due to more subtle differences in environmental variation (Freitas & Lessa 1984; Gonçalves & Freitas, 2009; Reig *et al.*, 1990; Wlasiuk *et al.*,

2003). Thus, *Mc1r* mutations of large effect may not be tolerated in environments where selection is favoring incremental differences.

In addition to testing for associations with *Mc1r* structure, we also tested for an association between *Mc1r* expression level and coat-colour phenotype. First, we did not find significant variation in *Mc1r* expression across different colour phenotypes. While a few studies have investigated *Mc1r* expression level in natural populations (e.g. Kingsley *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2007), they have similar results: none have found a difference in transcript abundance between pale and dark morphs. We did, however, find a marked difference among the dorsal, flank and ventral regions within both pale and brown morphs. The coat colour along the body of tuco-tucos typically has a continuous pattern; dorsal is darker, flank is paler and ventral is almost white (in all phenotypes, except the melanic form). Thus, reduction in the abundance of transcripts from dorsal to ventral may be explained by (or associated with) a gradient of *Mc1r* expression. This result is also consistent with our finding that in the melanic form of *C. torquatus* (including a melanic ventrum) we found no significant difference in *Mc1r* expression among body regions. However, such association does not necessarily mean that *Mc1r* itself was modified to produce the genetic change, i.e. changes in a gene expression pattern may also be the result of regulatory changes in upstream regulators of *Mc1r* (Protas & Patel, 2008) or explained by differences in the spatial distribution of melanocytes. Thus, further studies are required to determine what role, if any, *Mc1r* plays in producing variation across body regions.

A long-standing question in evolutionary biology is whether genes identified originally from laboratory mutations (such as *Mc1r*), most of which are of large effect, will also contribute to adaptive evolution in nature (e.g. Palopoli & Patel, 1996). The results presented here suggest

that *Mc1r* mutations of large effect have not contributed to adaptive differences among species of tuco-tucos. However, the continuous variation in coat colour in tuco-tucos suggests that this trait might have a more complex or even polygenic basis. Finding the genes underlying this variation will likely be a more daunting task, requiring mapping and association studies involving more markers and defined populations.

Evolution of the *Mc1r* coding region

The *Mc1r* coding region exhibited high GC content at third codon positions, which is consistent with codon-usage bias. Similar findings have been reported for other genomic regions of high GC content, and interpreted to derive either from biased mutation pressure or from selection favoring a high GC proportion or particular codons (Li, 1997). The pattern observed in *Mc1r* in *Ctenomys* is difficult to reconcile with a strictly mutationalist scenario, since the GC content at third codon position is approximately 40% higher than that observed in surrounding small non-coding genomic areas sequenced.

The high number of variable sites and the low rate of homoplasy resulted in a well-resolved phylogeny reconstructed for the 21 species of tuco-tucos using *Mc1r* sequences, recovering major groups previously identified, specifically *Mendocinus*, *Torquatus* and *Bolivien-matogrossense* (Castillo *et al.*, 2005; Cook & Lessa, 1998; D'Elia *et al.*, 1999; Lessa & Cook, 1998; Parada *et al.*, 2011; Slamovits *et al.*, 2001). Although some internal relationships and conflicted position of species such as *C. haigi* and *C. leucodon* were not resolved, our results indicated that this nuclear marker has potential to be a useful marker in phylogenetic studies.

Selection on *Mc1r*

Our analysis of *Ctenomys* suggests that purifying selection has been the predominant mode of selection acting in *Mc1r* evolution, although there is evidence for relaxation in functional constrain at some sites/regions. The high divergence observed in *C. leucodon* (15 amino acid replacements) could indicate a potential acceleration in the rate of substitution along this lineage, although there is no conspicuous difference in its coat colour (which is a typical brown). Surprisingly, the strength of selection has been constant through evolutionary time in *Ctenomys*. There was, however, an increase in the rate of dN/dS in *C. leucodon* in relation to all other species of tuco-tucos (Gonçalves, 2011). We considered that a phylogenetic signal effect might be involved in the higher ratio of dN/dS , since the position of *C. leucodon* in Ctenomyidae is not well resolved and such species has even been considered a member of a different genus (*Haptomys*; Osgood, 1946), although never recognized as such.

When we examined domain-specific rates of *Mc1r* evolution, we found a pattern of variation in ω among sites. We first considered possible substitution-rate variation specifically in transmembrane domains, since more replacements were observed in such regions than other domains in *Ctenomys*. Our findings indicated that the fourth transmembrane domain (TM4) and the third extracellular loop (EL3) have more variable rate of ω (i.e. potential selection acting on some sites could be involved), especially in TM4 compared to other domains. Alternatively, such variation might be due to a relaxation of function constraints in these regions. We did not find evidence of positive selection on the *Mc1r*, using an analysis in which dN/dS ratios varied either among lineages or among sites. This finding is consistent with several other studies on mammals that found no evidence of global selection in *Mc1r* (e.g.

cetartiodactyls, Ayoub *et al.*, 2009; primates, Mundy & Kelly, 2003; mustelids, Hosoda *et al.*, 2005).

As discussed above, the power to detect positive selection on *Mc1r* as a whole is likely to be low, as there are many examples in which a single amino acid substitution in *Mc1r* leads to a large change in coat-colour. These selection tests require many repeated substitutions among lineages. Alternatively, directional selection on *Ctenomys* coat colour may have occurred in relatively short bursts followed by long periods of purifying selection, leading to a low signal in the gene(s) involved. However, the lack of positive selection acting on *Mc1r* is also consistent with the lack of evidence for *Mc1r* contributing to adaptive colouration in tuco-tucos.

In conclusion, this work was an evaluation of the potential genetic underpinnings responsible for the tremendous coat-colour diversity observed among tuco-tucos. Although *Mc1r* is an excellent candidate locus, given its role in generating colour diversity among a wide range of vertebrates, nonetheless we found no simple associations between *Mc1r* amino acid variation and overall coat-colour phenotype. This is consistent with our lack of evidence for selection acting on *Mc1r* in ctenomids. Future studies will focus on a more careful analysis of additional candidate genes, such as the *Agouti* locus among others, and test for associations in both protein structure and gene expression.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Enrique P. Lessa (Universidad de la Republica), Matias S. Mora (Universidad de Mar del Plata), Patrícia Mirol (Universidad de Buenos Aires) and Eileen A.

Lacey (Museum of Vertebrate Zoology, University of California at Berkeley) for kindly provide *Ctenomys* samples. Gilson R. P. Moreira (UFRGS) and two anonymous reviewers made significant suggestions on the manuscript. This research was funded by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the National Science Foundation (NSF, DEB-0919190). GLG received a doctoral fellowship from CNPq (141604/2007-7).

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman D. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J. 2009.** Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) in Cetartiodactyla. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 550–557
- Blanga-Kanfi S, Miranda H, Penn O, Pupko T, DeBry RW, Huchon D. 2009.** Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evolutionary Biology* 9: 71.
- Busch C, Antinuchi CD, Valle CJ, Kittle MJ, Malizia AI, Vassalo AI, Zenuto R. 2000.** Population ecology of subterranean rodents. In: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN, eds. *Life underground: The Biology of Subterranean Rodents*. Chicago: University of Chicago Press, 183-226.

- Castillo AH, Cortinas MN, Lessa EP. 2005.** Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86: 170–179.
- Cook JA, Lessa EP. 1998.** Are rates of diversification in subterranean South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52: 1521–1527.
- D’Elia G, Lessa EP, Cook JA. 1999.** Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 19–38.
- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O’Brien SJ. 2003.** Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology* 13: 448–453.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007.** Bottlenecks and dispersal in the tuco-tucos das-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88: 935–945.
- Freitas TRO, Lessa EP. 1984.** Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 65: 637–642.
- Freitas TRO. 1995.** Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 55-59.
- Gonçalves GL, Freitas TRO. 2009.** Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90: 1020-1031.

Gonçalves GL. 2011. Evolução dos fenótipos pigmentação e estrutura do pelo em roedores: uma abordagem dos genes *Mc1r* e *Edar*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. PhD dissertation, 189p.

Hoekstra HE. 2006 Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97: 222–234.

Hoekstra HE, Drumm KE, Nachman MW. 2004. Ecological genetics of adaptive color polymorphism in pocket mice: geographic variation in selected and neutral genes. *Evolution* 58: 1329–1341.

Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP. 2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse colour pattern. *Science* 313: 101–104.

Hofreiter M, Schöneberg T. 2010. The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 2591-2603.

Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL, Suzuki H. 2005. Independent nonframeshift deletions in the *Mc1r* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *Journal of Heredity* 96: 607–613.

Hubbard JK, Uy JA, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26: 231–239.

Jackson IJ, Budd P, Horn JM, Johnson R, Raymond S, Steel K. 1994. Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. *Pigment Cell Research* 7: 73–80.

Jackson IJ. 1997. Homologous pigmentation mutations in human, mouse, and other model organisms. *Human Molecular Genetics* 6: 1613–1624.

- Kijas JMH, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L. 1998.** Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat colour in pigs. *Genetics* 150: 1177–1185.
- Kingsley EP, Manceau M, Wiley CD, Hoekstra HE. 2009.** Melanism in *Peromyscus* is caused by independent mutations in agouti. *PLoS ONE* 4: e6435.
- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. 1995.** The role of the melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat colour determination. *Mammalian Genome* 6: 636–639.
- Lacey EA, Patton JL, Cameron GN. 2000.** *Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Langguth A, Abella A. 1970.** Sobre una poblacion de tuco-tucos melánicos (Rodentia- Octodontidae). *Acta Zoologica Lilloana*, 27:101-108.
- Lessa EP, Cook JA. 1998.** The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 88–99.
- Li WH. 1997.** *Molecular Evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Maddison DR, Maddison WP. 2000.** *MacClade4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.03*. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HE. 2010.** Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 2439-2450.

- Marklund L, Moller KJ, Sandberg K, Andersson L. 1996.** A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome* 7: 895–899.
- McRobie H, Thomas A, Kelly J. 2009.** The genetic basis of melanism in the gray squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Journal of Heredity* 100: 709–714.
- Mora M, Olivares AI, Vassallo AI. 2003.** Size, shape and structural versatility of the skull of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): functional and morphological analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 85–96.
- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI. 2006.** Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87: 1192-1203.
- Mundy NI, Kelly J. 2003.** Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *American Journal of Physical Anthropology* 121: 67–80.
- Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL. 2003.** The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 5268–5273.
- Nevo E. 1979.** Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 269-308.
- Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ, Barsh GS. 2000.** Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mammalian Genome* 11: 24–30.

Osgood WH. 1946. A new octodont rodent from the Paraguayan Chaco. *Fieldiana Zoology* 31: 47–49.

Palopoli MF, Patel NH. 1996. Neo-Darwinian developmental evolution: can we bridge the gap between pattern and process? *Current Opinion in Genetics and Development* 6: 502–508.

Parada A, D'Elía G, Bidau CJ, Lessa EP. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92: 671-682.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Protas ME, Patel NH. 2008. Evolution of colouration patterns. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 425–446.

Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology and speciation in *Ctenomys*. In: Nevo E, Reig OA, eds. *Biology of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. New York: Alan R Liss Inc, 71-96.

Ritland K, Newton C, Marshall HD. 2001. Inheritance and population structure of the white-phased “Kermode” black bear. *Current Biology* 11: 1468–1472.

Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72: 827–834.

- Rosenblum EB, Hoekstra HE, Nachman MN. 2004.** Adaptive reptile color variation and the evolution of the MC1R gene. *Evolution* 58: 1794-1808.
- Rosenblum EB, Römpler H, Schöneberg T, Hoekstra HE. 2010.** Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at white sands. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 2113–2117.
- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP, Rossi MS. 2001.** Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia—Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1708–1719.
- Steiner CC, Weber JN, Hoekstra HE. 2007.** Adaptive variation in beach mice produced by two interacting pigmentation genes. *PLoS Biology* 5: 1880–1889.
- Swofford DL. 2002.** *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4.* Sunderland: Sinauer Associates.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Våge DI, Lu D, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S, Cone RD. 1997.** A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nature Genetics* 15: 311–315.
- Våge DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. 1999.** Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat colour in sheep. *Mammalian Genome* 10: 39–43.

- Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP. 2003.** Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57: 913–926.
- Wlasiuk G, Nachman MW. 2007.** The genetics of adaptive coat color in gophers: coding variation at *Mcl1r* is not responsible for dorsal color differences. *Journal of Heredity* 98: 567-574.
- Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AM. 2000.** Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155: 431–449.
- Yang Z, Nielsen R. 1998.** Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 46: 409-418.
- Yang Z. 1997.** PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in the Biosciences* 13: 555–556.
- Yang Z. 1998.** Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Molecular Biology and Evolution* 15: 568-573.
- Yang Z. 2007.** PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591.

List of tables

Table 2-1. List of *Ctenomys* used in this study.

Species	N	Phylo Group*	Coat-color	Habitat	Genbank Acession Number	
					<i>Mc1r</i>	<i>Cyt-b</i>
<i>C. australis</i>	4	mendocinus	pale	Costal sand dunes	JF910108	AF370697
<i>C. boliviensis</i>	1	boliviensis	brown	Forest meadows	JF910109	AF155869
<i>C. chasiquensis</i>	3	mendocinus	brown	Pampa grassland	JF910110	JN791407
<i>C. dorbygni</i>	1	torquatus	brown	Pampa grassland	JF910111	AF144279
<i>C. flamarioni</i>	5	mendocinus	pale	Costal sand dunes	JF910112	AF119107
<i>C. haigi</i>	1	magellanicus	brown	Steppe grassland	JF910113	GU433046
<i>C. lami</i>	5	torquatus	brown	Sand fields	JF910114	HM777477
<i>C. leucodon</i>	1	no group	brown	Altiplano grassland	JF910115	AF007056
<i>C. maulinus</i>	1	no group	brown	Steppe grassland	JF910116	AF370703
<i>C. mendocinus</i>	1	mendocinus	brown	Pampa grassland	JF910117	AF007062
<i>C. minutus</i>	5	torquatus	brown	/Forest meadows Sand fields/Costal sand dunes	JF910118	HM777482
<i>C. nattereri</i>	1	boliviensis	brown	Forest meadows	JF910119	AF144298
<i>C. pearsoni</i>	3	torquatus	brown	Pampa grassland	JF910120	HM777486
<i>C. perrensi</i>	1	torquatus	brown	Pampa grassland	JF910121	AF500067
<i>C. porteousi</i>	3	mendocinus	brown	Pampa grassland	JF910122	AF370681
<i>C. rionegrensis</i>	4	mendocinus	brown; melanic	Inland sand dunes	JF910123	AF119114
<i>C. roigi</i>	1	torquatus	brown	Pampa grassland	JF910124	AF144278
<i>C. sociabilis</i>	1	no group	brown	Steppe grassland	JF910125	EU035177
<i>C. steinbachi</i>	1	boliviensis	brown	Forest meadows	JF910126	JN791406
<i>C. talarum</i>	3	talarum	brown	Sand fields	JF910127	HM777498
<i>C. torquatus</i>	31	torquatus	brown; brown with white spots; dark-brown; melanic	Pampa grassland	JF910128	EF372287

Table 2-3. Estimated parameters on diverse models of codon substitution considering the Mc1r in ctenomyid and other rodent families; ω , dN/dS ratio; p , proportion of codons in each ω class; M0-M3: χ^2 df=4; M1a-M2a: χ^2 df=2; M7-M8: χ^2 df=2.

Model	dN/dS	Estimates of parameters	l	P -value	Positively selected sites ^c
M0: one-ratio	0.1170	$\omega = 0.1170$	-4592.69	<0.01	None
M3: discrete	0.1346	$p_0 = 0.4385, p_1 = 0.4246, (p_2 = 0.1368)$ $\omega_0 = 0, \omega_1 = 0.1482, \omega_2 = 0.5236$	-4508.53		None
M1a: neutral	0.1956	$p_0 = 0.8730, (p_1 = 0.1269)$ $(\omega_0 = 0.0786), (\omega_1 = 1)$	-4547.98	>0.01	Not allowed
M2a: selection	0.1956	$p_0 = 0.8730, p_1 = 0.1269 (p_2 = 0.0000)$ $(\omega_0 = 0.078), (\omega_1 = 0), \omega_2 = 3.8663$	-4547.98		None
M7: beta	0.1350	$p = 0.3477, q = 2.1587$	-4510.89		Not allowed
M8: beta& ω	0.1361	$p_0 = 0.9974 (p_1 = 0.00257)$ $p = 0.3564, q = 0.2785, \omega = 1.9134$	-4510.26	>0.01	199T

Table 2-4. Likelihood ratio test between models of codon substitution without selection (M0, M1, M7) and with selection or relaxation of functional constrains (M3, M2 and M8) for each of the 15 domains of Mc1r protein in 56 rodent species. Asterisks indicate level of significance, where $*P < 0.01$, $**P < 0.001$; M0 vs M3: χ^2 df=4; M1a vs. M2a: χ^2 df=2; M7 vs. M8: χ^2 df=2.

Domain	Model of substitution comparison		
	M0 vs. M3	M1 vs. M2	M7 vs. M8
ED1	M3**	M1	M7
ED2	M3**	M1	M7
ED3	M3**	M2*	M7
ED4	M3**	M1	M7
TM1	M3**	M1	M7
TM2	M3**	M1	M7
TM3	M3**	M1	M7
TM4	M3**	M2**	M8**
TM5	M3**	M1	M7
TM6	M3**	M1	M7
TM7	M0	M1	M7
ID1	M3**	M1	M7
ID2	M3**	M1	M7
ID3	M3**	M1	M7
ID4	M3**	M1	M7

List of Figures



Figure 2-1. Convergent pelage coloration and local habitat of ctenomyids. 1 (*C. flamarioni*) and 2 (*C. australis*) are light forms; A and B represent Atlantic coastal dunes habitat; 3 (*C. porteousi*) and 4 (*C. minutus*) are dark phenotypes; C and D represent Pampa grasslands habitat.

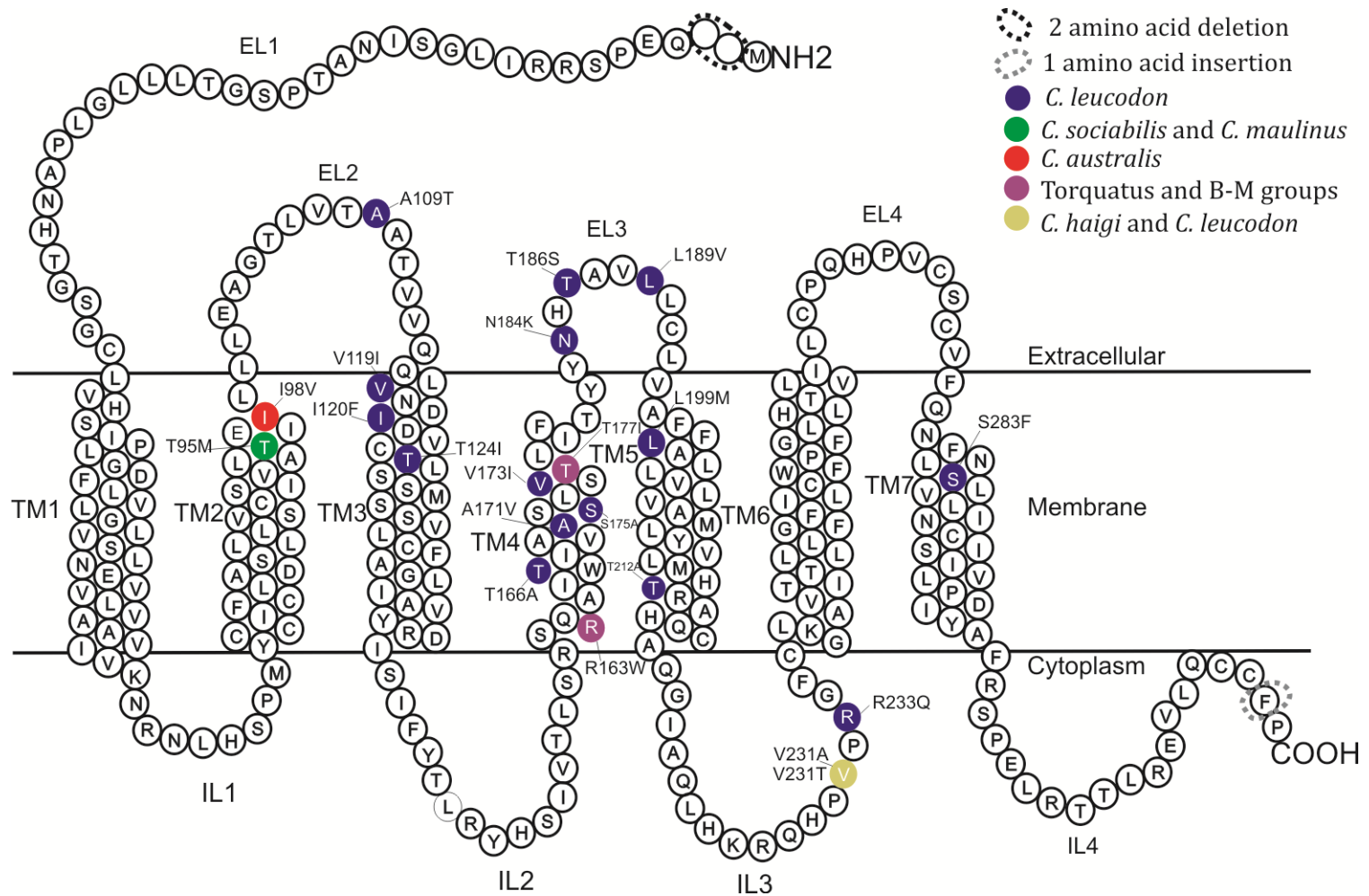


Figure 2-2. Two-dimensional structure of the deduced *Ctenomys* Mc1r protein sequence. The 20 amino acid changes observed are represented by colors and site position. Domains: EL, extracellular regions; TM, transmembrane domains; IL, intracellular loops.

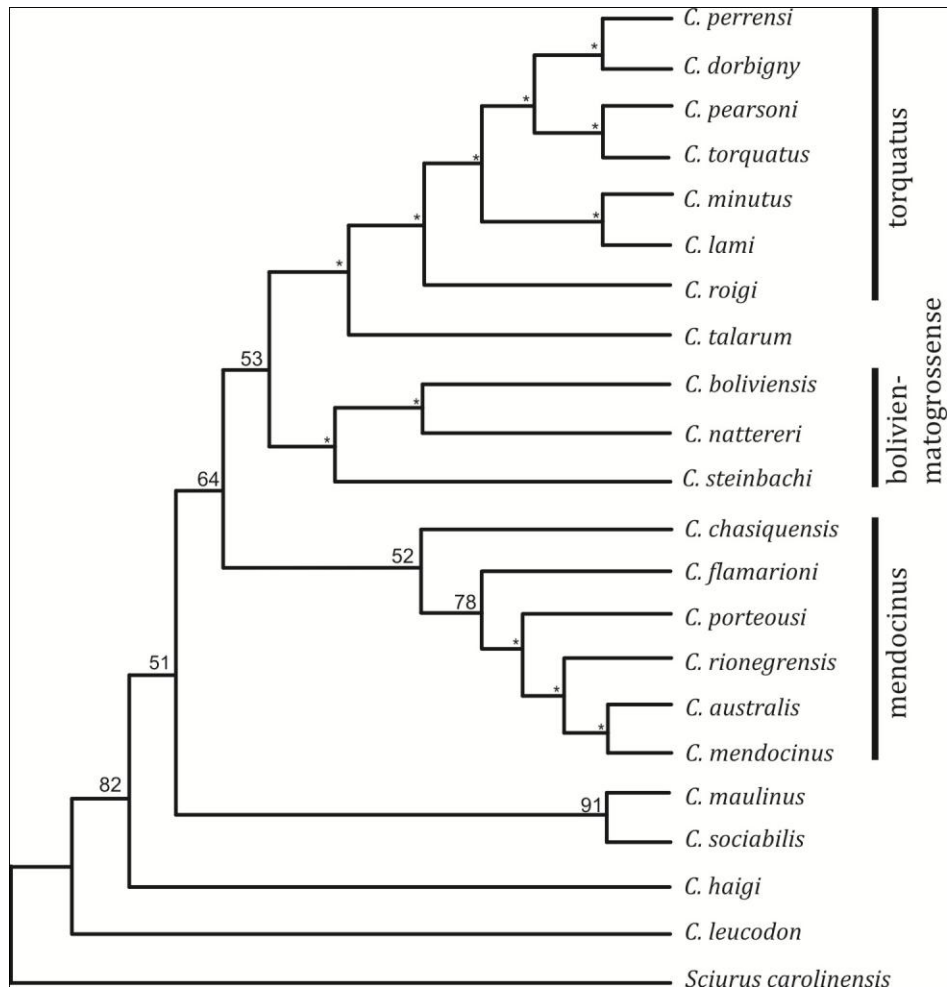


Figure 2-3. Maximum likelihood tree constructed for 21 species of *Ctenomys* based on 1250bp of *Mc1r* using the HKY+G substitution model. Numbers above branches represent bootstrap support. Asterisks indicate values below 50%. Major phylogenetic groups recovered (Mendocinus, Bolivien-matogrossense, Torquatus) are consistent with Parada *et al.* (2011).

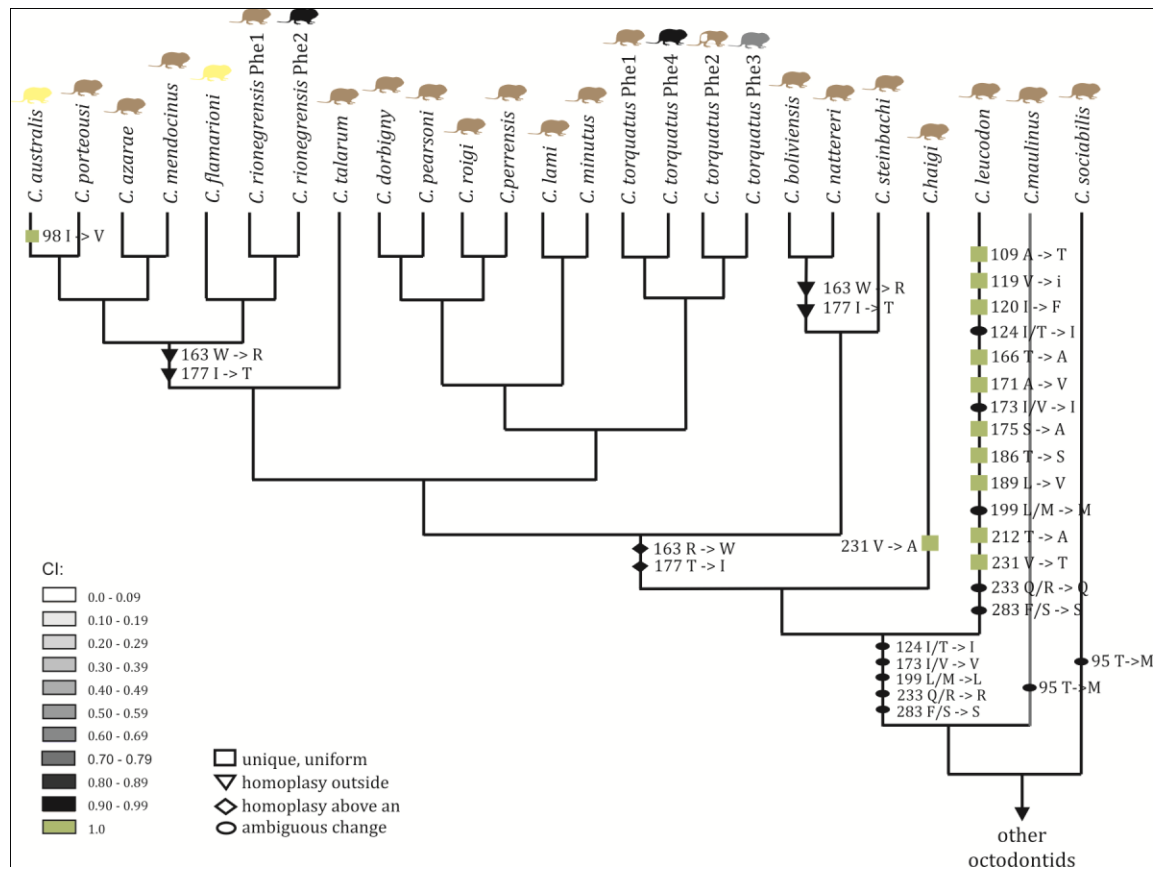


Figure 2-4. Evolution of the *Mc1r* gene in 21 ctenomyid species. Amino acid substitutions were mapped on a phylogenetic tree constructed with the maximum likelihood method from cytochrome *b* gene data. Colors refer to the confidence index of each replacement. Representative coat colors for each species are depicted above taxa.

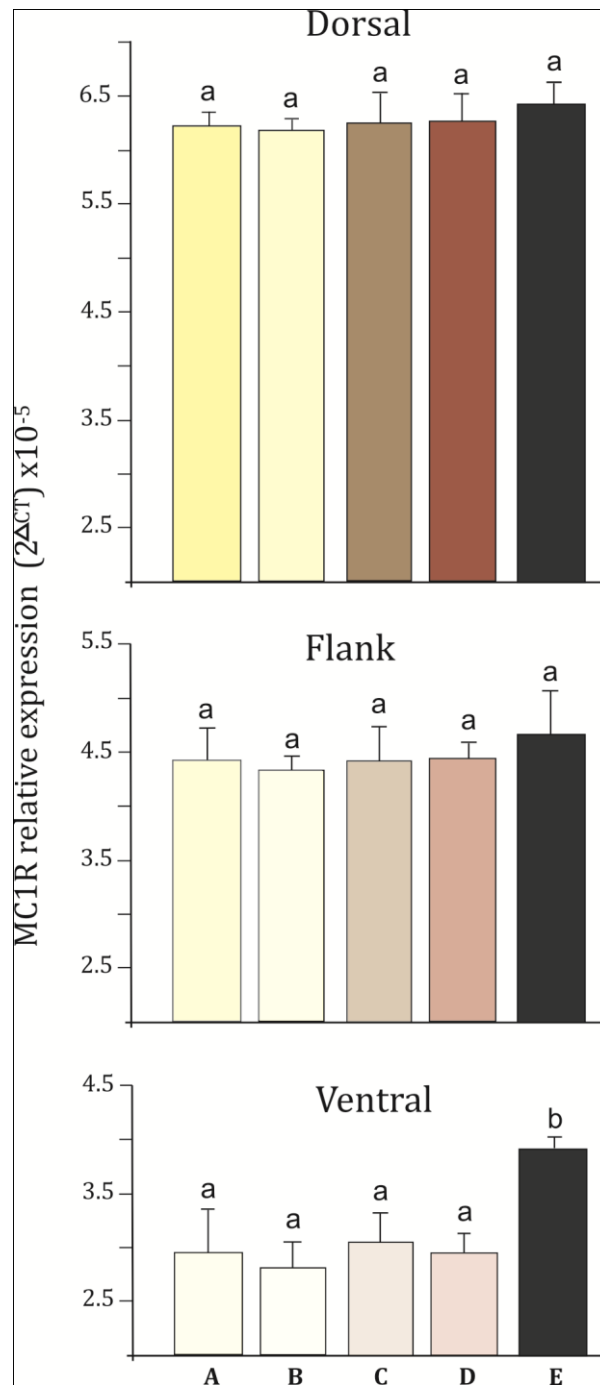


Figure 2-5. *Mc1r* expression in three classes of phenotypes in *Ctenomys*: light (*C. australis/C. flamarioni*), dark (*C. minutus/C. torquatus*) and melanic (*C. torquatus*). Relative expression of *Mc1r* transcripts in dorsal, flank and ventral skin was measured by quantitative qPCR and standardized with β -actin. Distinct non-capital letters above bars indicate statistical significance among species, within a given body region.

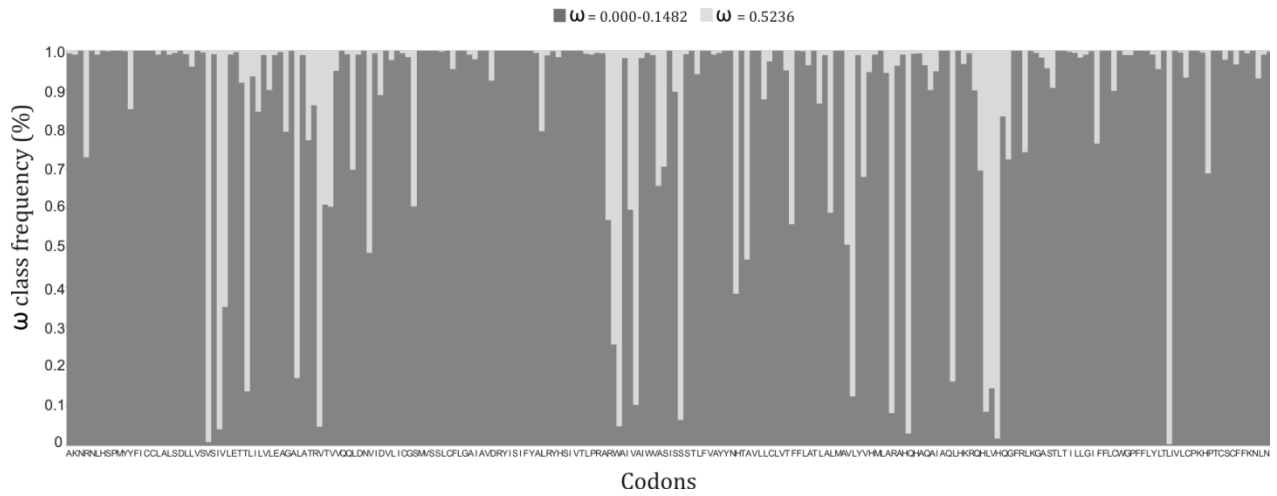


Figure 2-6. Analysis of the Naive Empirical Bayes (NEB) posterior probability under the model M3, from each codon of *Mc1r* in ctenomyids and other rodent families.

CAPÍTULO 3

PATTERNS AND RATES OF EVOLUTION IN THE PIGMENTATION GENE *Mc1R* IN MAMMALS: DO RODENTS
HAVE INCREASED ACCELERATION?

Gislene L. Gonçalves, Vanessa R. Paixão-Côrtés & Thales R. O. Freitas

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9.500, Porto Alegre, RS
91501-970, Brazil

Artigo em preparação: *BMC Evolutionary biology*

Abstract

Background. The melanocortin-1 receptor (*Mc1r*) is a key locus in the melanogenesis pathway, demonstrating low pleiotropic effect and highly conserved function. Contrasting selection patterns were verified in *Mc1r* across mammals, and differences in substitution rates are unknown for this group. In this study, we investigate patterns and rates of evolution, as well as selective pressures, on the whole *Mc1r* protein and also in separate domains, under a contrasting phylogenetic context, using metatherian and eutherian mammal species.

Results. Amino acid variation was abundant throughout the *Mc1r* gene, where only 77 conserved residues were identified. Most of substitutions were observed in extracellular and transmembrane domains; intracellular segment was conserved across different species. *Mc1r* was characterized by high GC content, which corroborates with the codon usage bias observed. Rates of synonymous (dS) and nonsynonymous substitutions (dN) were unexpectedly high in relation to other nuclear genes, suggesting that *Mc1r* has a fast evolved course. Also, pairwise dN varied significantly in different domains among several lineages of mammals. In particular, variation was not associated with phylogenetic depth for most of the domains, and comparisons among orders did not show a pattern of acceleration in rodent evolution. Clade model results indicated no variation in ω between rodent and all other mammals, even though the phylogenetic tree

evidenced a wider branch length in such group. Although likelihood phylogeny-based analysis suggest that purifying selection has mostly shaped the evolutionary trajectory of *Mc1r*, a high proportion of sites (18%) were under relaxation of functional constraint, and three sites (25, 37 and 265) clearly evolved under positive selection.

Conclusions. Our data indicate potential lineage-specific changes in functional constraint or episodic of adaptive evolution in *Mc1r*, where rodents do not show a conspicuous pattern of increased acceleration rate comparative to other mammals. Additionally, we demonstrated that purifying selection is not the only evolutionary force that has shaped the *Mc1r* in mammals, as a significant number of codons have evolved under relaxation of functional constraints, and a few positively selected. We thus conclude that selection is potentially the main driving force behind the molecular variation observed, but organismal-level factors might influence differences in a fine-scale pattern as well.

Background

The melanocortin-1 receptor (*Mc1r*) is a member of the G protein-coupled superfamily that acts as a pigmentary switch in the production of melanin in mammals. When activated by α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) it signals via cAMP the production of eumelanin (black/brown pigment); in the absence or inhibition, pheomelanin (red/yellow pigment) is synthesized (Jackson, 1994). In mice, dominant mutations that disable binding of α -MSH lead to constitutive activity (constant signaling of eumelanin synthesis) and predominantly black coat color (Jackson, 1997). Recessive loss-of-function mutations results in production of pheomelanin, rather than eumelanin, and predominantly yellow or red coat color (Robbins et al. 1993). Both types of phenotypic changes have been linked to missense mutations in *Mc1r* of domestic and wild mammals (Eizirik et al., 2003; Hoekstra et al., 2006; Kijas et al., 1998; Klungland et al., 1995; Marklund et al., 1996; McRobie et al., 2009; Mundy & Kelly, 2003; Nachman et al., 2003; Newton et al., 2000; Ritland et al., 2001; Våge et al., 1997; Våge et al., 1999).

Evidence across a range of different vertebrate groups suggests that the *Mc1r* coding region has evolved under a variety of contrasting selective regimes. For example, in geese and skuas colour differences associated with contrasting *Mc1r* alleles are involved in assortative mating (Mundy et al., 2004), which is an example of diversifying sexual selection. Other organisms are highly conservative in the pigmentation phenotype, suggesting a strong role for purifying selection in restricting amino acid changes (Harding et al., 2000; MacDougall-Schackleton et al., 2003). In some cases, the gene has evolved under relaxed functional constraints (Rana et al., 1999) and positive selection (Savage et

al., 2008), particularly in non-African human populations (Harding et al., 2000). Additionally, intraspecific studies in natural populations suggest that *Mc1r* may be a target of positive selection; it underlies adaptive melanism in rock pocket mice (*Chaetodipus intermedius*; Nachman et al., 2003) and adaptive light coat color in beach mice (*Peromyscus polionotus*; Hoekstra et al., 2006). Despite of evidence that *Mc1r* controls many cases of intraspecific pigment polymorphism, little is known about its pattern and rate of evolution among mammal species. Large-scale studies on cetartiodactyls and primates showed that this gene has been under strong purifying selection evolution (Ayoub et al., 2009; Mundy & Kelly, 2003). However, interspecific variation in *Mc1r* needs to be examined and compared in different phylogenetic levels to determine if the patterns found for such groups hold for all mammals.

Analysis of DNA sequence from nuclear genes in several orders indicates that no global molecular clock (i.e. same rate along all evolutionary lineages) exists in Mammalia (Graur & Li, 2000). Significant variations in rates of nucleotide substitution have been found in different orders, where rodents seem to evolve faster than artiodactyls, which in turn evolve faster than primates, due to a generation time effect (Laird et al., 1969; Kohne, 1970). However, rates of substitutions may also vary among evolutionary lineages according to differences in selection intensities (Graur & Li, 2000). For example, in large populations a greater proportion of mutations may be affected by purifying selection. This will result in decrease in the rate of substitution (e.g. Ohta, 1995). Alternatively, one species may be subjected to stronger purifying selection constraint than others, and in this case will evolve at a lower rate.

Thus, in this study we test whether variation in *Mc1r* gene among mammal lineages is due to differences in selective pressures. We present an evolutionary comparative analysis of *Mc1r* sequences of nine mammalian orders, with concentration on rodents. Our main goals were: (1) to estimate levels of conservation and variability in different domains of the *Mc1r*, (2) to characterize rates and pattern of evolution in mammalian lineages and (3) to test for signatures of selection in the evolutionary history of such gene in mammals.

Results

***Mc1r*: evolutionary patterns**

Vertebrate scenario

Amino acid variation across mammals was abundant throughout the *Mc1r* gene (Fig. 3-1). In general, only a few short continuous completely conserved segments were found (less than 10 residues). These included 45 residues that were identical across vertebrates, which were mostly concentrated in the first and fourth intracellular domain (ID1 and ID4) (Table 3-1; Fig. 3-1). Most of the variation was observed in the first and second extracellular domains (ED1 and ED2), and also in ID3 and TM4 (Fig.3-1). ED1 was particularly variable, including multiples amino acid replacements and five insertion/deletion (indel) events among mammals: a two-amino acid deletion in mouse (*Mus* spp.) and tuco-tucos (*Ctenomys* spp.), three-amino acid deletion in squirrel (*Sciurus carolinensis*), seven-amino acid deletion in pocket gophers (*Thomomys bottae*) and a three

residue insertion in the pig (*Sus scrofa*) (Fig. 3-1). The polarity of these indels was inferred based on the mammal phylogeny proposed by Murphy et al. (2001). Moreover, two amino-acid deletions were observed in the ED1 of birds relative to mammals, reptiles and fishes, and no conservation of the amino acid level was observed among these three vertebrates groups for this portion of *Mc1r* (Fig.3-1; Table 3-1). When the 15 domains of the protein were divided into three categories (Extracellular [ED], transmembrane [TM] and intracellular [ID] domains), measures of variation among mammals, birds and fish were considered higher in the ED than in the TM or ID, particularly in ED1 and ED3 (Table 3-1). Heterogeneity in divergence estimates was observed within the ID and TM categories, with the lowest values obtained for ID1, ID4 and TM6 for the three classes of comparisons. Divergence estimated by p-distance were saturated in all levels of phylogenetic depth compared (mammal-birds, mammal-reptiles, mammal-fishes), except for TM3 and TM5 domains.

Vertebrate Mc1r GC Bias

Pattern of average GC content in birds, reptiles and fishes were similar to mammals (Table 3-2). However, when the third position was compared alone a higher value was evident for birds (94.3%), and a lower in fishes (74%), in relation to mammals (83%). Similar value was found for reptiles (87.1%) in relation to mammals. The mammal orders presented low average difference of GC content, but were highly different at third position (Table 3-2). Monotremes showed the highest value (95.2%), followed by cetartiodactyls (91%, which was biased by the pig, with 97.5%) and lagomorphs (90.8%). The lowest GC content was found in didelphimorphs (67.2%) and rodents (78.7%). The high proportion

of GC content at third position was correlated with the observation of strong bias in codon usage in vertebrates. Measures of Relative Synonymous Codon Usage (RSCU, Sharp et al., 1986) ranged from 0.02 for UUA (Leu) and 0.12 for CUA (Leu), the least used codons, to 2.52 for GCC (Ala) and 2.92 for CUG (Leu), the most used codons. All codons showing strong preferential usage ($RSCU \geq 2$) contained G or C at the third position, including the ones mentioned above and also CUC (Leu), AUC (Ile), GUG (Val), AGC (Ser).

Synonymous substitutions were almost homogeneous (data not shown); however, nonsynonymous rates varied significantly for different domains among several lineages (Fig. 3-2). Such difference produced similar results to those obtained in the mammal vs. others vertebrates for amino acid level comparison (Table 3-1). Most nonsynonymous variability was observed in the extracellular domains, particularly ED1 and ED3, whereas the highest conservation was seen in ID1 and ID4 (Table 3-1; Fig. 3-2).

Test for rodent accelerate bias

Overall, pairwise nonsynonymous differences varied significantly among comparisons of rodents and primates for half of the domains (Fig. 3-2). Contrary to expected, segments ED4, ID2, TM6 and TM7 showed no significant differences between rodents and primates. In some domains the pattern was reversed, where acceleration was observed in primates instead of rodents, particularly in ID4 and TM3 and partially in ED4 and TM1 (Fig. 3-2). We also observed a significant difference in dN rates inside rodents, where Ctenohystrica seems to be increasing the rate when compared to Mouse and Squirrel related clades, as observed in the phylogenetic tree and the ED1 and ID2 domains

(Fig. 3-3, 3-4). Significant acceleration in mouse lineage was observed in ED4, ID1, TM1 and TM4 domains. Squirrel related clade showed acceleration only in ID4 domain.

Considerable variation in rates and patterns of nucleotide substitutions was observed among lineages of mammals. An evident feature observed in the phylogeny reconstructed for mammals based on *Mc1r* sequences was the accelerated substitution rates in rodent lineage, verified by longer branch lengths (Fig. 3-5). The estimate of r_S and r_N for the entire coding region of *Mc1r* in rodents was 3.19 ± 1.44 and 0.98 ± 0.13 , respectively. We also analyzed in separated domains as extracellular (r_S : 3.38 ± 1.05 , r_N : 1.32 ± 0.33) transmembrane (r_S : 3.25 ± 0.09 , r_N : 0.91 ± 0.14) and intracellular (r_S : 3.61 ± 1.18 , r_N : 0.52 ± 0.16).

Relaxation of functional constrains in *Mc1r*

Phylogeny based maximum likelihood approaches provided evidence that negative selection and relaxation in functional constraints has predominantly acted on codons of the *Mc1r* gene in mammals (Table 3-3; Fig. 3-6). We detected significant ω heterogeneity across the entire *Mc1r* sequence. Comparing models that estimate ω with a beta distribution, the selection M8 (11 site classes), which allows $\omega > 1$, performed significantly better than the neutral model M7 (ten site classes), which restricts ω to the interval 0–1 ($P = 0.002$, Table 3), where 68% of the sites seems to evolve under purifying selection (ω range from 0.001 to 0.12), 30% under relaxation of functional constrain (ω range from 0.17 to 0.41) and 2% under positive selection ($\omega = 1$) Four codons (9H, 25K, 37R, 265 S) have likely evolved under positive selection, three of them (25 K, 37 R and

265 S) with posterior probability > 0.95 (Table 3-3; Fig. 3-6). Selection models did not perform significantly better than discrete model (M3) when analyzing domains separately for mostly segments, except for TM4 and TM6 (Table 3-3). In particular, ID4 was the only segment in which we observed no differences in ω across all samples, where neutral model M0 was most likely. All other segments showed differences in dN/dS ratio and some of them also relaxation in a few percentages of sites (Table 3-3; Fig. 3-6). The clade model C used to infer differences in dN/dS ratio between rodents lineage and other mammals was not significant better ($P = 1$) than the neutral model M1a. Additionally, no significant variation was detected among the three site classes between branch type 0 (rodents) and type 1 (other mammals) (Table 3-4).

Discussion

Patterns of *Mc1r* variability

The alignment of *Mc1r* across vertebrate species indicated the occurrence of short conserved motifs intercalated with highly variable segments. In total, seventy seven residues were completely conserved among vertebrates, particularly in the intracellular domains, indicating that these sites are likely the ones under the strongest functional constraints. Therefore, it can be expected that variants at these positions should have more significant effects on *Mc1r* activity than those identified in other domains of the gene. The intracellular domains provide the binding interfaces for the heterotrimeric G proteins and contain phosphorylation targets involved in the regulation of signaling, internalization and cycling (Strader et al., 1994). In mice, the natural tobacco mutation S69L, located

within ID1, leads to *Mc1r* hyperactivity (Robbins et al., 1993), suggesting that this segment is important for normal receptor activity (Garcia-Borrón et al., 2005).

GC content bias in mammals

The mammalian genome is characterized by its high spatial heterogeneity in base composition (Romiguier et al., 2010). The average GC content of a 100-kb fragment of the human genome can be as low as 35% or as high as 60%, a range that is twice as wide as that typically observed in teleostean fishes, for instance (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). A conspicuous feature of high GC content, particularly in third codon position, was observed in all vertebrates surveyed in our study, which correlates with the strong codon usage bias verified. GC content is found to be variable with different organisms, the process of which is predicted to be contributed by variation in selection, mutational bias, and biased recombination-associated DNA repair (Birdsell, 2002). Additionally, variation could be also due to life history traits. Romiguier et al. (2010) showed a correlation between small body size and high GC content in non-model mammals, such as Soricidae, Lagomorpha, Chiroptera, and Afrosoricida. Although we did observe such high GC content in Lagomorph in our *Mc1r* data, rodents showed the lowest GC content.

In genes that are highly expressed, and where one might expect selection to be strong for rapid and efficient translation, there is highly biased codon usage, different from the usage one would expect if different codons were functionally equivalent (Romiguier et al., 2010). Thus, we suggest that variation in *Mc1r* (that is a highly

expressed gene) across many mammal lineages is more likely due to different selection rather than mutational bias. Eizirik (2003) identified similar pattern of *Mc1r* variation in mammals studying felids in particular.

***Mc1r* is a fast evolving gene**

The values of r_S obtained for *Mc1r* are similar to the average rates among nuclear loci presented by Graur & Li (2000) and Makalowski & Boguski (1998) (data not shown). However, the r_N observed in *Mc1r* (0.98×10^{-9}) are much higher than those values reported by both authors for nuclear genes in general (0.74×10^{-9} for Graur & Li [2000] and 0.55×10^{-9} for Makalowski & Boguski [1998]). From a total of 47 genes analyzed by Li (1997) and Graur & Li (2000), 15 showed higher nonsynonymous substitution rate than *Mc1r*. When domains of *Mc1r* were considered separately, the estimated r_N in extracellular segments increased its fastest evolution. Estimates of r_N are significantly lower ($P < 0.05$) than r_S for the transmembrane and intracellular domains, and also for the total coding region. Such result indicates functional constraints in these regions, affecting estimates for the entire protein. Eizirik (2003) found similar results for nonsynonymous rate in *Mc1r* considering human-rodent calibration ($r_N: 0.96 \times 10^{-9}$) and lower rate for cat-dog ($r_N: 0.54 \times 10^{-9}$) calibration. Such result could indicate that the high value found in *Mc1r* in our study might have an increase bias from rodent lineage. However, different lineages comparisons are needed to infer such pattern. It is well known that certain proteins (e.g. histones, actins, and ribosomal proteins) are extremely conservative. Conversely, hemoglobin ($r_N: 0.78 \times 10^{-9}$) and myoglobin ($r_N: 0.57 \times 10^{-9}$) have evolved at intermediate rates, while apolipoproteins, immunoglobulins, interferons

and interleukins have evolved very rapidly ($r_N > 1.0 \times 10^{-9}$) (Li, 1997; Graur & Li, 2000). Thus, *Mc1r* should be considered as a fast evolving gene, similar to those from immune system. Rana et al. (1999) compare the rate at which *Mc1r* has evolved with other genes of the same melanocortin system in primates and rodents. Nonsynonymous substitution rate was three times greater in *Mc1r* than in *Mc4r*. Such result indicates that *Mc1r* has evolved more rapidly than the other members of such receptor family. The greater constrain on the other receptors are likely due to their important physiological role as indicated in the adrenal cortex and central nervous system (Cone et al., 1996). Alternatively, *Mc1r* would have more flexibility as it is expressed only in the melanocytes and affects the type of melanins produced. Finally, the high rates of substitution in *Mc1r* observed in our data set might be partly due to advantageous substitutions.

Evolutionary rates of *Mc1r* across mammal lineages

Heterogeneity in evolutionary rates was evident among lineages of mammals and *Mc1r* domains. Taxon-specific acceleration of amino acid substitution rate was observed in ED4 and TM7, thus suggesting that mammals have evolved faster than birds at these particular *Mc1r* segments. At the nucleotide level, we observed differences on rates across orders of mammals, but most of them were not significant, as within-order variation was evident in several comparisons (e.g. standard error bars overlapped). Thus, we suggest that such high variability might have covered-up the expected increased differences associated with phylogenetic depth, probably indicating that some orders have a lineage-specific pattern. Conversely, older comparisons with the ancestral prototherian (Platypus) and therian (Opossum) mammals showed high significant difference either

from rodents or primates in almost all domains of the protein, but ED3, TM4 and TM7. Particularly, a contrasting pattern was identified in lagomorphs-rodents and lagomorphs-primates for the TM4 domain, where higher rates were observed in both groups in relation to the deepest comparisons of rodents vs. didelphimorphs-monotremes and primates vs. didelphimorphs-monotremes. These observations, interpreted in the context of overall pattern of *Mc1r* variation, might indicate a potential lineage-specific changes in functional constraint or episodic of adaptive evolution in this gene.

A faster rate of replacement substitution was observed in rodents, relative to those that included primates, in half of the *Mc1r* domains. However, particular segments showed no significant difference between these groups, such as TM7 and partially TM6, TM5, ED4 and ID4. Interestingly, other segments, like ED4 and TM3, presented the reverse pattern, where an evidence of acceleration in primates was observed. Thus, given such variation, a conspicuous pattern of increased substitution rate in rodents could not be ruled out for *Mc1r*. We also observed a significant difference in nonsynonymous substitution rate within the rodent clade. Ctenohystrica lineage seems to have an increased substitution rate, primarily evidenced by longer branch lengths in the phylogenetic tree. Such feature is probably biased by the taxa *Ctenomys leucodon*, which showed higher amplitude of variation in relation to other species in the same group. Thus, a potential lineage-specific acceleration could be ruled out in this case. Moreover, it indicates that the mouse related clade (= murid lineage) although having some significant higher values of pairwise dN , does not shown a conspicuous pattern of increased acceleration substitution rate as might be expected. Variability in rates of molecular evolution is well documented in murid lineage, and there is now much evidence to

suggest that a strict global molecular clock does not hold (Welch et al., 2008). In addition, based on results of *Mc1r* sequences, we suggest that a local molecular clock could also be ruled out for rodents. We found evidences of variation in nonsynonymous rate across orders of mammals, but when specifically acceleration in rodents versus all other orders was tested using clade models we did not observe significant differences.

It has been demonstrated that substitution rates can be affected systematically by certain species characteristics, including aspects of evolutionary history, such as population size (Woolfit & Bromham, 2005; Petit & Barbadilla, 2008; Smith & Donoghue, 2008) and life-history traits, like body size (Bromham et al., 1996; Welch et al., 2008). One recurrent factor for the higher rate of substitution in rodent lineage is the generation-time effect; i.e. the higher rate occurs because rodents have a comparatively shorter generation time (Wu, 1985; Kohne, 1972). However, such argument fail to explain why substitution rate in lagomorphs is similar to those in ferungulates for *Mc1r*, despite the fact that the generation time is much shorter in rabbits. In this case, such a variation might indicate fine-scale differences in species correlated with individual life-history traits (Bromham, 2009).

Overall, several amino acid changes in *Mc1r* are associated with coat-color polymorphism in mammals (Manceau et al., 2010). It indicates that such gene has a conspicuous phenotypic effect, which in some lineages might be subject to strong selective pressure, particularly in rodents. This group exhibits markedly colour polymorphisms and are often predated by visually-oriented birds of prey, where crypsis is probably a strong ecological pressure. Thus, selection upon such morphological trait

might also be underlying the high substitution rate of nonsynonymous change in *Mc1r* for some taxon-specific lineages.

Selection on *Mc1r*

Molecular evolution analyses indicated that purifying selection has acted in majority of *Mc1r* evolutionary history in mammals, consistent with previous conclusions (e.g. Ayoub et al., 2009; Hosoda et al., 2005; Mundy & Kelly, 2003). However, our large-scale survey carried out under a contrasting phylogenetic context indicated a higher rate of sites that have evolved under relaxation of functional constraints, as well as three sites with evidence of positive selection signatures. Those sites with ω between 0.17 and 0.41, considered as relaxation of functional constraint, are located in extracellular (ED) and transmembrane (TM) domain. Additionally, the positively selected sites (25, 37 and 265) are also located in both ED and TM domains.

The *Mc1r* gene is unusually polymorphic, and many of the natural variants are functionally relevant (Ringholm et al., 2004; Wong & Rees, 2005). The ED domains are generally small (Holst et al., 2002; Prusis et al., 1997; Ringholm et al., 2004), particularly the ED3, which shown high constitutive activity (Holst & Schwartz, 2003). It has been reported that mutation of residues Glu269 and Thr272 to Ala in the ED4 of human *Mc1r* lowers the binding affinity for agonists, therefore suggesting the involvement of these residues in ligand recognition (Chhajlani et al., 1996). Moreover, in TM domains the ligand binding site is a pocket located below the plasma membrane–extracellular medium interface, formed with the contribution of several fragments (Garcia-Borrón et al., 2005).

Three-dimensional models of ligand–receptor complexes have been developed (Haskell-Luevano et al., 1996; Prusis et al., 1995, 1997), which suggest that a highly charged region containing Glu94 (TM2), Asp-117 and Asp-121 (TM3) interacts with an Arg residue. A network of aromatic residues located near the extracellular side of TM4, TM5 and TM6 potentially also contributes to agonist binding by interacting with the aromatic residues (Yang et al., 1997). Interestingly, 11 mutations described in vertebrates are located in TM2 of the *Mc1r*, and several of them have important functional consequences, particularly involved in pelage and feathers melanism (Hoekstra, 2006). Our results indicated a high proportion (31%) of sites with $\omega = 0.36$ for TM2 domain, suggesting relaxation of constraints for this segment, probably due to a functional implication. In addition, TM4 and TM6 are likely to have evolved under selection rather than neutral or discrete models, evidenced by significant higher likelihoods values (Table S3-1). In particular, one positively selected site (265) observed in *Mc1r*, with high BEB posterior probability, is located in TM6. The other two are located in ED1, formally characterized as N-terminal domain (Garcia-Borrón et al., 2005). Although we do not have evidence of functional effects of amino acid changes in such sites, either from our data or from previous studies, the results of positive selection indicate that they might have a morphological significance. Alternatively, such sites could be involved in other physiological effects of *Mc1r* variants, such as a kappa-opioid receptor that mediates analgesia in mice and humans (Mogil et al., 2003).

To conclude, our results indicate that purifying selection is not the only evolutionary force that has shaped the *Mc1r* in mammals, as a significant number of codons have evolved under relaxation of functional constraint, and a few positive selected. Although

none of our estimates of ω is greater than 1, the possibility remains that positive directional selection is the driving force behind the increase in ω . Finding amino acid replacements in excess of synonymous substitutions, globally or in specific regions, provides unequivocal evidence of positive selection at the molecular level. Nevertheless, Yang (1998) noted that this criterion could be excessively stringent, and suggested that statistically significant increments in ω might indicate positive selection (Nielsen & Yang, 1998; Yang et al., 2000). There are several examples of single-nucleotide polymorphisms having pronounced evolutionary consequences in pigmentation (e.g. Nachman et al., 2003; Hoekstra et al., 2004; Rosenblum et al., 2004, 2010; Linnen et al., 2009). Because the positively selected sites in the *Mc1r* are located in critical regions of ligand-binding of the protein, it is thus plausible that functional changes in these regions might have direct consequences in phenotypes.

Conclusion

In the context of *Mc1r* variation, our data indicate potential lineage-specific changes in functional constraint. Rodents did not show a conspicuous pattern of acceleration in evolutionary rate in relation to other mammals, likely due to the large-scale of inter and intra order comparisons. Additionally, purifying selection was evidenced as not the only evolutionary force that has shaped the *Mc1r* in mammals, since a significant number of codons have evolved under relaxation of functional constraints. Moreover, some sites clearly evolved under positive selection. Together, these results suggest that selection is potentially the main driving force behind the molecular variation observed, but organismal-level factors probably influence differences in a fine-scale pattern as well.

Material and Methods

Species surveyed

Nucleotide and amino acid sequence of the coding region of *Mc1r* from 72 mammal species representative of nine orders (Rodentia, Lagomorpha, Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla, Carnivora, Proboscidea, Didelphimorphia and Monotremata) that are publicly available in the Genbank and Ensembl, were used in this study (Table S3-2). The data set for amino acid-level analysis also included species of birds (chicken [*Gallus gallus*], AY220304; bananaquit [*Coereba flaveola*], AF362605; tanager [*Tangara cucullata*], AF362606; white-winged fairywren [*Malurus leucopterus*], AY614610; tundra swan [*Cygnus columbianus*], FJ170057), reptiles (Lesser Earless lizard [*Holbrookia maculata*], AY586111; Eastern Fence lizard [*Sceloporus undulates*], AY 586153; Side-blotched lizard [*Uta stansburiana*], AY586162; Desert Horned lizard [*Phrynosoma platyrhinos*], AY 586116) and fishes (Fugu [*Takifugu rubripes*], AY1618; Zebrafish [*Danio rerio*], NM180970; Mexican Tetra [*Astyanax mexicanus*], FJ665986). Nucleotide sequences from the bird species were used as outgroups for the mammalian data set.

Patterns of Mc1r sequence variation

Sequences of *Mc1r* coding region were processed and aligned using Codon Code Aligner (Codon Code Corp.). All indels and substitutions were examined by eye. Analyses were performed in MEGA (Tamura et al., 2011) and PAUP (Swofford, 2003) programs including access to nucleotide composition, codon usage bias and phylogenetic

reconstruction. The number of synonymous (dS) and nonsynonymous (dN) substitutions among mammals were estimated for 15 different segments of the *Mc1r* among various lineages (4 extracellular domains [ED], 7 transmembrane domains [TM] and 4 intracellular domains [ID]).

The rate of nucleotide substitution (r) was considered as the number of substitutions per site per year. It was calculated by dividing the number of substitutions per site between two homologous sequences (K) by $2T$, where T is the time of divergence between the two sequences, that is:

$$r = K/(2T)$$

The divergence time, T , is usually assumed to be the same as the time of divergence between the two species from which the two sequences were taken and is usually inferred from paleontological data (Li, 1997). Thus, in order to evaluate the extent of sequence conservation of *Mc1r* relative to other genomic loci, the rates of dS and dN nucleotide substitutions per 10^9 years (r_S and r_N , respectively) at this gene were calculated for rodents using the method of Li (1993) and Pamilo & Bianchi (1993) and by setting the time for human-murid divergence event at 80 million years ago. Standard error was computed with using 1000 bootstrap replications. Such approach allows direct comparison with rates estimated for other nuclear loci, since this calibration has been used in previous studies (Li, 1997; Graur & Li, 2000; Makalowski & Boguski, 1998).

Levels of divergence in the protein were estimated by the observed proportion of different amino acids using p-distance in three classes of comparisons: (i) mammals vs. birds, (ii) mammals vs. reptiles and (iii) mammals vs. fishes.

Average pairwise nonsynonymous rates were characterized in different phylogenetic levels of mammals for all 15 domains of the *Mc1r* gene using the Nei & Gojobori (1986) method in the program CODEML of the package PAML 4.4 (Yang, 1997, 2007). We fixed the same comparisons for rodents and primates, in order to evaluate whether the former has acceleration in replacement rate. In this analysis we considered Cetartiodactyla, Perissodactyla and Carnivora together, in a single group characterized as Ferungulates. Didelphimorphia and Monotremata were also combined in one class of comparison (Did-Mon). In addition, we compared the three major lineages within Rodentia (following phylogenetic relationships proposed by Blanga-Kanfi et al. [2009]), characterized as: Mouse related clade (Muridae, Cricetidae, Heteromyidae and Geomyidae), Squirrel related clade (Sciuridae) and Ctenohystrica (Ctenomyidae). These comparisons were performed in order to remove a potential bias in the mouse lineage, since most of the data from other studies that have suggested acceleration in rodents are based only on this lineage.

Phylogenetic reconstruction of 19 mammal species (one representative of major lineages in each order surveyed) based on *Mc1r* nucleotide sequences was implemented in PAUP using all codon positions. The topology and branch lengths were estimated by a maximum likelihood (ML) approach, with a GTR+G+I model of nucleotide evolution (defined by the Akaike Information Criterion implemented in MODELTEST 3.7 [Posada & Crandall, 1998]), and parameters estimated from the data set. Additionally, relationships among rodent lineages were inferred from 44 species (Table S3-2) using the same method described above and the TN93 + G model of nucleotide evolution.

Tests of selection

Patterns of selection and rates of evolutionary changes in the *Mc1r* were evaluated by performing a number of standard tests (e.g. Yang & Bielawski, 2000; Nielsen, 2005). The established structure and inferred function of the Mc1r protein (Chhajlani et al., 1996; Cone et al. 1996; García-Borrón et al. 2005) allowed us to make a priori predictions about which domains were expected to evolve under relaxation of selective constraints and therefore to discuss our results also into a functional perspective. We used the phylogeny-based maximum likelihood analysis of ω (dN/dS ratio) as implemented in the program CODEML of the package PAML 4.4 to statistically test for positive selection and/or relaxation of functional constraints acting on *Mc1r* codons. Log-likelihood values were generated for models where ω is allowed to vary among sites within the interval 0–1 (neutral models) and for models that allow $\omega > 1$ for some sites (selection models) following Yang et al. (2000). First, we tested whether ω differs among sites by comparing model M0, which assumes a constant ω across all sites to model M3, which allows ω to vary among sites. To formally test for the presence of sites evolving under positive selection, we then compared a nearly neutral model of ω variation (M1a) to a model that allows for positive selection (M2a) (Wong et al., 2004; Yang et al., 2005). After, we compared also to a neutral model M7 that estimates ω with a beta distribution over the interval 0–1 to a selection model M8, which additionally allows for positively selected sites ($\omega > 1$) (Yang et al., 2000; Yang & Nielsen, 2002). A beta distribution of ω has been suggested to more accurately reflect the distribution of ω among sites in biological data (Friedman & Hughes, 2007). We compared the models using likelihood ratio test (LRT) in

the program HyPhy (Pond et al., 2005). Twice the log-likelihood difference ($2\Delta\ln L$) between models follows a χ^2 distribution with the degrees of freedom equal to the difference in the number of parameters between the models (Yang & Nielsen, 2002). All models were run multiple times with different starting values for ω to ensure the correct estimation of the model parameters. The unrooted tree input file for these analyses was generated by the maximum likelihood method implemented in PAUP using the data set of 72 mammal species. We used empirical Bayes approaches implemented in CODEML to infer which sites of the *Mc1r* sequence may have evolved under positive selection (Yang et al., 2005). Two different approaches were used to determine sites under selection, the naive-empirical Bayes (NEB) and the Bayes-empirical Bayes method (BEB) (Yang et al., 2005). Positive selection was inferred if the posterior probability of $\omega > 1$ for a site was higher than 0.95. Codon usage bias is well known to affect estimation of synonymous and nonsynonymous substitution rates (Yang & Nielsen, 1998). Thus, we performed model F61, which uses empirical estimates of individual codon frequencies.

Finally, we tested the heterogeneity of evolutionary rates among lineages by performing the clade models (Bielawski & Yang, 2004) using CODEML in PAML. Branches on the phylogeny were a priori divided into two clades (branch type 0 as rodents and branch type 1 as all other mammals), and a LRT test was used to evaluate divergences in selective pressures between them indicated by different ω ratios. We performed clade model type C that assumes three site classes, which was compared with the neutral model M1a by a LRT test with two degrees of freedom. Such model is used primarily to detect positive selection, but our goal here was to evaluate increased acceleration in rodent lineage through direct inferences on dN/dS ratio differences.

Authors' contributions

GLG carried out the bioinformatics work, performed PAML, MEGA, PAUP and MODELTEST analyses and wrote the manuscript. VRPC performed analysis in PAML and database bioinformatics work. TROF conceived and supported the study. All authors were involved in the experimental design and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). GLG received a doctoral fellowship from CNPq (No 141604/2007-7).

References

- Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J: Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) in Cetartiodactyla. *Mol. Phy. Evol.* 2009, 52:550–557
- Bielawski JP, Yang Z: A maximum likelihood method for detecting functional divergence at individual codon sites, with application to gene family evolution. *J. Mol. Evol.* 2004, 59:121-13

- Birdsell JA: Integrating genomics, bioinformatics, and classical genetics to study the effects of recombination on genome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2002, 19: 1181–97
- Blanga-Kanfi S, Miranda H, Penn O, Pupko T, DeBry RW, Huchon D: Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evol. Biol.* 2009, 9: 71
- Bromham L, Rambaut A, Harvey PH: Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution. *J. Mol. Evol.* 1996, 43:610-621.
- Bromham L: Why do species vary in their rate of molecular evolution? *Biol. Lett.* 2009, 5:401–404.
- Chhajlani V, Xu X, Blauw J, Sudarshi S: Identification of ligand binding residues in extracellular loops of the melanocortin 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219:521–525.
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA: The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* 1996, 51:287–317.
- Eizirik E: Molecular evolution of melanism in the Felidae (Mammalia, Carnivora). PhD dissertation, University of Maryland 2003.
- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O'Brien SJ: Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr. Biol.* 2003, 13: 448–453.

- Friedman R, Hughes AL: Likelihood-ratio tests for positive selection of human and mouse duplicate genes reveal nonconservative and anomalous properties of widely used methods. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007, 42:388–393.
- Garcia-Borrón JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C: Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 2005, 18:393–410
- Graur D, Li W.-H: *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland, Sinauer 2000
- Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, Dixon C, Sajantila A, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL: Evidence for variable selective pressures at Mc1r. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 66: 1351-1361.
- Haskell-Luevano C, Sawyer TK, Trumpp-Kallmeyer S, Bikker JA, Humblet C, Gantz I, Hruby VJ: Three-dimensional molecular models of the hMC1R melanocortin receptor: complexes with melanotropin peptide agonists. *Drug Des. Discov.* 1996, 14:197–211.
- Hoekstra HE, Drumm KE, Nachman MW: Ecological genetics of adaptive color polymorphism in pocket mice: geographic variation in selected and neutral genes. *Evolution* 2004, 58:1329–1341.
- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP: A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse colour pattern. *Science* 2006, 313: 101–104.
- Hoekstra HE: Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 2006, 97:222–234.

- Holst B, Elling CE, Schwartz TW: Metal ion-mediated agonism and agonist enhancement in melanocortin MC1 and MC4 receptors. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:47662–47670.
- Holst B, Schwartz TW: Molecular mechanism of agonism and inverse agonism in the melanocortin receptors: Zn(2+) as a structural and functional probe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003, 994:1–11.
- Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL, Suzuki H: Independent nonframeshift deletions in the *Mc1r* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *J. Hered.* 2005, 96: 607–613
- Jackson IJ, Budd P, Horn JM, Johnson R, Raymond S, Steel K: Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. *Pigment Cell Res.* 1994, 7:73–80.
- Jackson IJ: Homologous pigmentation mutations in human, mouse, and other model organisms. *Hum. Mol. Gen.* 1997, 6:1613–1624.
- Kijas JMH, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L: Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat colour in pigs. *Genetics* 1998, 150:1177–1185.
- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S: The role of the melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat colour determination. *Mamm. Genome* 1995, 6: 636–639.
- Kohne DE, Chiscon JA, Hoyer BH: Evolution of primate DNA sequences. *J. Hum. Evol.* 1972, 1: 627-644.
- Laird CD, McConaughy BL, McCarthy BJ: Rate of fixation of nucleotide substitution in evolution. *Nature* 1969, 224: 149-154.

Li, W.-H: Molecular evolution. Sunderland Sinauer 1997.

Linnen CR, Kingsley EP, Jensen JD, Hoekstra HE: On the origin and spread of an adaptive allele in deer mice. *Science* 2009, 325: 1095–1098.

MacDougall-Schackleton EA, Blanchard L, Gibbs L: Unmelanized plumage patterns in old world leaf warblers do not correspond to sequence variation at melanocortin-1 receptor locus (*Mc1r*). *Mol. Biol. Evol.* 2003, 20:1675-1681.

Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HE: Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2010, 365: 2439-2450.

Makalowski W, Boguski MS: Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2.820 orthologous rodent and human sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:9407-9412.

Marklund L, Moller KJ, Sandberg K, Andersson L: A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 1996, 7:895–899.

McRobie H, Thomas A, Kelly J: The genetic basis of melanism in the Gray Squirrel (*Sciurus carolinensis*). *J. Hered.* 2009, 100:709–714.

Mogil JS, Wilson SG, Chesler EJ, Rankin AL, Nemmani KVS, et al: The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100:4867–4872.

- Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Schribner K, Janssen K, Nadeau NJ: Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 2004, 303: 1870-1873.
- Mundy NI, Kelly J: Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *Am. J. Phy. Anthr.* 2003, 121: 67-80.
- Murphy W J, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady C, Teeling E, Ryder OA, Stanhope M, de Jong WW, Springer MS: Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* 2001, 294: 2348-2351.
- Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL: The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100: 5268-5273.
- Nei M, Gojobori T: Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 1986, 3:418-426.
- Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ, Barsh GS: Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* 2000, 11: 24-30.
- Nielsen R, Yang Z: Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* 1998, 148:929-936
- Nielsen R: Molecular signatures of natural selection. *Annu. Rev. Genet.* 2005, 39:197-218.
- Ohta T: Synonymous and nonsynonymous substitutions in mammalian genes and the nearly neutral theory. *J. Mol. Evol.* 1995, 40: 56-63.

- Pamilo P, Bianchi NO: Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes. *Mol. Biol. Evol.* 1993, 10: 271-281.
- Petit N, Barbadilla A: Selection efficiency and effective population size in *Drosophila* species. *J. Evol. Biol.* 2008, 22: 515–526.
- Pond SL, Frost SD, Muse SV: HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 2005, 21:676–9
- Posada D, Crandall KA: MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998, 14:817–818.
- Prusis P, Frandberg PA, Muceniece R, Kalvinsh I, Wikberg JE: A three dimensional model for the interaction of MSH with the melanocortin-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 210:205–210.
- Prusis P, Schioth HB, Muceniece R, Herzyk P, Afshar M, Hubbard RE, Wikberg JE: Modeling of the threedimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J. Mol. Graph. Model.* 1997, 15:307–317.
- Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH-J, Sambuughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li W -H: High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics* 1999, 151:1547-1557.
- Ringholm A, Klovins J, Rudzish R, Phillips S, Rees JL, Schioth HB: Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *J. Invest. Dermatol.* 2004, 123:917–923.

- Ritland K, Newton C, Marshall HD: Inheritance and population structure of the white-phased “Kermode” black bear. *Curr. Biol.* 2001, 11:1468–1472
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD: Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 1993, 72:827–834.
- Romiguier J, Ranwez V, Douzery EJP, Galtier N: Contrasting GC-content dynamics across 33 mammalian genomes: Relationship with life-history traits and chromosome sizes. *Genome Res.* 2010, 20:1001-1009.
- Rosenblum EB, Hoekstra HE, Nachman MW: Adaptive reptile color variation and the evolution of the *Mc1r* gene. *Evolution* 2004, 58:1794–1808.
- Rosenblum EB, Römpler H, Schöneberg T, Hoekstra HE: Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107: 2113–2117.
- Savage SA, Gerstenblith MR, Goldstein AM, Mirabello L, Fargnoli MC, Peris K, Landi MT: Nucleotide diversity and population differentiation of the Melanocortin 1 Receptor gene, *Mc1r*. *BMC Genetics* 2008, 9:31
- Sharp PM, Tuohy TMF, Mosurski KR: Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14:5125-5143.
- Smith SA, Donoghue MJ: Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. *Science* 2008, 322:86–89.

- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA: Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63:101–132.
- Swofford DL: PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sunderland, Sinauer Associates 2003
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011 (In Press)
- Våge DI, Klungland H, Lu D, Cone RD: Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat colour in sheep. *Mamm. Genome* 1999, 10:39–43.
- Våge DI, Lu D, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S, Cone RD: A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nature Genetics* 1997, 15:311–315
- Welch JJ, Bininda-Emonds OR, Bromham L: Correlates of substitution rate variation in mammalian protein-coding sequences. *BMC Evol Biol.* 2008, 8:53–64.
- Wong TH, Rees JL: The relation between melanocortin 1 receptor (*MC1R*) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. *Peptides* 2005, 26:1965–1971.
- Wong WSW, Yang ZH, Goldman N, Nielsen R: Accuracy and power of statistical methods for detecting adaptive evolution in protein coding sequences and for identifying positively selected sites. *Genetics* 2004, 168:1041–1051.
- Woolfit M, Bromham L: Population size and molecular evolution on islands. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 2005, 272:2277–2282.

- Wu C-I, Li W-H: Evidence for high rates of nucleotide substitution in rodents than in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82:1741-1745.
- Yang Y, Dickinson C, Haskell-Luevano C, Gantz I: Molecular basis for the interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷]melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor. J. Biol. Chem. 1997, 272:23000–23010.
- Yang Z, Nielsen R: Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. J.Mol. Evol. 1998, 46: 409-418
- Yang Z: PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol. Biol. Evol. 2007, 24:1586–1591.
- Yang Z: PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. CABIOS 1997, 13:555–556
- Yang ZH, Bielawski JP: Statistical methods for detecting molecular adaptation. Trends Ecol. Evol. 2000, 15:496–503.
- Yang ZH, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AMK: Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. Genetics 2000, 155:431–449.
- Yang ZH, Wong WSW, Nielsen R: Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. Mol. Biol. Evol. 2005, 22: 1107–1118.

Figure legends

FIGURE 3-1. The Mc1r protein structure and alignment across species. A, amino acid sequence in 20 mammal species, representative of all 9 orders surveyed and 6 vertebrates (see material and methods for details). Dots indicate identity to top sequence. The beginning position of each of the 15 Mc1r domains is indicated above the sequences: extracellular (ED) are coloured in green, transmembrane (TM) in red, and intracellular (ID) in blue. Domain boundaries are based on Robbins et al. (1993). Arrows indicates positively selected sites based on Bayesian probabilities. Amino acid residues completely conserved across the surveyed species are shaded. B, Bi-dimensional protein depiction, highlighting positions of the domains coloured as green, red and blue in the alignment data set.

FIGURE 3-2. Graph showing estimated number of nonsynonymous substitutions rate for each *Mc1r* domain, at varying crescent levels of phylogenetic depth among mammalian groups. Substitutions and standard errors were estimated as the mean of pairwise nucleotide sequence comparisons in rodents (Rod) and primates (Pri) vs. lagomorphs (Lag), ferungulates (Fer), proboscids (Pro) and didelphimorphs + monotremes (Did-Mon). Primates were fixed as a control in relation to rodents, in order to evaluate the existence of acceleration in substitution rate in mouse lineage. Asterisks indicate significant difference between rodents and primates.

FIGURE 3-3. Graph showing estimated number of nonsynonymous substitutions rate for each *Mc1r* domain, within rodent lineage. Substitutions and standard errors were estimated as the mean of pairwise nucleotide sequence comparisons in the three major lineages of this group: Mouse-related clade, Ctenohystrica and Squirrel related clade. Letters above bars indicate statistical significance among comparisons.

FIGURE 3-4. Phylogenetic tree of 44 rodent *Mc1r* nucleotide sequences, generated using all codon positions (data set of 945 base pairs), and rooted using a rabbit (*Lepus capensis*) as outgroup. The topology and branch lengths were estimated using a ML approach, with T93 model of nucleotide evolution. Major phylogenetic groups proposed by Bangla-Kafi et al. (2009) are described on the right side of the tree. Ctenohystrica, in particular *C. leucodon*, showed an increased acceleration in substitution rate.

FIGURE 3-5. Phylogenetic tree of 20 mammalian *Mc1r* nucleotide sequences, generated using all codon positions (data set of 945 base pairs), and rooted using a chicken as outgroup. The topology and branch lengths were estimated using a ML approach, with GTR + G model of nucleotide evolution. Different orders are indicated in the right side of the tree. Acceleration in rodent lineage is evidenced by longer branch lengths in such clade.

FIGURE 3-6. Posterior probabilities that each site is from the 11 sites classes (here grouped in only three classes, defined as 1: $\omega = 0.001-0.012$; 2: $\omega = 0.17-0.41$; 3, $\omega = 1$) under the M8 (selection) model, calculated using the Bayes empirical Bayes (BEB) procedure from each codon of *Mc1r* in mammals.

Table legends

TABLE 3-1. Amino acid variability in the different domains of the *Mc1r* protein. ED: extracellular domain, ID: intracellular domain, TM: transmembrane domains. Groups used for distance comparison are mammals (M) vs. birds, reptiles and fishes.

TABLE 3-2. Nucleotide composition (based only on GC content) of *Mc1r* sequences in mammals, birds, reptiles and fishes.

TABLE 3-3. Log likelihood values and parameters estimates under models of variable ω ratios (dN/dS) among sites for entire *Mc1r* protein and separated domains; p: proportion of codons in each ω class.

TABLE 3-4. Branch-site clade model C values of ω (dN/dS ratio) estimated for three site classes.

Additional files

TABLE S3-1. Log likelihood values (LnL) estimates for each model comparison in different domains of the *Mc1r* protein.

TABLE S3-2. Species used in this study with Genbank accession numbers for *Mc1r* sequences.

A

	ED1		TM1		ID1		TM2
Mouse	MSTQEPQKSLGLSLSNSN--ATSHLGLLATNQS--EPWClyV		SIPDGLFLLSLGLVSLVENVLVVIAT		TKNRNLHSP		MYFFICCLALS DLMVSVSIVLETTIIL
Rabbit	.PM.A.SR...TTAT.SPSP..A.HT--G..Q.		P...L...V..A...A...		..C...L..M.S...MAVL.		
Lemur	.PV.GS.R...AV..TPT..P..RP.A..T--G..Q..E.		...C...T...A..A...		..C...L...S...AVL.		
Opossum	.PMPGQ..R.FN...TSPD.L.QAVP...T--DIS.QGL		F...E..T...MM.V..I...		...V...L...NL...SVM.		
Squirrel	.PV--RR...TPM..PQR...T--G..Q..L.		...G...M..V..A...		..C...L..T.NA...F.		
Rat	.P..G.P.R...TSIT...T--GS..H.		...V...V...A...		...A...L..I.N...AVM.		
Bottlenose dolphin	.PVLG..RQ...SP...TSP..PR...T--G..Q..E.		.V.E...M..A..M..Q..E.		...A...L..I.N...AVM.		
Pig	.PVLG.ER...A..S.APP.APR...TNQTG.Q.E.		...A...A...A...		...V...V...L...N...AVL.		
Pocket gopher	.P...TPT..P..R.SA..T--G..Q..Q.		...S..A...A...		...L...S...V...		
Sheep	.PVLGS.RR...CTPP..LP.T..P.RT--G..Q..E.		...I...A...A...		...M...L...N...AVM.		
Platypus	..PA..RR..DP..TSSPIILNHMAPA...D.L.HGL		F..NEV..T...M..M..S		...V...L...GNL...SVM.		
Oldfield mice	.P..G..R...TST..P...T--G..Q..Q.		...S...A...A...		...I.M...A...		
Chimpanzee	.AV.GS.RR...TPT.IPQ...A..T--GAR.E.		...M..AT..A...A...		..C...L..G.N...AV.		
Dog	.VW.G..RR...GTSP..P.FE..A..T--G..R..E.		...N...V...A..A...		...G...V...L...TN...AVM.		
Pocket mice	.PM...RR..DPF..TRTG.P..K.SA..T--G..H.		...S..A...A...		...L...L...L...		
Horse	.PL.G..RR...TLP..PY..T..T--P..E.		...T..A...A...		...V...L..M.N...M.A.L.		
Cat	.V.G..RR...TSP.APR...A..T--G..R..EL.		.V...G...V...A..A...		...V...L...S...AVM.		
Vole rat	.P..G..R...TST..P...T--G..Q..Q.		...C...A...A...		..C...L..I.N...A...		
Tuco-tuco	..SRRI...I..ATPSG.LL...PA..HT--GSG.H.		...V...A...V...		..C...L..C...A...		
Elephant	.PL.GA.GR.R...ATPPT.P.S...G..T--G..E.		...E..F...M..A..A...		...V...L...N...AVM.		
Bananaquit	..ALA.LRL.REPS.ASEGNHSNATVGAG--GG.QGL		D..NE..A...L..A..L..G..A..L..T...		...V..ML..I.NLVKMLFM.		
Chicken	..MLA.LRL.REPW.ASEGNQSNATAGAG--GA.QGL		D..NE..T...L..A..L..L..A..L..V...		...V..ML..N.LAK.LFM.		
Lesser Earless lizard	.TVPS.LRTVP...ATLPSDLPINVTNE--CSTDWP		V..NE..T..AL.FL.L..A..V..CSTDWP		...V..ML..I.N.V.FFM.		
Side-blotched lizard	.TVPS.LRTAPD...GTLPSDLPINVTNK--CSTDWP		V..NE..I..AL.FL.L..A..V..CSTDWP		...V..ML..I.N.V.FFM.		
Mexican tetra	.NATD.PGRVQDFS.GTQTPEDFPNEEKES--ATGIAQI		M..QE..M..I...I..A..V...		...V..ML..N.V.MFM.		
Zebrafish	.NATD.QGRVQDFS.GSQTPETDFPNEEKES--VTGIAQI		M..QE..M..I...I..V..I...		...V..ML..N.V.LFM.		
	ED2	TM3	ID2	TM4	ED3		
Mouse	LLEAGILVARVALVQQLDN	LIDVLCIGSMVSSLCFLGIIAI	DRYISIFYALRYHSIVTLPRAR	RAVVGIMVSVSSTLFITYY	KHTA		
Rabbit	..A.AG.AVV...D	V...S...A..V		CIALAV.GA.AT.S.VA.D			
Lemur	.G..A.A.QATV...G	V...L.S...F..A..M		..IAA..AA..L...A.C	DR		
Opossum	..K.V.MIQMPL...V	V...M..IS..A..V		..PC.K.GVLA..VS.AF.G..S..N.N			
Squirrel	..V.A.ATPATV...V	V...T...A..V		W.I.A..A..L...N.V.			
Rat	..A...A...V...V	V...V...V...V		...S...V...V...V			
Bottlenose dolphin	..A.A.P.A.V...D	V...S...A..V		..IAA..VA..LA...A..N.A			
Pig	..A.A.QA.V...V	VM...A..A..V	..V...V...V...V	..IAA..AG.VL...A..H..			
Pocket gopher	V...V.AT.TV..W..E	V...G..A..V		W.M.A..VT..L...VA..N..			
Sheep	..V.AT.A.V...V	V..M..S...A..V		..IAA..VA..LT.V.S...N.V			
Platypus	..R.Q..MQTPA.RR..G	V..MM..T.VM..S..A..V	..T...T...R..V	G.I.A..VA.AL.A.S..N.PV			
Oldfield mice	..A..T..A...V...V	V...V...V...V		..I..VA..FF...V..N..			
Chimpanzee	..A...A.VL..V...V	V...IT.S..L...A..V		..IAA..VA.VLF...A.C	DR		
Dog	.V...A.A.QA.V...D	I...V...A..V	..L...L...L...L...W	..ISA..VA.VL...A..N..			
Pocket mice	V...A.AT..TV...V	V...V...V...V		W.I.A..VA..S...VA..N..			
Horse	..V.ATQASVL...I	I...S...S..V	..MM..VW	..I.A.V..VL...A..N..			
Cat	..A.AG.A.V..R..D	I...V..A...A..V		..ISA..VA.VL...A..D..			
Vole rat	..A..T..A...V...V	VM...S...V...V		..I..VA..FF...N..			
Tuco-tuco	..T..TTATV...I	IF...S...A..V	..T...T...S.SQ	..IAA..V..LA...S..			
Elephant	..V.A.WAGV...A	A..F...A..V	..T...T...T...T...W	W.I.A.T..AA.V.C...A..DC			
Bananaquit	..H.V..M.PSIRHM.S	V..T..S.V...S..V..V	..T...T...M..Q..V	VTMASV.LA.T...VL...RSNT			
Chicken	.M.H.V..I.ASIRHM..S	V..M..S.I...S..V..V	..T...T...M..Q..V	VTMASV.LA.T...VL...RNN			
Lesser Earless lizard	.IDH.V..V.SSTM..M	VM.M..S.LM..S..SV..	..T...T...N.M.FQ..V	MVI.AV.L.SI..AI..AD			
Side-blotched lizard	.IDH.V..V.SSTM..M	VM.M..S.LM..S..SV..	..T...T...N.M.FR..M	GII.AV.L.S..AI..AD			
Mexican tetra	.T.H.V.TVTAGMLRH..V	V..M..S.V...S..CT..A	..T...T...M.TRC.V	AII.LV.LA..T..S..V.H	TDD		
Zebrafish	.T.H.L.LVTAKML.H...V	V..IM..S.V...S..CT..A	..T...T...M.TQ..V	GII.LVV.LA..T..S..V.H	TDN		

Continuação

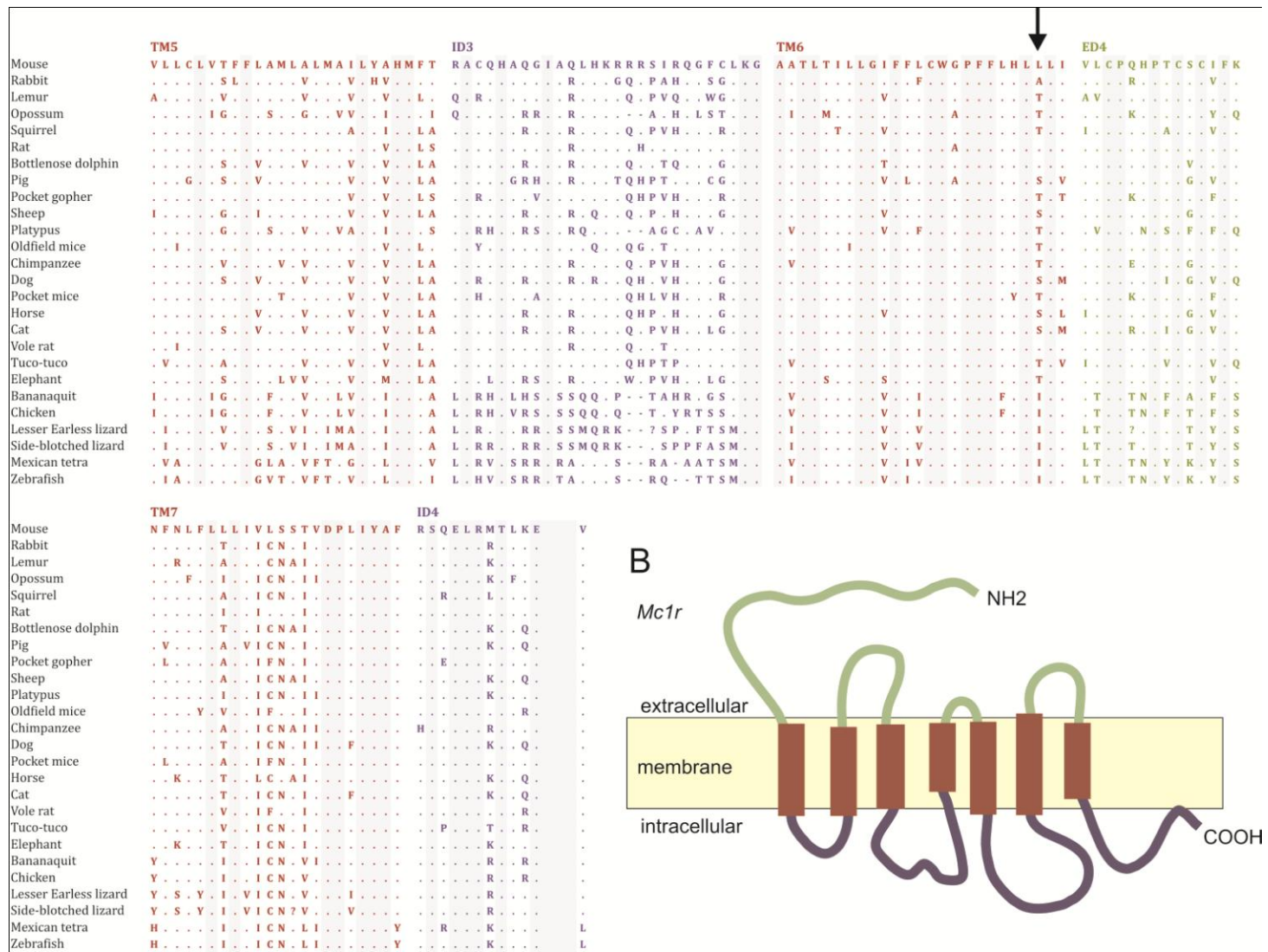


FIGURE 3-1

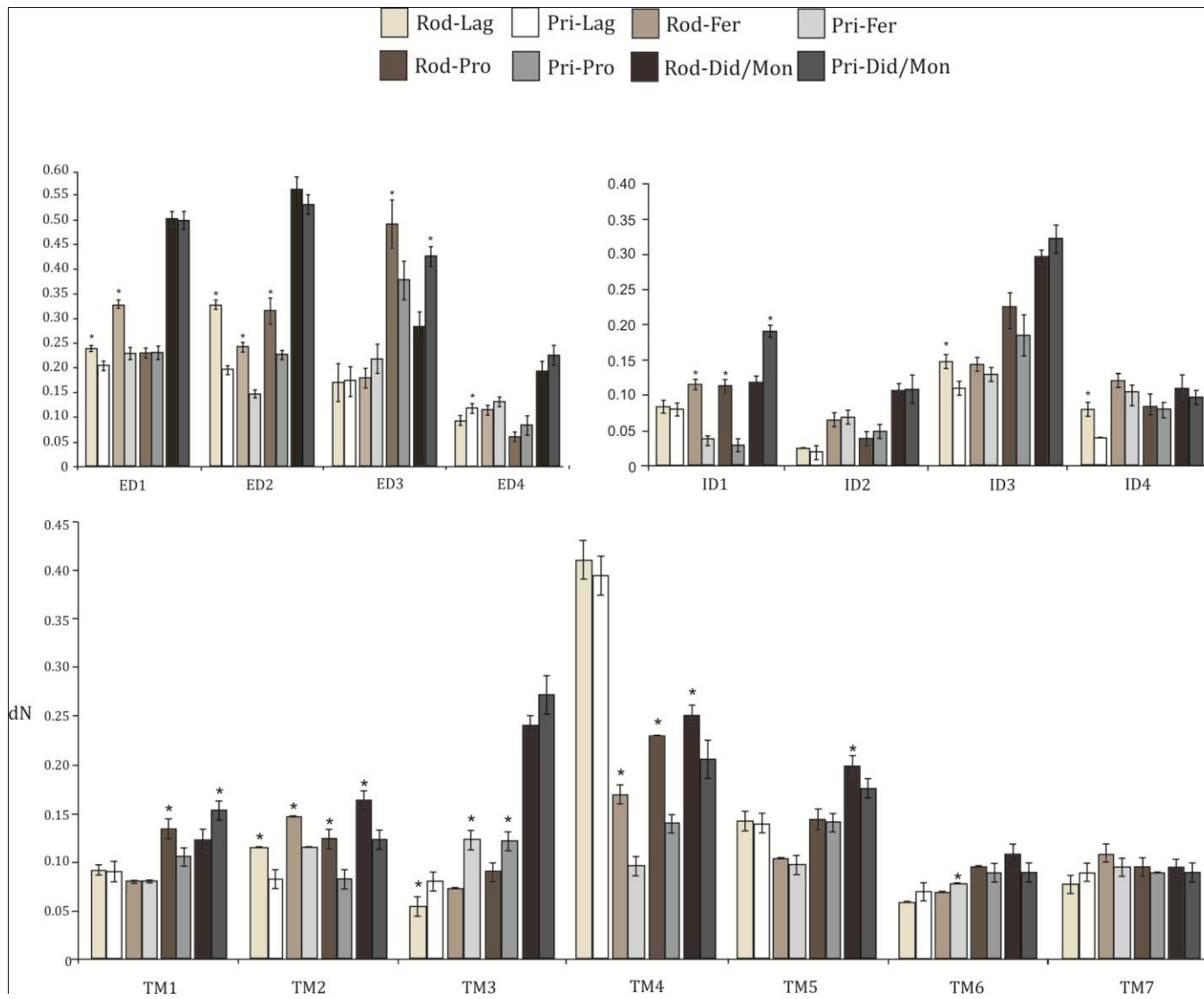


FIGURE 3-2

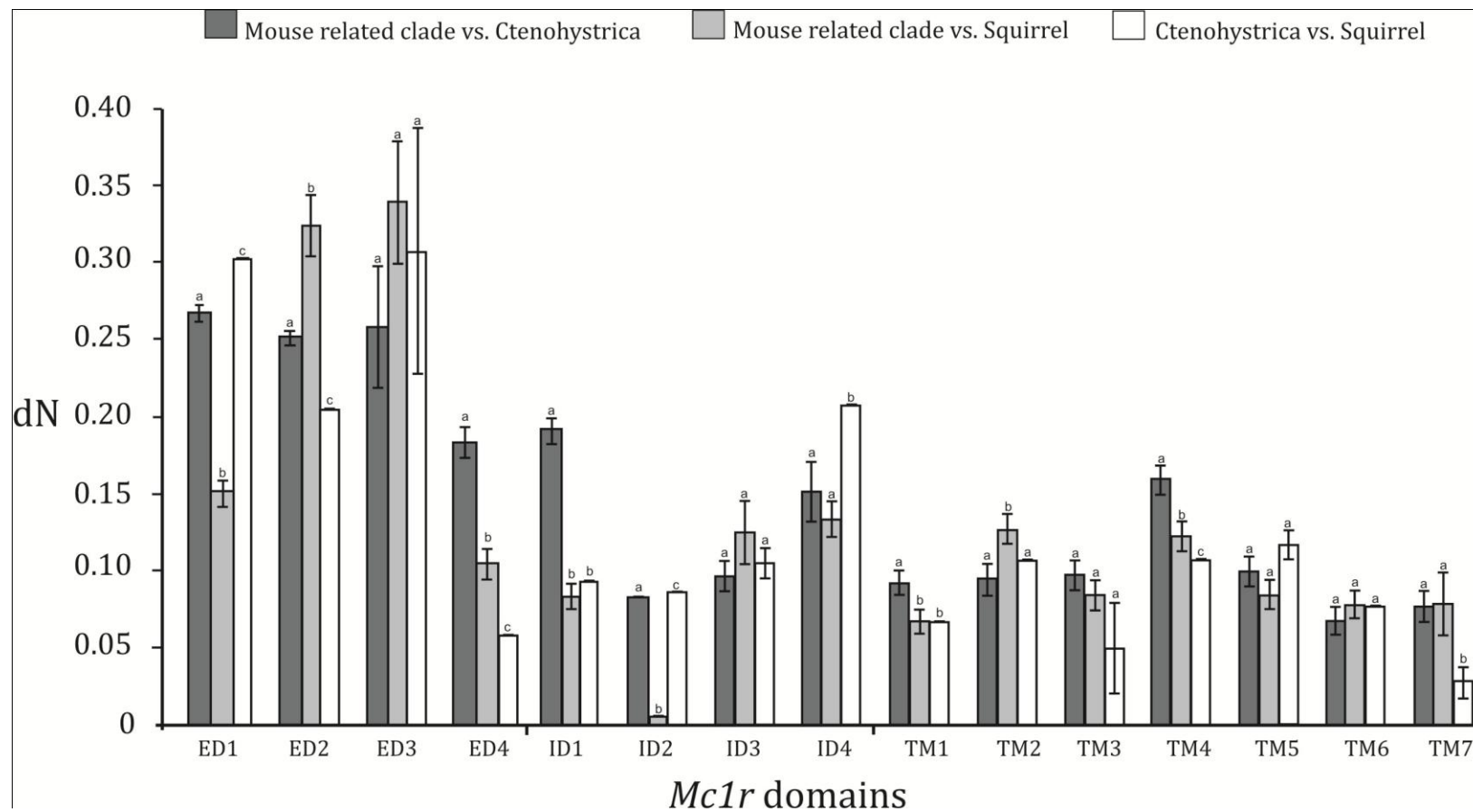


FIGURE 3-3

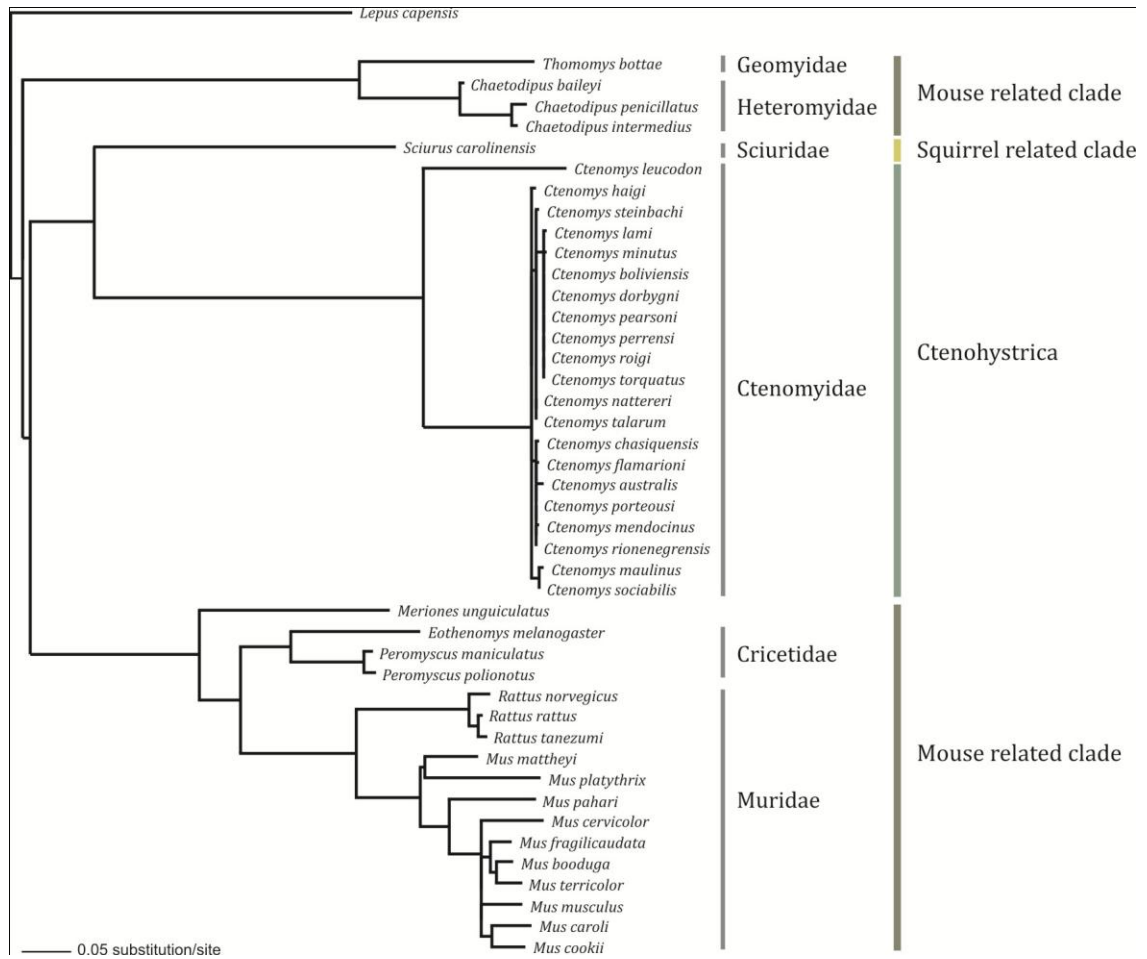


FIGURE 3-4.

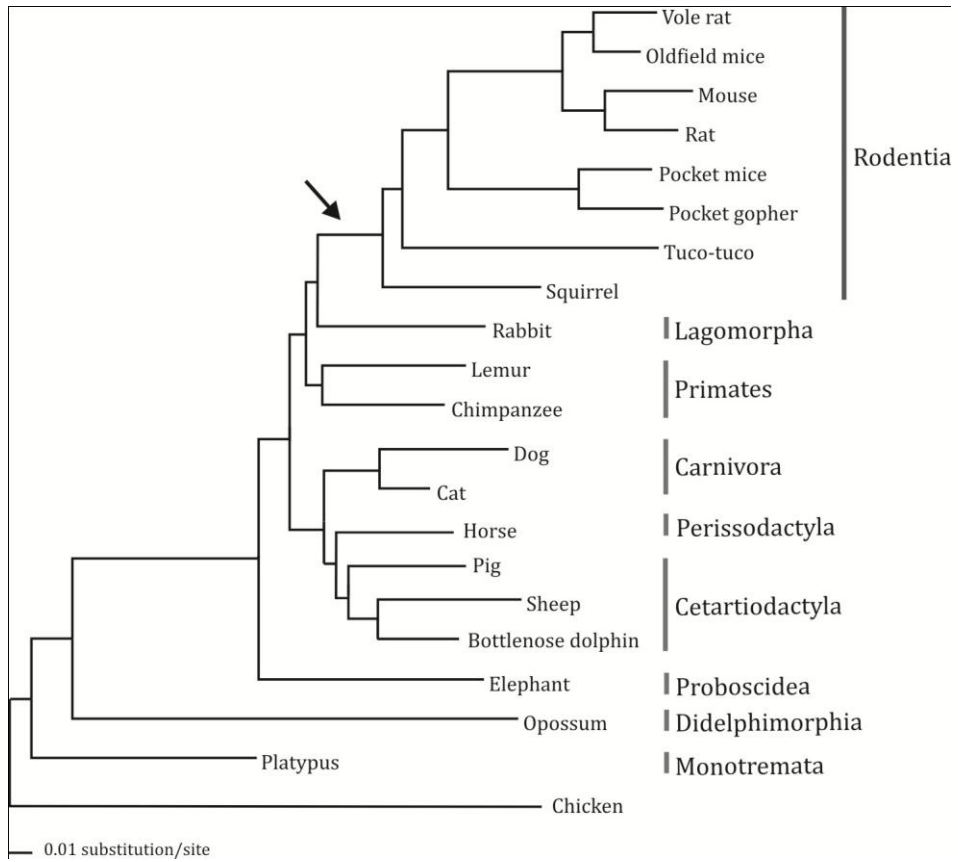


FIGURE 3-5.

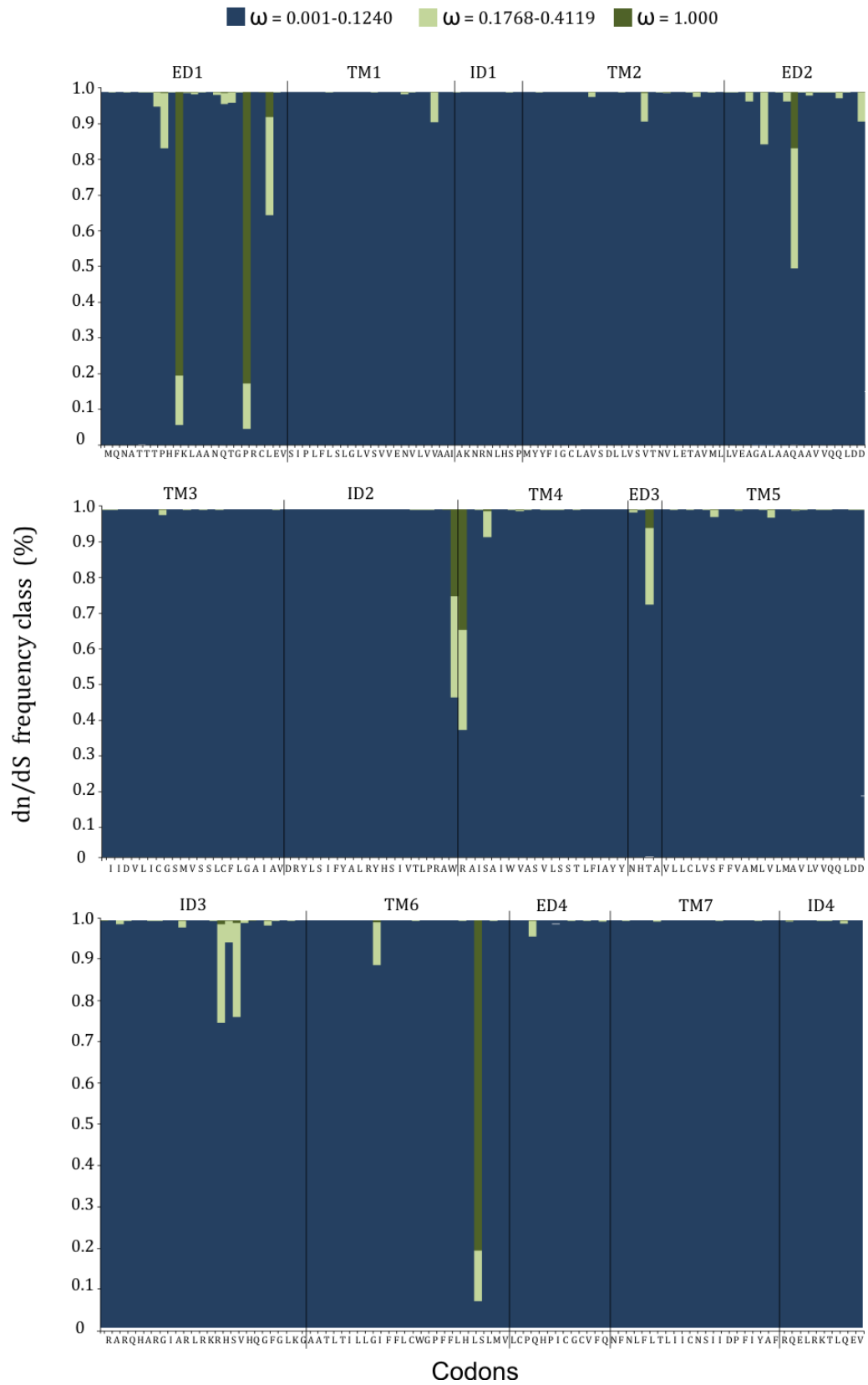


FIGURE 3-6.

TABLE 3-1

Domain	No. of sites	Variable sites	Conserved sites	Mean p-distance between groups \pm SE		
				M vs. birds	M vs. reptiles	M vs. fishes
ED1	41	37	1	0.78 \pm 0.08	0.76 \pm 0.09	0.92 \pm 0.06
ED2	19	0	3	0.58 \pm 0.10	0.58 \pm 0.11	0.64 \pm 0.10
ED3	4	4	0	0.76 \pm 0.16	0.14 \pm 0.04	0.54 \pm 0.32
ED4	14	10	4	0.53 \pm 0.12	0.44 \pm 0.13	0.60 \pm 0.13
ED total	78	51	8	0.66 \pm 0.11	0.48 \pm 0.09	0.67 \pm 0.15
ID1	9	5	4	0.12 \pm 0.13	0.11 \pm 0.11	0.12 \pm 0.12
ID2	22	12	10	0.20 \pm 0.08	0.29 \pm 0.09	0.25 \pm 0.08
ID3	27	23	4	0.66 \pm 0.09	0.67 \pm 0.08	0.66 \pm 0.09
ID4	12	9	6	0.17 \pm 0.08	0.13 \pm 0.07	0.23 \pm 0.09
ID total	70	49	24	0.28 \pm 0.09	0.30 \pm 0.08	0.32 \pm 0.09
TM1	25	17	8	0.24 \pm 0.08	0.39 \pm 0.09	0.30 \pm 0.08
TM2	27	18	9	0.37 \pm 0.07	0.30 \pm 0.08	0.29 \pm 0.07
TM3	22	16	6	0.27 \pm 0.07	0.40 \pm 0.09	0.36 \pm 0.09
TM4	21	19	2	0.54 \pm 0.09	0.55 \pm 0.09	0.53 \pm 0.10
TM5	25	21	4	0.34 \pm 0.08	0.43 \pm 0.09	0.46 \pm 0.09
TM6	25	15	10	0.22 \pm 0.07	0.18 \pm 0.07	0.19 \pm 0.07
TM7	22	16	6	0.24 \pm 0.08	0.38 \pm 0.10	0.27 \pm 0.08
TM total	167	122	45	0.31 \pm 0.07	0.37 \pm 0.08	0.34 \pm 0.08
<i>Mc1r</i> -total	315	222	77	0.41 \pm 0.02	0.44 \pm 0.03	0.40 \pm 0.03

TABLE 3-2

Class	Order	Average	Codon position		
			1st	2nd	3rd
Mammalia		60.0	57.5	39.5	83.0
	Rodentia	57.7	55.6	38.6	78.7
	Lagomorpha	64.3	59.3	42.8	90.8
	Primates	62.6	59.4	40.9	87.6
	Cetartiodactyla	64.1	60.9	40.3	91.0
	Perissodactyla	60.9	58.3	37.8	86.5
	Carnivora	62.9	61.4	40.8	86.5
	Proboscidea	60.9	58.7	42.3	81.7
	Didelphimorphia	49.5	47.6	33.8	67.2
	Monotremata	63.1	55.6	38.6	95.2
Aves		61.7	52.9	38.0	94.3
Reptilia		56.5	45.1	37.4	87.1
Actinopterygii		52.1	47.7	34.7	74.0

TABLE 3-3

Domain	Model	dN/dS ^a	Estimates of parameters ^b	Positively selected sites	P
ED1	M3: discrete	0.3399	p0 = 0.1880, p1 = 0.6585, p2 = 0.1533 ω0 = 0.0083, ω1 = 0.2681, ω2 = 1.0543	9 H, 25 K*, 37 R*	<0.001
ED2	M3: discrete	0.4009	p0 = 0.2192, p1 = 0.2073, p2 = 0.5734 ω0 = 0.0217, ω1 = 0.0217, ω2 = 0.4139	None	<0.001
ED3	M3: discrete	0.1076	p0 = 0.0917, p = 0.7969, q = 0.1113 ω0 = 0.0000, ω1 = 0.0518, ω2 = 0.5950	None	<0.001
ED4	M3: discrete	0.0470	p0 = 0.5429, p1 = 0.4571, p2 = 0.0000 ω0 = 0.0039, ω1 = 0.0980, ω2 = 0.1784	None	<0.001
ID1	M3: discrete	0.1396	p0 = 0.1122, p1 = 0.6859, p2 = 0.2017 ω0 = 0.0043, ω1 = 0.0448, ω2 = 0.5370	None	<0.001
ID2	M3: discrete	0.0522	p0 = 0.5284, p1 = 0.4253, p2 = 0.0462 ω0 = 0.0000, ω1 = 0.0742, ω2 = 0.4460	None	<0.001
ID3	M3: discrete	0.1590	p0 = 0.5290, p1 = 0.3553, p2 = 0.1156 ω0 = 0.0467, ω1 = 0.1521, ω2 = 0.6931	None	<0.001
ID4	M0: one-ratio	0.0663	Not allowed	Not allowed	<0.001
TM1	M3: discrete	0.0788	p0 = 0.5265, p1 = 0.2637, p2 = 0.2097 ω0 = 0.0021, ω1 = 0.0782, ω2 = 0.2721	None	<0.001
TM2	M3: discrete	0.1358	p0 = 0.3856, p1 = 0.3015, p2 = 0.3128 ω0 = 0.0000, ω1 = 0.0742, ω2 = 0.3626	None	<0.001
TM3	M3: discrete	0.0985	p0 = 0.4048, p1 = 0.4846, p2 = 0.1105 ω0 = 0.0113, ω1 = 0.1174, ω2 = 0.3343	None	<0.001
TM4	M8: beta & ω>1	0.1316	p0= 0.99999 p= 0.34090 q= 2.17841 (p1= 0.00001) ω = 3.24369	None	< 0.05
TM5	M3: discrete	0.1489	p0 = 0.3755, p1 = 0.5754, p2 = 0.0490 ω0 = 0.0144, ω1 = 0.1922, ω2 = 0.6714	None	<0.001
TM6	M2: positive selection	0.3072	p0= 0.9123, p1= 0.0476, p2= 0.0400 ω= 0.0558, ω1= 1.0000 ω2= 5.2135	265 S*	0.006
TM7	M3: discrete	0.0304	p0 = 0.7234, p1 = 0.1703, p2 = 0.1062 ω0 = 0.0115, ω1 = 0.0437, ω2 = 0.1375	None	<0.001
MC1R total	M8: beta & ω>1	0.1371	p0= 0.97761 p= 0.56446 q= 4.11182 (p1= 0.02239) ω = 1.00000	25 K*, 37 R*, 265 S*	0.002

^adN/dS ratio is the average across all codons; ^bParentheses indicate not free parameters;

*Posterior probabilities >95%

TABLE 3-4

Site class	Proportion	Branch type 0 (Rodents)	Branch type 1 (Other mammals)
0	0.5518	ω : 0.0250	ω : 0.0250
1	0.0431	ω : 1.0000	ω : 1.0000
2	0.4050	ω : 0.2132	ω : 0.2289

TABLE S3-1.

Domínio	LnL											
	M0	vs	M3	P	M1a	vs	M2a	P	M7	vs	M8	P
ED1	-948,988		-920,000	***	-930,927		-943,617	NS	-925,263		-925,263	NS
ED2	-725,754		-702,082	***	-706,748		-712,897	NS	-700,717		-700,596	NS
ED3	-368,192		-356,724	***	-360,154		-360,154	NS	362,379		-358,348	NS
ED4	-341,839		-331,039	***	-341,009		-341,009	NS	-332,154		-332,154	NS
ID1	-249,912		-239,196	***	-240,469		-241,123	NS	-239,836		-238,320	NS
ID2	-733,668		-710,554	***	-725,419		-725,419	NS	-712,317		-712,080	NS
ID3	-1041,046		-1017,405	***	-1021,122		-1021,392	NS	-1021,043		-1018,646	NS
ID4	-282,744		-281,651	NS	-282,744		-282,744	NS	-281,946		-281,946	NS
TM1	-668,678		-652,941	***	-665,626		-662,669	*	-650,409		-650,409	NS
TM2	-911,375		-887,766	***	-901,193		-901,682	NS	-888,728		-888,728	NS
TM3	-709,062		-699,027	***	-706,097		-707,056	NS	-699,630		-699,632	NS
TM4	-862,582		-838,055	***	-845,928		-845,928	NS	-842,624		-839,268	**
TM5	-986,245		-967,632	***	-979,898		-979,898	NS	-968,316		-968,316	NS
TM6	-795,006		-749,048	**	-762,443		-757,980	**	-754,780		-747,990	***
TM7	-656,869		-644,731	***	-658,270		-658,270	NS	-643,724		-645,920	NS
Mc1r total	-11426,790		-11140,191	***	-11290,535		-11290,535	NS	-11139,066		-11133,562	**

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

TABLE S3-2.

Order	Family	Species	GenBank Accession No.	
Lagomorpha	Leporidae	<i>Lepus capensis</i>	HQ005375	
		<i>Lepus castroviejoii</i>	HQ005374	
		<i>Lepus mediterraneus</i>	HQ005377	
		<i>Lepus saxatilis</i>	HQ005376	
		<i>Oryctolagus cuniculus</i>	FN658679	
Primates	Atelidae	<i>Alouatta caraya</i>	AY205134	
	Aotidae	<i>Aotus</i> sp.	AY205129	
	Cebidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	AY205114	
	Cercopithecidae	<i>Macaca mulatta</i>	AY205103	
	Hominidae	<i>Pan troglodytes</i>	AY205086	
	Hylobatidae	<i>Hylobates lar</i>	AY205089	
	Lemuridae	<i>Lemur catta</i>	AY205143	
	Lorisidae	<i>Loris tardigradus</i>	AY205137	
	Rodentia	Cricetidae	<i>Eothenomys melanogaster</i>	GU001573
			<i>Peromyscus maniculatus</i>	GQ337977
<i>Peromyscus polionotus</i>			FJ389440	
Ctenomyidae		<i>Ctenomys australis</i>	JF910108	
		<i>Ctenomys boliviensis</i>	JF910109	
		<i>Ctenomys chasiquensis</i>	JF910110	
		<i>Ctenomys dorbygni</i>	JF910111	
		<i>Ctenomys flamarioni</i>	JF910112	
		<i>Ctenomys haigi</i>	JF910113	
		<i>Ctenomys lami</i>	JF910114	
		<i>Ctenomys leucodon</i>	JF910115	
		<i>Ctenomys maulinus</i>	JF910116	
		<i>Ctenomys mendocinus</i>	JF910117	
		<i>Ctenomys minutus</i>	JF910118	
		<i>Ctenomys nattereri</i>	JF910119	
<i>Ctenomys pearsoni</i>	JF910120			
<i>Ctenomys perrensi</i>	JF910121			
<i>Ctenomys porteousi</i>	JF910122			
<i>Ctenomys rionegrensis</i>	JF910123			
<i>Ctenomys roigi</i>	JF910124			
<i>Ctenomys sociabilis</i>	JF910125			
<i>Ctenomys steinbachi</i>	JF910126			
<i>Ctenomys talarum</i>	JF910127			
<i>Ctenomys torquatus</i>	JF910128			

Continuação

	Geomyidae	<i>Thomomys bottae</i>	EF488834
	Heteromyidae	<i>Chaetodipus baileyi</i>	AY258938
		<i>Chaetodipus intermedius</i>	AY247634
		<i>Chaetodipus penicillatus</i>	AY258934
	Muridae	<i>Meriones unguiculatus</i>	AY800269
		<i>Mus booduga</i>	AB306316
		<i>Mus fragilicaudata</i>	AB306317
		<i>Mus terricolor</i>	AB306318
		<i>Mus caroli</i>	AB306319
		<i>Mus cervicolor</i>	AB306320
		<i>Mus cookii</i>	AB306321
		<i>Mus musculus</i>	AB306322
		<i>Mus mattheyi</i>	AB306323
		<i>Mus pahari</i>	AB306324
		<i>Mus platythrix</i>	AB306325
		<i>Rattus norvegicus</i>	AB306978
		<i>Rattus rattus</i>	AB576624
		<i>Rattus tanezumi</i>	AB576604
	Sciuridae	<i>Sciurus carolinensis</i>	EU604831
Carnivora	Felidae	<i>Felis catus</i>	AY237395
		<i>Herpailurus yaguarondi</i>	AY237399
		<i>Panthera onca</i>	AY237396
	Canidae	<i>Alopex lagopus</i>	AJ786717
		<i>Canis lupes</i>	AF064455
		<i>Vulpes vulpes</i>	X90844
Cetartiodactyla	Balaenopteridae	<i>Megaptera novaeangliae</i>	FJ773312
	Bovidae	<i>Ovis canadensis</i>	FJ773345
	Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	FJ773351
	Delphinidae	<i>Tursiops truncatus</i>	FJ773290
	Giraffidae	<i>Giraffa camelopardalis</i>	FJ773356
	Pontoporiidae	<i>Pontoporia blainvillei</i>	FJ773308
	Suidae	<i>Sus scrofa</i>	AF326520
Proboscidea	Elephantidae	<i>Elephas maximus</i>	DQ648866
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis</i> sp.	ENSEMBL
Monotremata	Ornithorhynchidae	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	ENSEMBL

CAPÍTULO 4

VARIAÇÃO ADAPTATIVA NA COLORAÇÃO DA PELAGEM ENTRE ESPÉCIES DE *CTENOMYS*

Gislene L. Gonçalves¹, Matias S. Mora² e Thales R. O. Freitas¹

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9.500, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

²Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Casilla de Correo 1245, Funes 3250. 7600 Mar del Plata, Argentina

Manuscrito em preparação: *Biological Journal of the Linnean Society*

Resumo

A coloração da pelagem em mamíferos proporciona um sistema promissor para investigar os mecanismos evolutivos responsáveis por adaptações. Neste estudo é investigada a similaridade de coloração da pelagem-substrato e características do habitat em dois pares de espécies de roedores subterrâneos com fenótipo claro (*C. australis-C. flamarioni*) e escuro (*C. talarum-C. minutus*), que ocorrem em simpatria no ambiente costeiro. Especificamente, são caracterizadas variações nas regiões do dorso, flanco e ventre em relação ao padrão de distribuição de eumelanina e feumenalina depositadas no pelo individual, através de medições do comprimento das bandas terminal e subterminal. Também, quantificou-se a densidade de pigmento tanto no pelo (banda terminal e subterminal), como na pelagem geral, e do substrato, utilizando o método de densitometria por pixels. Ainda, é comparada a variável cobertura vegetal entre os quatro habitats, de forma a caracterizar convergência também em nível macroecológico. Os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os fenótipos claro e escuro, com o aumento proporcional no comprimento da banda terminal do dorso nas espécies claras, e a redução nos fenótipos escuros. Também, foram encontradas diferenças significativas na densidade de pigmento depositado na banda terminal do pelo do dorso, e da pelagem entre fenótipos, onde a menor densidade foi verificada nos indivíduos claros. Ainda, verificou-se forte associação entre a coloração do substrato e da pelagem entre as quatro espécies analisadas para o dorso ($R^2 = 0.87$; $P < 0.001$), flanco ($R^2 = 0.71$; $P < 0.001$) e ventre ($R^2 = 0.57$; $P < 0.001$). Por fim, diferenças entre os habitats foram observadas em

relação à cobertura vegetal, onde dois grupos conspícuos foram evidenciados: campos e dunas. Juntos estes resultados evidenciam mecanismos convergentes evolutivamente independentes nas quatro espécies para a geração de fenótipos crípticos ao substrato. Dessa forma, a convergência fenotípica entre espécies expostas a pressões ambientais semelhantes sugere que tais características evoluíram por seleção natural.

Palavras-chave: convergência, cripsis, evolução, predação, sobrevivência diferencial

Introdução

Ao longo da trajetória evolutiva pressões seletivas similares podem ocasionar a ocorrência independente de características idênticas, ou próximas, em espécies distantemente relacionadas, evento referido como convergência fenotípica (Christin et al., 2010). O aumento recente no uso de abordagens genéticas e/ou filogenéticas evidencia diversos exemplos de evolução repetida de características adaptativas, incluindo, por exemplo, o múltiplo surgimento do olho (Fernald, 2006; Kozmik, 2008), ecolocação em morcegos e golfinhos (Li et al., 2010; Liu et al., 2010), mimetismo em borboletas para interações mutualísticas (Baxter et al., 2008), convergência em plantas em algumas características de flor (Rosin & Kramer, 2009; Whittall et al., 2006), evolução independente de determinadas propriedades protéicas (Doolittle, 1994; Gherardini et al., 2007) e modificação da pigmentação em vertebrados (Hubbard et al., 2010; Protas. et al. 2006; Rosenblum. et al., 2010; Steiner et al. 2009).

O significado adaptativo da coloração da pelagem em pequenos mamíferos é descrito como a tendência geral de assemelhar-se a cor do substrato (Cott, 1940; Endler, 1978). Tal proximidade de colorações já foi caracterizada em diferentes espécies em relação à variação geográfica da cor da pelagem (e.g. Benson, 1933; Bowen, 1968; Dice & Blossom, 1937; Engstrom & Choate, 1979; Ingles, 1950; Kennerly, 1954), à clina altitudinal de coloração (Getz, 1957; Hoffmeister, 1956), e a padrões de cor entre espécies proximamente relacionadas (Kennerly, 1959). Entretanto, poucos estudos demonstraram experimentalmente que a predação diferencial sobre formas conspícuas pode atuar como fator responsável pela variação na coloração da pelagem em pequenos mamíferos (Dice,

1947; Kaufman, 1974a, b, 1975; Vignieri et al. 2010). Inicialmente considerou-se que espécies subterrâneas, ao contrário daquelas que vivem na superfície, estariam menos expostas a pressão seletiva, a qual pode afetar a coloração da pelagem, tal como predação, ou condições climáticas (Heth et al., 1988). Entretanto, diversos estudos encontraram correspondência entre a variação na coloração da pelagem em roedores subterrâneos e a cor do substrato, por exemplo, em *Thomomys* (Ingles, 1950), *Geomys* (Kennerly, 1954, 1959; Krupa & Geluso, 2000) e *Spalax* (Heth et al., 1988). Portanto, estas evidências sugerem que a pressão seletiva pode afetar a coloração da pelagem em espécies subterrâneas, quando em atividade na superfície. Contudo, são necessários estudos comparados de forma a compreender os mecanismos e processos responsáveis por esta variação.

Os roedores subterrâneos sul-americanos do gênero *Ctenomys* representam um sistema conspícuo para estudar aos mecanismos evolutivos responsáveis pela convergência na coloração da pelagem. Um exemplo característico de variação adaptativa é verificado em dois sistemas simpátricos de espécies distantemente relacionadas: *C. talarum* vs. *C. australis* e *C. minutus* vs. *C. flamarioni*, que habitam o ambiente costeiro do sul do Brasil e Argentina (Fig.4-1). *Ctenomys flamarioni* e *C. australis* ocorrem na primeira linha de dunas arenosas litorâneas, enquanto *C. minutus* e *C. talarum* habitam campos arenosos continentais adjacentes às dunas (Busch et al., 1989; Freitas, 1995a; Malizia et al., 1991) (Fig. 4-2).

Enquanto o hábitat litorâneo é caracterizado pela coloração mais clara do substrato e menor cobertura vegetal, os campos possuem substrato escuro e maior cobertura vegetal (Cutrera et al., 2010; Malizia et al., 1991). Assim, os fenótipos claro e escuro

evidenciados nestas espécies supostamente representam repetida adaptação ao hábitat ocupado, cuja função ecológica é potencialmente o comportamento críptico anti-predação (Langguth & Abella, 1970; Vassalo et al., 1994). Embora diversos estudos previamente mencionados já tenham descrito a associação da cor da pelagem com o substrato em roedores subterrâneos, os mecanismos que levam a modificação da coloração geral de um dado indivíduo ainda não foram explorados em detalhe, o que é explorado neste estudo.

Os roedores possuem pelagem tipo *Agouti*, onde o pelo individual é caracterizado por uma banda terminal escura e uma banda subterminal clara, indicando distribuição diferencial de pigmento (Manceau et al., 2010). Dessa forma, diferentes variáveis do pelo podem ser substrato para a seleção, tal como o tamanho das bandas e a densidade de pigmento, gerando os fenótipos caracterizados com claros e escuros. Até o presente, apenas um estudo demonstrou que a alteração na distribuição de pigmento depositado no pelo é responsável pela variação na coloração geral, em *Peromyscus* (Linnen et al., 2009). Assim, este estudo tem como objetivos investigar as variações no pelo, em escala-fina, em dois pares de espécies de tuco-tucos (*C. talarum*-*C. australis*; *C. minutus*-*C. flamarioni*), sendo os fenótipos claros convergentes. Especificamente, são caracterizadas as colorações dos espécimes e o respectivo substrato, bem como a distribuição e densidade do pigmento depositado no pelo individual. Tais resultados permitem fazer inferências sobre a convergência em nível de mecanismo na geração de fenótipos similares sob um contexto ecológico.

Material e Métodos

Procedimento experimental.—Um total de 123 espécimes de *Ctenomys* (*C. flamarioni*, n = 35; *C. minutus*, n = 40; *C. australis*, n = 28; *C. talarum*, n = 20) foi analisado neste estudo

(Tab. 4-1). Utilizou-se tanto peles taxidermizadas de indivíduos coletados em campo como material depositado nas coleções da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP), e do Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia” (MCNLS). Para cada espécime, foram analisadas três regiões corporais distintas: dorso, flanco e ventre (Fig 4-3). Estas regiões foram determinadas de maneira a inferir pressões seletivas atuando em distintas partes do corpo, uma vez que possuem influência diferencial na coloração geral do indivíduo (i.e. dorso e flanco possuem maior significado evolutivo [Linnen et al., 2009; Manceau et al., 2010]).

Determinação da coloração.—Em vertebrados, o espectro visível de cor varia tipicamente de 400 a 700nm (azul ao vermelho) (Krupa & Geluso, 2000). Utilizou-se, portanto, tal faixa de análise para mensurar a cor da pelagem de *Ctenomys* e do substrato. Valores representativos foram obtidos através do método de densitometria por pixels, cuja unidade é definida como Gray, para o vermelho, verde e azul (red, green e blue; RGB). As unidades amostrais (pelagem e substrato) foram fotografadas junto ao cartão universal de cores Munsell (X-Rite Inc.), cujo objetivo é corrigir (i.e. tornar comparável) o valor obtido utilizando como referência a estimativa padronizada do preto e o branco (Fig. 4-3), através da seguinte fórmula:

$$\text{Cor}_{\text{calculada}} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{preto}}{\text{branco} - \text{preto}}$$

As fotografias foram analisadas no software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss Microimaging System Inc.), onde a área central foi demarcada utilizando a ferramenta *outline spline* e os valores densitométricos gerados para os pixels vermelho, verde e azul.

Para cada amostra foram desenvolvidas três medições, e então calculadas as médias para cada pixel. Ao final, calculou-se a média global dos pixels RGB para utilização nas análises posteriores.

Análise do pelo individual.—Foram preparadas lâminas microscópicas para os 123 indivíduos contendo 10 pelos-guarda removidos da região central do dorso, flanco e ventre de cada espécime. Par tal, os pelos lavados em etanol 50% e incluídos em esmalte incolor, sob lamínula. Cada lâmina foi fotografada com uma câmera Sony®Cybershot DS20 acoplada ao microscópio estereoscópico Leica® M125, usando o aumento 0.8 X para o pelo em si, e 10 X para as imagens das bandas terminal e subterminal. As fotografias foram analisadas no software AxioVision 4.8, onde foram mensurados: (i) comprimento total, (ii) comprimento da banda terminal e (iii) comprimento da banda subterminal. Também, foram analisados os valores densitométricos do pigmento depositado na banda terminal e subterminal, fixando a mesma região analisada (maior diâmetro do pelo) para todas as espécies.

Caracterização do habitat.—Para coletar amostras de solo, delineou-se aleatoriamente um transecto de 80m em uma área de habitat característica para *C. flamarioni* (Xangri-lá, Brasil, 29°47'S, 50°01'W), *C. minutus* (Osório, Brasil, 29°31'S, 50°32'W), *C. australis* (Necochea, Argentina, 38°03'S; 57°49'W) e *C. talarum* (Necochea, Argentina, 38°02'S; 57°56'W). A cada 10 m obteve-se uma amostra de solo da superfície, armazenadas e identificadas em tubos tipo falcon de 15 ml. Também, foram coletadas aleatoriamente oito amostras das tocas de cada espécie, de forma a comparar o solo da superfície com o subterrâneo. Todas as 64 amostras foram depositadas individualmente em placas de Petri, identificadas e desidratadas em estufa a 58°C durante 24h. Para

análise da cobertura vegetal, fotografou-se uma área específica em cada um dos oito postos de coleta de solo de *C. minutus* e *C. flamarioni*, utilizando-se como referência uma trena de 1m no centro da imagem, de forma a padronizar a área (1m²) para as 16 amostras. A porcentagem da cobertura vegetal foi estimada utilizando o método de Braun-Blanquet (1932). Para a comparação com *C. australis* e *C. talarum* utilizou-se dados descritos em estudo prévio (Cutrera et al., 2010).

Análise estatística. —Primeiramente, avaliou-se o ajuste da distribuição normal das amostras, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, e a homocedasticidade das variâncias, com o teste de Bartlett. A maior parte dos dados ajustou-se a uma curva normal, entretanto, foi verificada significativa heterogeneidade nas variâncias para a maioria dos casos. Assim, os dados foram categorizados como não paramétricos. Para comparações internas no dorso, flanco e ventre das diferenças da variação observada no comprimento e densitometria do pelo/pelagem, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pareadas de Dunn ($P < 0.05$), com correção de Bonferroni. Também, foi utilizado este teste para comparar características do hábitat (coloração do substrato e cobertura vegetal) entre as quatro espécies. Para inferir sobre associação da cor do substrato com a pelagem do dorso, flanco e ventre utilizou-se uma análise de regressão linear simples.

Todas as análises estatísticas foram desenvolvidas no software XLSTAT (Addinsoft). Os dados quanto ao comprimento do pelo e densitometria do pelo/pelagem e substrato são apresentados através do método gráfico do tipo *box-plots*, incluindo os valores máximo e mínimo, mediana, primeiro e terceiro quartis. Os demais valores são representados pela média (\bar{x}) \pm erro padrão (EP).

Resultados

Distribuição do pigmento no pelo. — Conforme já apontado por Linnen et al. (2009), os pigmentos eumelanina (escuro) e feumelanina (claro) são depositados nos pelos do tipo *Agouti* de forma alternada, iniciando com pequena banda escura (= terminal), seguido de uma banda clara (= subterminal), e finalizando com outra banda escura que compõe a base. O limite de distribuição da banda terminal e subterminal varia, resultando em pelagens mais claras ou escuras nas espécies de tuco-tuco analisadas.

Em *Ctenomys*, identificou-se pelos *Agouti* típico, com o padrão de três bandas apenas na região dorsal (Fig. 4-4). A banda terminal é ausente em pelos do flanco e ventre. Em particular, *C. flamarioni* possui quase ausência de pigmento nos pelos do ventre, caracterizados pela coloração única de feumelanina (Fig. 4-4). Nas demais espécies, flanco e ventre possuem padrão de duas bandas (subterminal clara, base escura), sendo a primeira com menor densidade de pigmento em relação ao dorso (Fig. 4-4).

Foram observadas diferenças significativas na distribuição (= comprimento) das bandas terminal e subterminal entre os fenótipos claro e escuro das espécies de *Ctenomys* analisadas (Fig. 4-4; 4-5AB; 4-6). *Ctenomys talarum* e *C. minutus* possuem maior comprimento proporcional de banda terminal (21.04 ± 0.63 ; 18.88 ± 1.12 , respectivamente) e menor subterminal (43.19 ± 1.94 ; 67.47 ± 2.69 , respectivamente) do dorso. Inversamente, *C. australis* e *C. flamarioni* apresentam valores proporcionalmente menores para a banda terminal (9.44 ± 0.24 ; 8.72 ± 0.37 , respectivamente) e maiores para subterminal (83.02 ± 1.87 ; 82.83 ± 2.73 , respectivamente) em tal região (Fig.4-4; 4-6). Por

outro lado, a banda subterminal do flanco e ventre não variou de forma significativa (também em proporção) entre os fenótipos (Fig.4-6).

Densidade do pigmento no pelo/pelagem. —Foram observadas diferenças significativas na densidade (= coloração) da pelagem dorsal entre as quatro espécies de *Ctenomys*, em particular entre fenótipos similares (Fig. 4-7C). *C. talarum* e *C. minutus* apresentaram valores significativamente menores (26.3 ± 1.31 ; 45.9 ± 1.13 , respectivamente) em relação a *C. australis* (75.2 ± 1.47) e *C. flamarioni* (111.8 ± 1.24). Dessa forma, *C. talarum* representa o fenótipo mais escuro, e *C. flamarioni* o mais claro.

Quanto ao flanco nos fenótipos claro e escuro, *C. talarum* (69.40 ± 3.176) e *C. minutus* (54.81 ± 1.15) não diferiram significativamente, ao contrário de *C. australis* (100.06 ± 2.51) e *C. flamarioni* (137.15 ± 2.42), que diferiram entre si (Fig. 4-7C). Em relação ao ventre, não houve um padrão de diferenciação entre fenótipos claro e escuro (*C. talarum*, 101.1 ± 3.35 ; *C. minutus*, 85.8 ± 2.57 ; *C. australis*, 109.3 ± 2.50). Contrariamente, *C. flamarioni* (148.9 ± 1.91) apresentou diferenças em relação às demais espécies, potencialmente devido ao padrão de pigmentação reduzida característica dos pelos do ventre, gerando um fenótipo extremamente claro (Fig. 4-4; 4-7C). Em relação à densidade de pigmento na banda terminal, foram observadas diferenças significativas entre as quatro espécies (Fig.4-7A): fenótipos escuros (*C. talarum*, 92.77 ± 1.27 ; *C. minutus*, 66.88 ± 2.15) apresentaram valores mais baixos em relação aos claros (*C. australis*, 135.8 ± 1.72 ; *C. flamarioni*, 151.4 ± 1.53). Similarmente, para a banda subterminal verificou-se que fenótipos escuros apresentaram valores próximos (160.7 ± 0.89 ; 158.3 ± 1.65), assim com os claros (175.2 ± 1.62 ; 182.8 ± 1.10), formando dois grupos conspícuos (Fig.4-7B).

Estes resultados indicam a influência expressiva da densidade do pigmento depositado na ponta do pelo e na região subterminal sobre a coloração geral do indivíduo. Dessa forma, considera-se maior funcionalidade da região dorsal, e menos intensa, do flanco, restringindo à variação encontrada. Os resultados da densidade de pigmento depositado nos pelos do ventre reforçam tal hipótese, sendo que não foram verificadas diferenças significativas para banda subterminal (Fig.4-7B) e coloração geral (Fig. 4-7C), entre os fenótipos claro e escuro. Uma vez que o ventre é relativamente menos exposto quanto em atividade na superfície, a maior amplitude de variação encontrada nesta região, em relação ao flanco e dorso, potencialmente é resultado de relaxamento da pressão seletiva.

De forma a corroborar esta proposição, foram estimadas as variâncias em diversos parâmetros analisados (e.g. comprimento banda terminal, subterminal, total; densidade pigmento na banda terminal, subterminal para dorso, flanco e ventre), onde oito apresentaram heterogeneidade entre as quatro espécies (Tab. 4-2). Surpreendentemente, a maior parte (= 6) ocorreu em parâmetros incluindo as regiões do flanco e ventre. Dentre os dois únicos relacionados ao dorso, o primeiro (comprimento da banda terminal) apresentou os menores valores nas espécies com fenótipo claro (*C. australis*, σ^2 : 1.19; *C. flamarioni*, σ^2 : 2.83). Tal fato sugere maior pressão de seleção; portanto, uma restrição de variação neste fenótipo ocorrente na região de dunas, cuja coloração é fortemente críptica ao substrato (Tab. 4-2).

Em particular, espécies escuras apresentaram de 4 a 10 vezes maior variância (*C. talarum*, σ^2 : 8.24; *C. minutus*, σ^2 : 26.16) em relação às claras para o comprimento de banda terminal. Por outro lado, o segundo parâmetro (densitometria da banda

subterminal) apresentou variância similar em *C. australis* (σ^2 : 55.32) e *C. minutus* (σ^2 : 57.85), evidenciando, portanto, menor influencia na coloração geral, comparativamente a banda terminal.

Caracterização dos habitats: substrato e cobertura vegetal. —Foram verificadas diferenças significativas na coloração do substrato entre os habitats das quatro espécies de tuco-tucos (Fig.4-3). Não foram observadas diferenças significativas entre amostras de solos superfície e toca dentro dos dois habitats de campo (I-*C. talarum*, $P = 0.48$; II-*C. minutus*, $P = 0.35$) e dunas (I-*C. australis*, $P = 0.06$; II-*C. talarum*, $P = 0.06$), o que confere adequada representatividade para as amostras obtidas nos transectos. Similar à coloração da pelagem dorsal, o substrato de *C. talarum* apresentou menor densidade (58.14 ± 1.94), enquanto aquele de *C. flamarioni*, a mais elevada (111.06 ± 0.83) (Tab.4-3).

Adicionalmente, a análise de regressão linear indicou forte associação ($R^2 = 0.87$; $P < 0.001$) da coloração do substrato com a pelagem dorsal e do flanco ($R^2 = 0.71$; $P < 0.001$), e moderada com o ventre ($R^2 = 0.57$; $P < 0.001$), sendo esta principalmente influenciada pelos valores da pelagem de *C. flamarioni* em relação às demais espécies.

Em relação à cobertura vegetal, dois grupos distintos foram evidenciados: campos e dunas, sendo que as estimativas das áreas de campos (I, 57.18 ± 16.12 ; II, 60.50 ± 12.31) foram duas vezes maior em relação ao litoral (I, 25.31 ± 11.36 ; II, 30.50 ± 10.72), e não diferiram significativamente ($P > 0.05$) entre habitats similares (Tab.4-3).

Discussão

Variação adaptativa na coloração.—Os tucos-tucos possuem hábito predominantemente fossorial, entretanto, também ocorrem na superfície, em particular para forrageamento nas áreas adjacentes as tocas e dispersão (Busch et al., 2000; Comparatore, 1991). Altos níveis de mobilidade na superfície foram descritos para *C. talarum* (Busch et al., 1989), *C. australis* (Vassalo et al., 1994) e *C. flamarioni* (Fernández-Stolz et al., 2007; Stolz, 2006). Entretanto, as atividades desenvolvidas por estas espécies diferem daquelas verificadas em outros roedores fossoriais, tal como o gênero *Spalax*, cuja exposição à superfície é reconhecida como acidental (Heth, 1991). Assim, a alta frequência de atividade no ambiente exterior nos tuco-tucos sugere que a predação seja mais comum do que previamente assumida.

Estudos anteriores revelaram que os ctenomídeos são frequentemente predados por diversos vertebrados, por exemplo, coruja (*Athene cunicularia*), graxaim-do-campo (*Pseudalopex gymnocercus*), furão (*Galictis cuja*), gambá (*Didelphis albiventris*), zorrilho (*Conepatus chinga*), tatu (*Chaetophractus vellerosus*) e jararaca-pintada (*Bothrops newwidii*) (Busch et al., 2000). Vassalo et al. (1994) verificaram que *C. talarum* e *C. australis* representam 16% e 2%, respectivamente, dos itens de presas de corujas (*Athene cunicularia*, *Asio flammeus* e *Tyto alba*). O principal atributo sugerido para tal diferença foi o tamanho corporal significativamente diferente de *C. talarum* (ca. 118g) e *C. australis* (ca. 360g), onde a predação sobre este último ocorria apenas em indivíduos subadultos, devido, entre outros aspectos, a limitação do predador em carregar a presa (Vassalo et al., 1994). Entretanto, não existem dados sobre a influência do comportamento críptico

nestas espécies em evitar a predação (i.e. sobrevivência diferencial), sobre a consequente dependência dos habitats.

De acordo com os dados deste estudo, as bandas de pelos do dorso apresentam diferenças significativas em relação aquelas do flanco e ventre entre fenótipos claro e escuro, tanto para distribuição como densidade de pigmento, evidenciando fundamental significado biológico (restrições seletivas) desta região. Além disso, as menores variâncias ocorrem em espécies com fenótipos claros; então, a coloração dorsal de *C. australis* e *C. flamarioni* apresenta maior restrição a alterações. Portanto, mudanças sutis na coloração da pelagem nas duas espécies com fenótipo claro, contrastando com o habitat de dunas, cuja cobertura vegetal é reduzida (i.e. expõe mais o indivíduo em atividade), pode ter reflexo imediato na taxa de captura por predação, o que resta ser testado. Adicionalmente, *C. australis* e *C. flamarioni* possuem as maiores taxas de dispersão reportadas (Stolz, 2006; Vassalo 1998), reforçando a necessidade do comportamento críptico, em acordo com a maior pressão seletiva existente sobre este sistema.

Em contraste, os dados obtidos para *C. talarum* e *C. minutus* evidenciaram maior amplitude de variação, o que pode refletir a complexidade do habitat com maior cobertura vegetal, possibilitando a dissimulação no ambiente, não necessariamente pela coloração geral do indivíduo. Em outras palavras, mudanças sutis na coloração destas espécies provavelmente não desempenham efeito intenso na sobrevivência diferencial. Adicionalmente, um aspecto relevante em *C. minutus* é a observação empírica de que indivíduos jovens (2-3 meses de idade) possuem coloração mais clara em relação aos adultos (Fonseca, 2003). Tal aspecto corrobora a hipótese de adaptação local cuja função

é proteção destes indivíduos que, em geral, são os principais alvos de predação (Vassalo et al., 1994).

Seleção ou restrição de habitat?—As espécies pareadas analisadas neste estudo ocorrem em simpatria no ambiente costeiro. Para *C. australis* e *C. talarum*, existem dados de segregação microespaciais através de diferentes preferências de tipo de solo (Vassalo, 1998), e quantidade/qualidade do alimento disponível na área habitada (Cutrera et al., 2010). *C. australis* possui maior tamanho corporal (Busch et al., 2000) e habita solos menos resistentes, cuja produtividade primária é reduzida (Cutrera et al., 2010). Por outro lado, *C. talarum* ocorre em solos rígidos, com cobertura vegetal densa e diversa (Malizia et al., 1991). Estudos prévios demonstraram que o custo energético escavatório é semelhante nestas duas espécies, mesmo em diferentes tipos de solos (Luna & Antinuchi, 2007). Portanto, a energia dispendida não demonstra ser o principal fator na seleção do tipo de solo em *C. talarum* e *C. australis*. *C. flamarioni* habita solos arenosos menos resistentes, cuja granulometria é menor em relação ao substrato de *C. minutus* (Rebelato, 2006). Por outro lado, aspectos de segregação em escala fina do habitat não foram amplamente explorados nestas espécies.

A atividade escavatória e composição do solo evidenciam diferenças, entretanto, não significativas, entre *C. flamarioni* e *C. minutus* (Rebelato, 2006). Dessa forma, indícios de forte associação na coloração do substrato com a pelagem dorsal em cada uma das espécies, demonstrando uma adaptação em conjunto em escala fina, sugere que o comportamento críptico é um fator potencial que influencia a dependência dos habitats, sendo a coloração uma variável significativa neste contexto, anterior à seleção pela atividade escavatória e/ou composição do solo. Consequentemente, cada uma das

espécies restringe-se ao correspondente hábitat devido à desvantagem de contrastar com o substrato, especialmente considerando-se a alta atividade dos tuco-tucos na superfície. Portanto, a equivalência de nichos ecológicos verificado em *C. talarum*-*C. minutus* e *C. australis*-*C. flamarioni* são evidências de repetida ocupação e adaptação local em habitats dinâmicos (e.g. Planície Costeira do sul do Brasil; Tomazelli & Villwock, 2000), cujos atributos populacionais, ecologia e demografia, variam no tempo e espaço. Neste contexto, o fator ecológico fixo responsável pela manutenção destas adaptações locais é potencialmente a sobrevivência diferencial.

Convergência evolutiva em Ctenomys. —A convergência fenotípica observada entre espécies ocorre em diferentes níveis taxonômicos: entre espécies evolutivamente distantes (e.g. mimetismo em membros de diferentes ordens de insetos [Wickler, 1968]) e entre táxons proximamente relacionados (e.g. ecomorfos dos lagartos do gênero *Anolis* nas ilhas do Caribe [Losos, 2011; Losos et al., 1998; Roughgarden, 1995; Williams, 1972]). O evento de convergência na coloração da pelagem e substrato reportado neste estudo com tuco-tucos ocorre tanto entre espécies filogeneticamente mais próximas, em particular *C. australis* e *C. flamarioni*, como distantemente relacionadas, como *C. talarum* e *C. minutus* (Fig. 4-1).

Ctenomys australis e *C. flamarioni* pertencem ao grupo filogenético caracterizado como Mendocinus, definido através de características morfológicas (e.g. espermatozóide assimétrico), cariotípicas ($2n = 47-48$; padrões similares de banda G e C), e dados moleculares (Castillo et al., 2005; D'Elia et al., 1999; Freitas, 1994; Lessa & Cook, 1998; Massarini & Freitas, 2005; Parada et al., 2011). Tal similaridade de caracteres levou a questionamentos se estas espécies seriam filogeneticamente irmãs (Freitas, 1994, 1995a;

Fernández-Stolz, 2007; Malizia et al., 1991; Mora et al., 2006). Entretanto, estudos comparados da morfologia do crânio revelaram diferenças morfológicas significativas (Fornel 2009; Massarini & Freitas, 1995, 2005; Travi & Freitas, 1984). Adicionalmente, foi proposto que *C. flamarioni* teria especiado a partir de uma forma ancestral proveniente da Argentina, por migração, isolamento e diferenciação posterior de *C. australis* (Freitas, 1994; Massarini & Freitas, 2005). Esta migração teria acontecido no Pleistoceno, quando a planície costeira era aproximadamente 100 km mais ampla em relação ao período atual e se encontrava sob condições de aridez, de forma que o Rio da Prata não representava uma barreira geográfica expressiva (Corrêa et al., 1992). Entretanto, dados recentes sobre as relações evolutivas do grupo *Mendocinus* (originalmente descrito por Massarini et al. [1991] compreendendo as espécies *C. australis*, *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. porteousi*. *Ctenomys flamarioni* e *C. rionegrensis* foram incluídos posteriormente [D'Elia et al., 1999]) e posicionam *C. flamarioni* distante de *C. australis*, evidenciando a proximidade deste com as espécies originalmente descritas no grupo (i.e. *C. mendocinus* e *C. porteousi*) (Parada et al., 2011).

Dessa forma, a convergência verificada em *C. australis* e *C. flamarioni* em termos de tamanho corporal e coloração clara representa uma provável evolução repetida na ocupação do ambiente costeiro, e não a retenção de um caráter ancestral. A redução no tamanho das bandas terminal e subterminal do pelo, bem como a menor densidade de pigmento em ambas as estruturas proporcionam a diluição da coloração geral dos indivíduos, tornando-os mais pálidos. Entretanto, existem diferenças significativas em escala-fina entre estas espécies. *Ctenomys australis* possui fenótipo mais escuro que *C. flamarioni*, cuja correspondência é diretamente refletida no substrato também mais

escuro. Assim, os dados gerados neste estudo demonstram que os mecanismos de convergência fenotípica foram muito similares sob o mesmo contexto ecológico. Similarmente, os dados evidenciam trajetórias evolutivas análogas na geração de fenótipos escuros em *C. talarum* e *C. minutus*. Estas espécies são filogeneticamente distantes (Parada et al., 2011), e convergem em termos de tamanho corporal, habitat ocupado, coloração da pelagem e substrato. Além disso, são as únicas espécies de tuco-tucos com evidência de simpatria e aparente justaposição de áreas (Vassalo et al., 1994; Freitas, 1995a); no entanto, não há qualquer indício de híbridos na natureza. Surpreendentemente, os mecanismos utilizados para gerar fenótipos escuros são idênticos: aumento na distribuição de eumelanina na ponta do pelo (maior comprimento da banda terminal), e na densidade de feumelanina na banda subterminal. Estas duas mudanças aparentemente simples geram fenótipos potencialmente vantajosos em substratos escuros, cuja variação em escala fina é vinculada a facilidade de torna-se críptico em um ambiente mais complexo.

Embora os fatores determinantes do padrão de coloração em animais ainda sejam pouco compreendidos, são sugeridas três principais funções: (i) comunicação intraespecífica, (ii) evasão de predadores e (iii) termorregulação (Endler, 1978). Os tuco-tucos possuem hábito solitário e raramente estão em contato direto com outros indivíduos da mesma espécie, sendo sugerido que a comunicação química e vocal governa o comportamento reprodutivo nestes animais (Francescoli, 1999; Zenuto et al., 2004). Assim, assume-se que a coloração possui envolvimento pouco significativo na comunicação. Por outro lado, os resultados deste estudo indicam que o padrão de coloração da pelagem nas quatro espécies de tuco-tucos investigadas tem como

significado principal a evasão de predadores, possivelmente também contribuindo para melhor termorregulação. A função de cripsis é enfatizada pelas diferenças na coloração da pelagem em cada uma das quatro espécies, convergindo paralelamente para dois grupos: fenótipos claros e escuros. Ainda, suporte adicional provém da forte associação entre a coloração da pelagem e do substrato em *Ctenomys*. As diferenças verificadas na cobertura vegetal dos quatro habitats reforçam tal hipótese, na medida em que demonstram variação também em nível macro-ecológico, contribuindo para um ajuste fino de adaptação local único para cada táxon.

Dessa forma, os dados fornecem suporte suficiente para sugerir que a seleção natural é o principal fator evolutivo responsável pela convergência evolutiva observada nos tuco-tucos. Contudo, são necessárias investigações quantitativas envolvendo experimentos controlados para avaliar as taxas de captura por predação associadas ao comportamento críptico destas espécies. Assim, pode-se inferir de maneira concisa o efeito da coloração sobre esse aspecto fundamental da ecologia evolutiva: a sobrevivência diferencial de fenótipos crípticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Mariano Damián Romero (Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia”), pela permissão de coleta de amostras de pelo e fotografias de *C. australis* e *C. talarum*, Judy Chupasko (Museum of Comparative Zoology) pelo auxílio no armazenamento e preparo do material, Carla M. Lopes (UFRGS) pelo preparo de algumas peles taxidermizadas de *C. minutus*, Kim R. Barão (UFRGS) pelo auxílio na confecção do mapa, e Gilson R. P. Moreira (UFRGS) pelas sugestões de análise estatística e

leitura crítica do manuscrito. Este estudo foi financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM). GLG recebeu bolsa de doutorado do CNPq (141604/2007-7).

Referências Bibliográficas

- Baxter SW, Papa R, Chamberlain N, Humphray SJ, Joron M, Morrison C, ffrench-Constant RH, McMillan WO, Jiggins CD. 2008. Convergent evolution in the genetic basis of Mullerian mimicry in *Heliconius* butterflies. *Genetics* 180, 1567–1577.
- Benson SB. 1933. Concealing coloration among some desert rodents of the southwestern United States. *Univ Calif Berkeley Publ Zool* 40:1-70
- Bowen WW. 1968. Variation and evolution of Gulf Coast populations of beach mice *Peromyscus polionotus*. *Bull Fl State Mus Biol Sci* 12:1-91
- Braun-Blanquet J. 1932. *Plant sociology: the study of plant communities*. McGraw-Hill Publications in the Botanical Sciences. New York.
- Busch C, Antinuchi CD, Valle CJ, Kittle MJ, Malizia AI, Vassalo AI, Zenuto R. 2000. Population ecology of subterranean rodents. In: *Life underground, the biology of subterranean rodents*. In: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN, eds. *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: University of Chicago Press, 183-226.

- Busch C, Malizia AI, Scaglia AO, Reig OA. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 70: 204-208.
- Castillo AH, Cortinas MN, Lessa EP. 2005. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86: 170–179.
- Christin P-A, Weinreich DM, Besnard G. 2010. Causes and evolutionary significance of genetic convergence. *Trends in Genetics* 26: 400–405.
- Comparatore VM, Agnudsdei M, Busch C. 1991. Habitat relations in sympatric populations of *Ctenomys australis* and *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) in a natural grassland. *Mammalian Biology* 57: 47-55.
- Correa ICS, Baitelli R, Ketzer JM, Martins R. 1992. Translação horizontal e vertical do nível do mar sobre a plataforma continental do Rio Grande do Sul nos últimos 17.500 anos BP. *Anais III Congresso ABEQUA*: 225-240.
- Cott HB. 1940. *Adaptive coloration in animals*. Methuen: London.
- Cutrera AP, Mora MS, Antenucci CD, Vassallo AI. 2010. Intra- and interspecific variation in home-range size in sympatric tuco-tucos, *Ctenomys australis* and *C. talarum*. *Journal of Mammalogy* 91: 1425-1434.
- D'Elia G, Lessa EP, Cook JA. 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 19–38.

- Dice L, Blossom PM. 1937. Studies of mammalian ecology in southwestern North America, with special attention to the colors of the desert mammals. Carnegie Institution of Washington Publication 485: 1-25
- Dice LR. 1947. Effectiveness of selection by owls of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) which contrasts in color with their background. Contributions from the Laboratory of Vertebrate Biology, University of Michigan 34: 1-20.
- Doolittle RF. 1994. Convergent evolution: the need to be explicit. Trends in Biochemical Science 19: 15-18
- Endler JA. 1978. A predator's view of animal color patterns. In: Hecht MK, Steere WC, Wallace (eds) Evolutionary Biology, Vol 11. New York: Plenum Press. pp 319-364
- Engstrom MD, Choate JR. 1979. Systematics of the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) on the central Great Plains. Journal of Mammalogy 60: 723-739
- Fernald RD. 2006. Casting a genetic light on the evolution of eyes. Science 313: 1914-1918.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. Journal of Mammalogy 88: 935-945.
- Fernández-Stolz GP. 2007. Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae), através de marcadores moleculares

- microsatélites e DNA mitocondrial. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 193 pp.
- Fonseca MB. 2003. Biologia populacional e classificação etária do roedor subterrâneo tuco-tuco *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) na planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 110 pp.
- Fornel R. 2009. Evolução na forma e tamanho do crânio no gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. 171 pp.
- Francescoli G. 1999. A preliminary report on the acoustic communication in Uruguayan *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): basic sound types. *Bioacoustics* 10: 203-218
- Freitas TRO. 1994. Geographic variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. *Cytogenetics and Cell Genetics* 67: 193-198.
- Freitas TRO. 1995a. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 53-59.
- Freitas TRO. 1995b. Geographic distribution of sperm forms in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética* 18: 43-46
- Getz LL. 1957. Color variation in pocket gophers. *Thomomys*. *Journal of Mammalogy* 38: 523-526.

- Gherardini PF, Ausiello G, Helmer-Citterich M. 2007. Convergent evolution of enzyme active sites is not a rare phenomenon. *J. Mol. Biol.* 372, 817–845
- Heth G, Beiles A, Nevo E. 1988. Adaptive variation of pelage color within and between species of the subterranean mole rat (*Spalax ehrenbergi*) in Israel. *Oecologia* 74: 617-622.
- Heth G. 1991. Evidence of above-ground predation and age determination of the prey in subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi*) in Israel. *Mammalia* 55: 529-542.
- Hoffmeister DF. 1956. Mammals of the Graham (Pinaleno) Mountains. Arizona. *The American Midland Naturalist Journal* 55: 257-288
- Hubbard JK, Uy JA, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26: 231–239.
- Ingles LG. 1950. Pigmental variations in populations of pocket gophers. *Evolution* 4: 353-357
- Kaufman DW. 1975. Concealing coloration: how is effectiveness of selection related to conspicuousness. *The American Midland Naturalist Journal* 93: 245-247
- Kaufman DW. 1974a. Adaptive coloration in *Peromyscus polionotus*: experimental selection by owls. *Journal of Mammalogy* 55: 271-283
- Kaufman DW. 1974 b. Differential owl predation on white and agouti *Mus musculus*. *Auk* 91: 145-150

- Kennerly TE. Jr. 1954. Local differentiation in the pocket gopher (*Geomys personatus*) in southern Texas. *Texas Journal of Science* 6: 297-329
- Kennerly TE Jr. 1959. Contact between the ranges of two allopatric species of pocket gophers. *Evolution* 13:247-263
- Kozmik Z, Ruzickova J, Jonasova K, Matsumoto Y, Vopalensky P, Kozmikova I, Strnad H, Kawamura S, Piatigorsky J, Paces V, Vlcek C. 2008. Assembly of the cnidarian camera-type eye from vertebrate-like components. *Proceedings of National Academy of Science USA* 105: 8989–8993.
- Krupa JJ, Geluso KN. 2000. Matching the color of excavated soil: cryptic coloration in the plains pocket gopher (*Geomys bursarius*). *Journal of Mammalogy* 81: 86–96.
- Langguth A, Abella A. 1970. Sobre una poblacion de tuco-tucos melanicos (Rodentia-Octodontidae). *Acta Zoologica Lilloana*, 27:101-108.
- Lessa EP, Cook JA. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 88–99.
- Li Y, Liu Z, Shi P, Zhang J. 2010. The hearing gene *Prestin* unites echolocating bats and whales. *Current Biology* 20: R55–R56.
- Linnen CR, Kingsley EP, Jensen JD, Hoekstra HE. 2009. On the origin and spread of an adaptive allele in deer mice. *Science* 325: 1095–1098.
- Liu Y, Cotton JA, Shen B, Han X, Rossiter SJ, Zhang S. 2010. Convergent sequence evolution between echolocating bats and dolphins. *Current Biology* 20: R53–R54

- Losos JB, Jackman TR, Larson A, Queiroz K, Rodríguez-Schettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of island lizards. *Science* 279: 2115–2118.
- Losos JB. 2011. Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution* 65: 1827–1840
- Luna F, Antinuchi CD. 2007. Energy and distribution in subterranean rodents: sympatry between two species of the genus *Ctenomys*. *Comparative Biochemistry and Physiology, A. Comparative Physiology* 147: 948–954.
- Malizia AI, Vassallo AI, Busch C. 1991. Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriologica* 36: 87–94.
- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HE. 2010. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 2439–2450.
- Massarini AI, Barros MA, Ortells MO, Reig OA. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica* 83: 131–144.
- Massarini AI, Freitas TRO. 1995. Análise morfológica e citogenética de *C. flamarioni* e *C. australis* – duas espécies ecologicamente equivalentes (Rodentia: Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética* 18: 487.
- Massarini AI, Freitas TRO. 2005. Morphological and cytogenetics comparison in species of the mendocinus-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia* 58: 21–27.

- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87: 1192–1203.
- Parada A, D'Elía G, Bidau CJ, Lessa EP. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92: 671-682
- Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ. 2006. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics* 38: 107–111
- Rebelato GS. 2006. Análise ecomorfológica de quatro espécies de *Ctenomys* do sul do Brasil (Ctenomyidae - Rodentia). Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 146 pp.
- Rosenblum EB, Rompler H, Schoneberg T, Hoekstra HE. 2010. Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at white sands. *Proceedings of National Academy of Science USA* 107: 2113–2117.
- Rosin FM, Kramer EM. 2009. Old dogs, new tricks: regulatory evolution in conserved genetic modules leads to novel morphologies in plants. *Developmental Biology* 332: 25–36.
- Roughgarden J. 1995. *Anolis lizards of the Caribbean: ecology, evolution, and plate tectonics*. Oxford: Oxford University Press.

- Steiner CC, Römpler H, Boettger LM, Schöneberg T, Hoekstra HE. 2009. The genetic basis of phenotypic convergence in beach mice: similar pigment patterns but different genes. *Molecular Biology and Evolution* 26: 35–45.
- Stolz JFB. 2006. Dinâmica populacional e relações espaciais do tuco-tuco das dunas (*Ctenomys flamarioni*) (Rodentia-Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim-RS/Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 71 pp.
- Tomazelli LJ, Willwock JA. 2000. O Cenozóico no Rio Grande do Sul: geologia da planície costeira. In: Holz M & de Ros LF. Geologia do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CIGO/UFRGS. Pp. 375-406.
- Travi VH, Freitas TRO. 1984. Estudos citogenéticos e craniométricos de *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* (Rodentia: Octodontidae). *Ciência & Cultura* 36: 771.
- Vassallo AI. 1998. Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology* 244: 415–427.
- Vassalo AI, Kittlein MJ, Busch C. 1994. Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 75: 725-732.
- Vignieri SN, Larson J, Hoekstra HE. 2010. The selective advantage of cryptic coloration in mice. *Evolution* 64: 2153-2158

- Whittall JB, Voelckel C, Kliebenstein DJ, Hodges SA. 2006. Convergence, constraint and the role of gene expression during adaptive radiation: floral anthocyanins in *Aquilegia*. *Molecular Ecology* 15: 4645–4657.
- Wickler W. 1968. *Mimicry in plants and animals*. New York: McGraw-Hill.
- Williams E. 1972. The origin of faunas. Evolution of lizard congeners in a complex island fauna: a trial analysis. *Evolutionary Biology* 6: 47–89.
- Zenuto RR, Fanjul MS, Busch C. 2004. Use of chemical communication by the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco) during the breeding season. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2111-26.

Tabela 4-1. Espécimes de *Ctenomys* utilizados neste estudo.

Espécie	n	Identificação	Coleção científica*	Fenótipo	Habitat
<i>C. talarum</i>	20	UNMDP4; UNMDP5; UNMDP6; UNMDP7; UNMDP8; UNMDP9; UNMDP10; UNMDP11; UNMDP12; UNMDP13; UNMDP14; UNMDP15; UNMDP16; UNMDP17; MCNLS 93-1; MCNLS 93-3; MCNLS 93-2	UNMDP; MCNLS	escuro	Campos arenosos
<i>C. minutus</i>	40	TR579; TR639; TR640; TR641; TR642; TR643; TR644; TR645; TR646; TR647; TR648; TR649; TR650; TR651; TR652; TR653; TR654; TR655; TR656; TR657; TR1201; TR1202; TR1203; TR1207; TR1212; TR1219; TR1220; TR1221; TR1222; TR1225; LAMI2; TR1125; TR1126; TR1128; TR1129; TR1130; TR1132; TR1133; TR1137; TR1231	UFRGS-LCE	escuro	Campos arenosos e dunas litorâneas
<i>C. australis</i>	28	UNMDP 1-1; UNMDP 1-2; UNMDP 1-3; MCNLS 81-1; MCNLS 82-22; MCNLS 82-67; MCNLS 82-68; MCNLS 82- 69; MCNLS 82-71; MCNLS 82-238; MCNLS 82-239; MCNLS 82-240; MCNLS 82-241; MCNLS 82-242; MCNLS 82-243; MCNLS 82-244; MCNLS 82-245; MCNLS 84-20; MCNLS 84-23; MCNLS I-737; MCNLS I-740; MCNLS I- 1044; MCNLS 1; MCNLS 2; MCNLS 4; UNMDP 37; UNMDP 38; UNMDP 39	UNMDP; MCNLS	claro	Dunas litorâneas
<i>C. flamarioni</i>	35	PUC278; TR449; TR473; TR474; TR475; TR477; TR482; TR483; TR488; TR491; TR493; TR495; TR496; TR497; TR500; TR1152; TR1153; TR1154; DZRS01; G123; PUC408; TR476; TR478; TR479; TR480; TR484; TR485; TR489; TR490; TR494; TR498; TR499; TR1271; TR1272; TRN11, TRN12	UFRGS-LCE	claro	Dunas litorâneas

*UNMDP: Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina; MCNLS: Museo Municipal de Ciencias Naturales “Lorenzo Scaglia”, Argentina; UFRGS-LCE: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Citogenética e Evolução, Brasil.

Tabela 4-2. Análise de variância significativa entre espécies para diferentes parâmetros analisados.

Parâmetro	Espécie	Var.	χ^2_{calc}	P
Comprimento da banda terminal – dorso	<i>C. talarum</i>	8.24	45.72	<0.001
	<i>C. minutus</i>	26.16		
	<i>C. australis</i>	1.19		
	<i>C. flamarioni</i>	2.83		
Comprimento total do pelo individual – ventre	<i>C. talarum</i>	269.22	31.46	<0.001
	<i>C. minutus</i>	528.77		
	<i>C. australis</i>	191.98		
	<i>C. flamarioni</i>	28.29		
Comprimento da banda subterminal – flanco	<i>C. talarum</i>	22.25	9.10	0.02
	<i>C. minutus</i>	28.27		
	<i>C. australis</i>	31.85		
	<i>C. flamarioni</i>	76.89		
Comprimento da banda subterminal – ventre	<i>C. talarum</i>	15.31	7.92	0.04
	<i>C. minutus</i>	15.41		
	<i>C. australis</i>	4.68		
	<i>C. flamarioni</i>	8.83		
Densitometria da banda subterminal – dorso	<i>C. talarum</i>	16.85	9.38	0.02
	<i>C. minutus</i>	57.85		
	<i>C. australis</i>	55.32		
	<i>C. flamarioni</i>	25.74		
Densitometria da banda subterminal – flanco	<i>C. talarum</i>	22.25	9.10	0.02
	<i>C. minutus</i>	28.27		
	<i>C. australis</i>	31.85		
	<i>C. flamarioni</i>	76.89		
Densitometria da banda subterminal – ventre	<i>C. talarum</i>	15.31	7.92	0.04
	<i>C. minutus</i>	15.41		
	<i>C. australis</i>	4.68		
	<i>C. flamarioni</i>	8.83		
Densitometria da pelagem – flanco	<i>C. talarum</i>	211.99	16.58	0.001
	<i>C. minutus</i>	27.93		
	<i>C. australis</i>	132.68		
	<i>C. flamarioni</i>	123.96		

Tabela 4-3. Estimativas de média \pm erro padrão da coloração do substrato e cobertura vegetal nos habitats das quatro espécies de *Ctenomys* amostradas neste estudo. O tamanho amostral é indicado entre parênteses.

	Campos		Dunas		Kruskal-Wallis	
	I- <i>C. talarum</i>	II- <i>C. minutus</i>	I- <i>C. australis</i>	II- <i>C. flamarioni</i>	K_{obs}	P
Coloração substrato	58.14 \pm 2.00	70.77 \pm 1.78	82.03 \pm 1.37	111.06 \pm 0.85	53.37	< 0.001
Cobertura vegetal	57.18 \pm 16.12	60.50 \pm 12.31	25.31 \pm 17.36	30.50 \pm 10.72	43.56	< 0.001

I.



II.

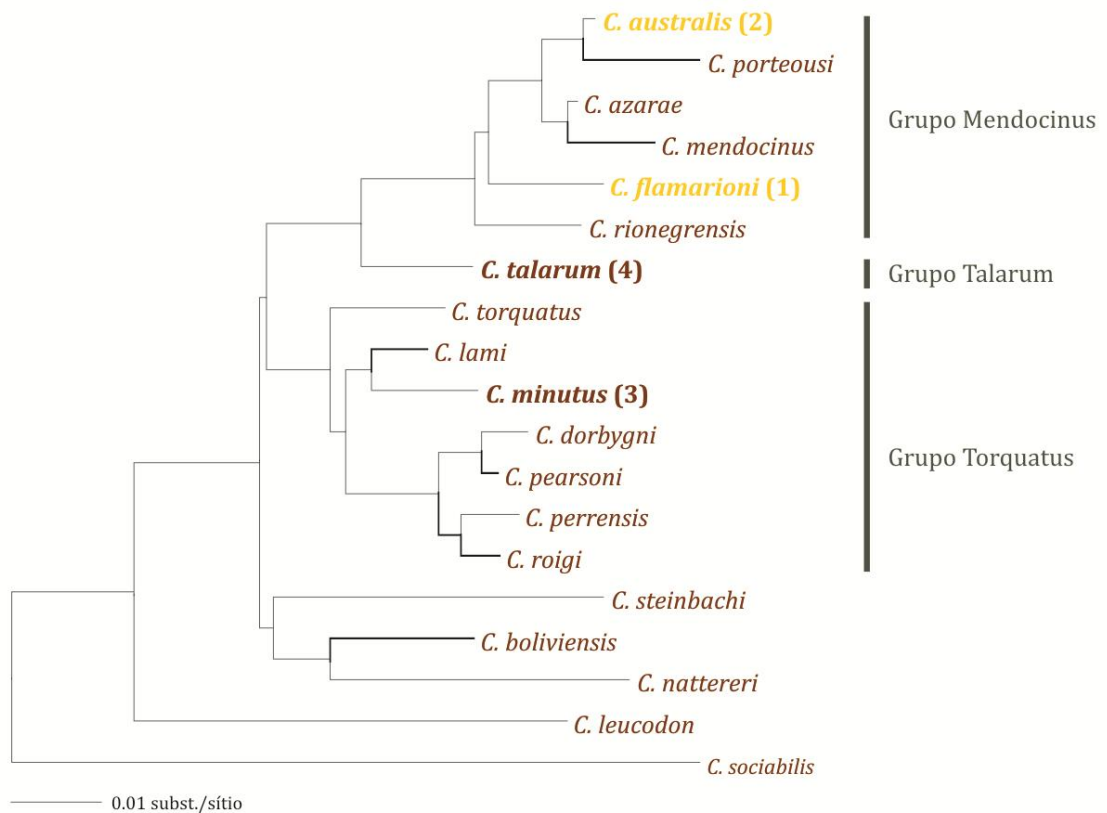


Figura 4-1. Representação esquemática da convergência evolutiva em espécies de *Ctenomys* utilizadas neste estudo. I) coloração da pelagem e tipo de habitat; 1, *C. flamarioni* e 2, *C. australis* indicam formas claras; A e B representam habitat de dunas litorâneas; 3, *C. minutus* e 4, *C. talarum* indicam fenótipos escuros; C e D representam habitat de campos arenosos. II) Relações evolutivas entre espécies de ctenomídeos, ressaltando a distancia genética dos táxons analisados (em negrito) e a coloração (marrom = fenótipo escuro; amarelo = fenótipo claro). A árvore foi reconstruída utilizando o método de máxima verossimilhança com dados de sequencias parciais do gene citocromo b.

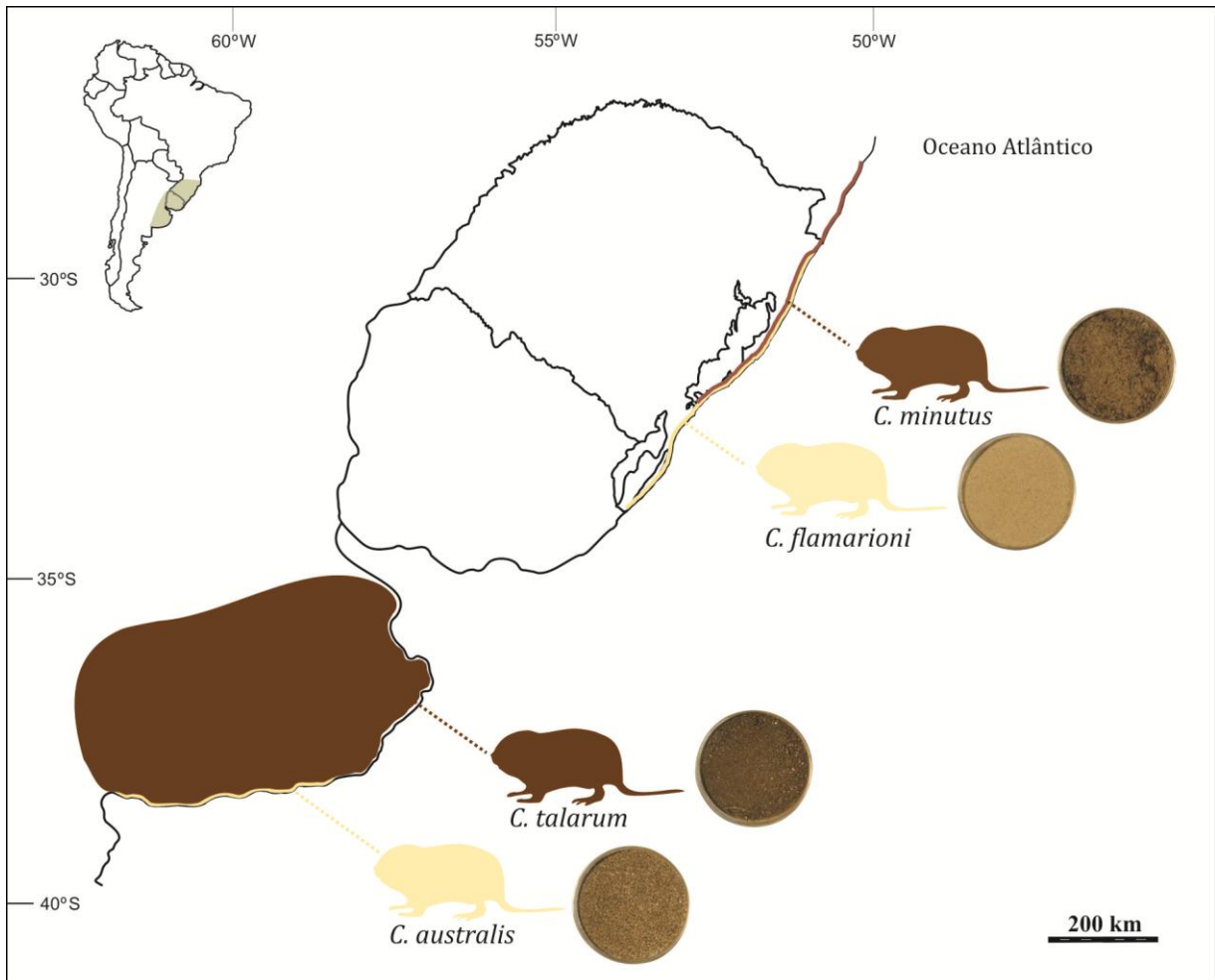


Figura 4-2. Representação esquemática da coloração da pelagem e do substrato, nas quatro espécies de *Ctenomys* analisadas neste estudo, evidenciando também a distribuição geográfica dos táxons.

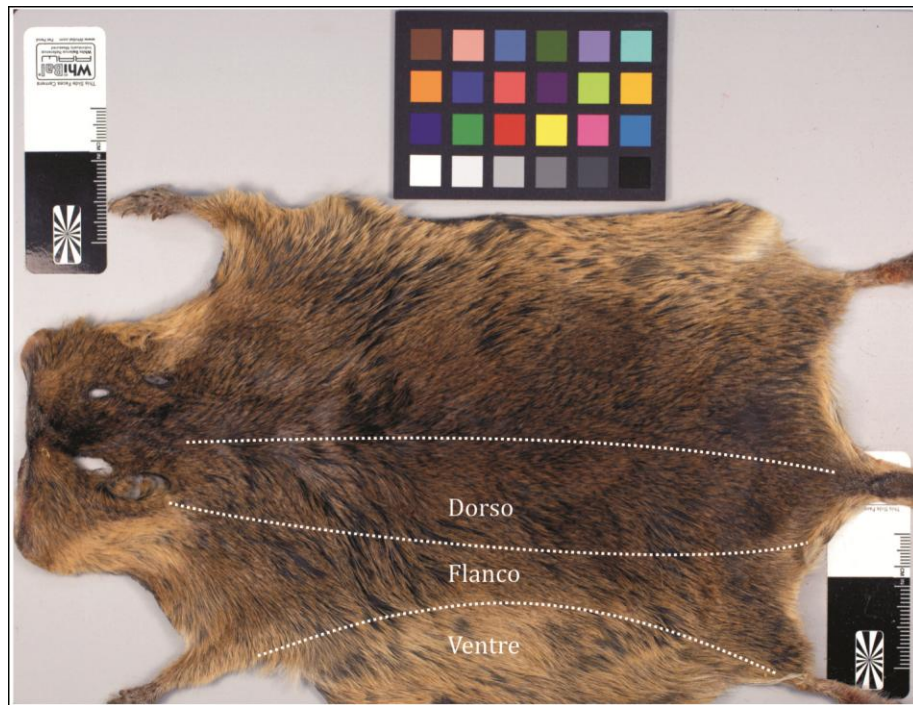


Figura 4-3. Representação das regiões analisadas em *Ctenomys* (dorso, flanco e ventre) em fotografia original usada para avaliar a coloração pelo método de densitometria, evidenciando o cartão de cores Munsell (X-Rite).

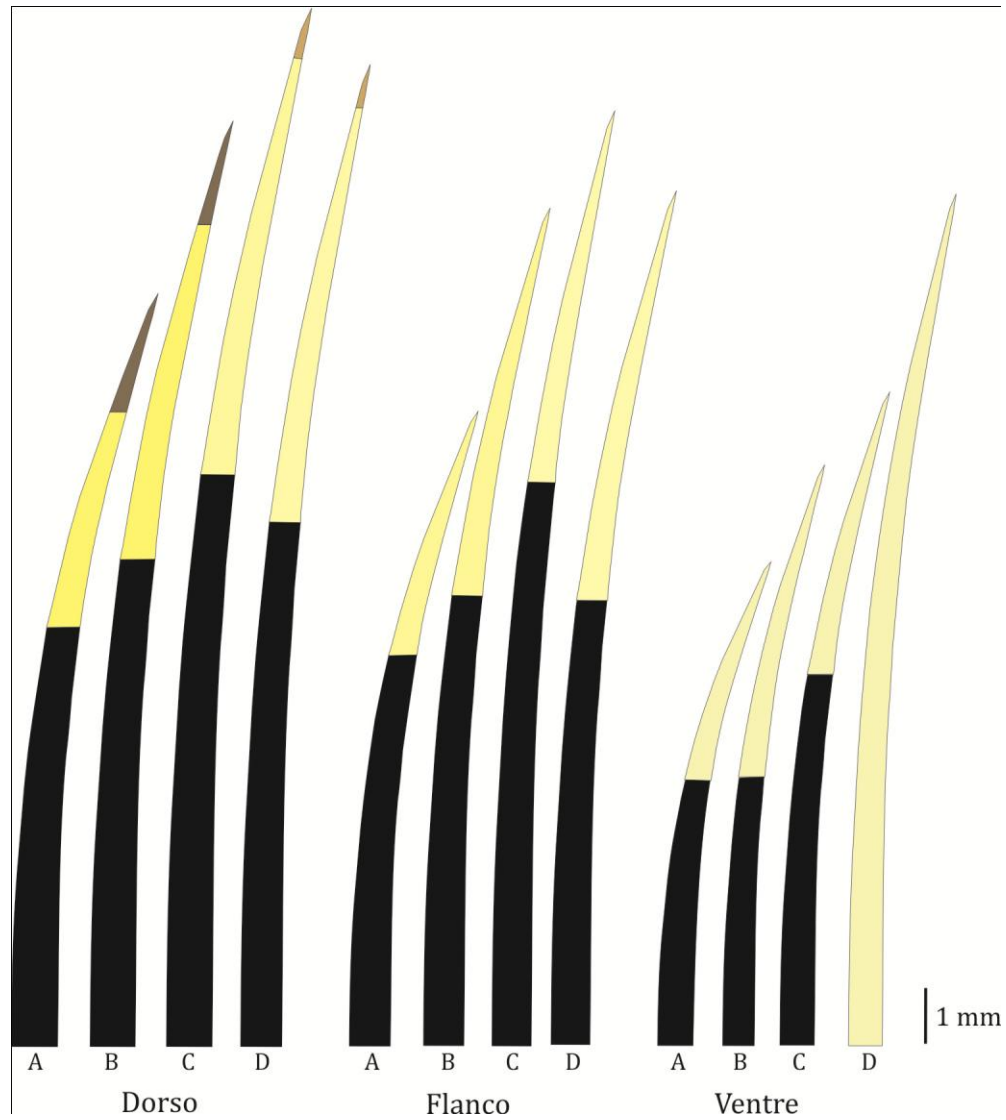


Figura 4-4. Representação esquemática dos pelos do dorso, flanco e ventre de *Ctenomys*; A) *C. talarum*; B) *C. minutus*; C) *C. australis*; D) *C. flamarioni*.

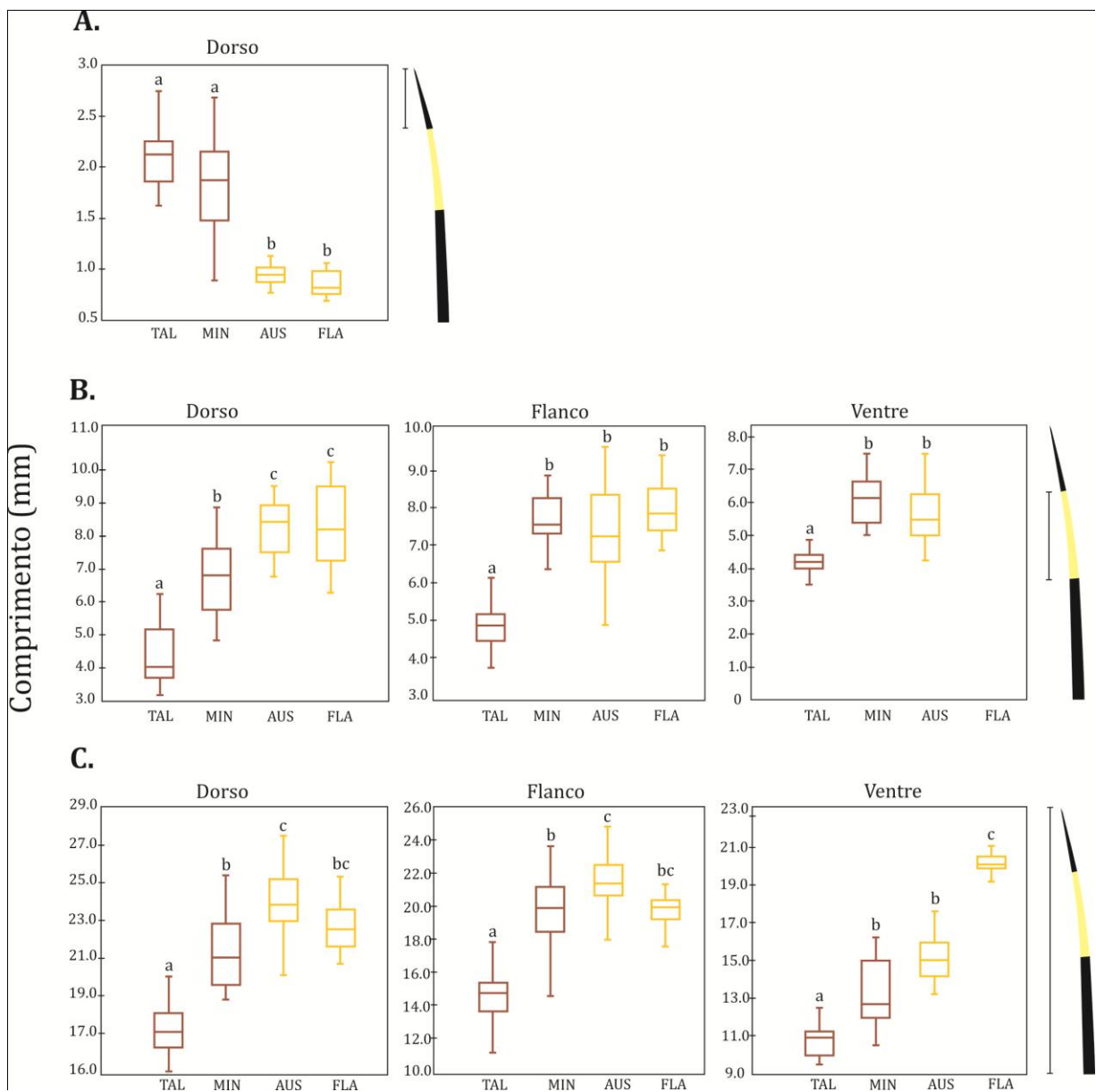


Figura 4-5. Representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada no comprimento da banda terminal(A), subterminal (B) e total (C) do pelo, nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo). O desenho esquemático no lado direito dos gráficos indica a região mensurada no pelo.

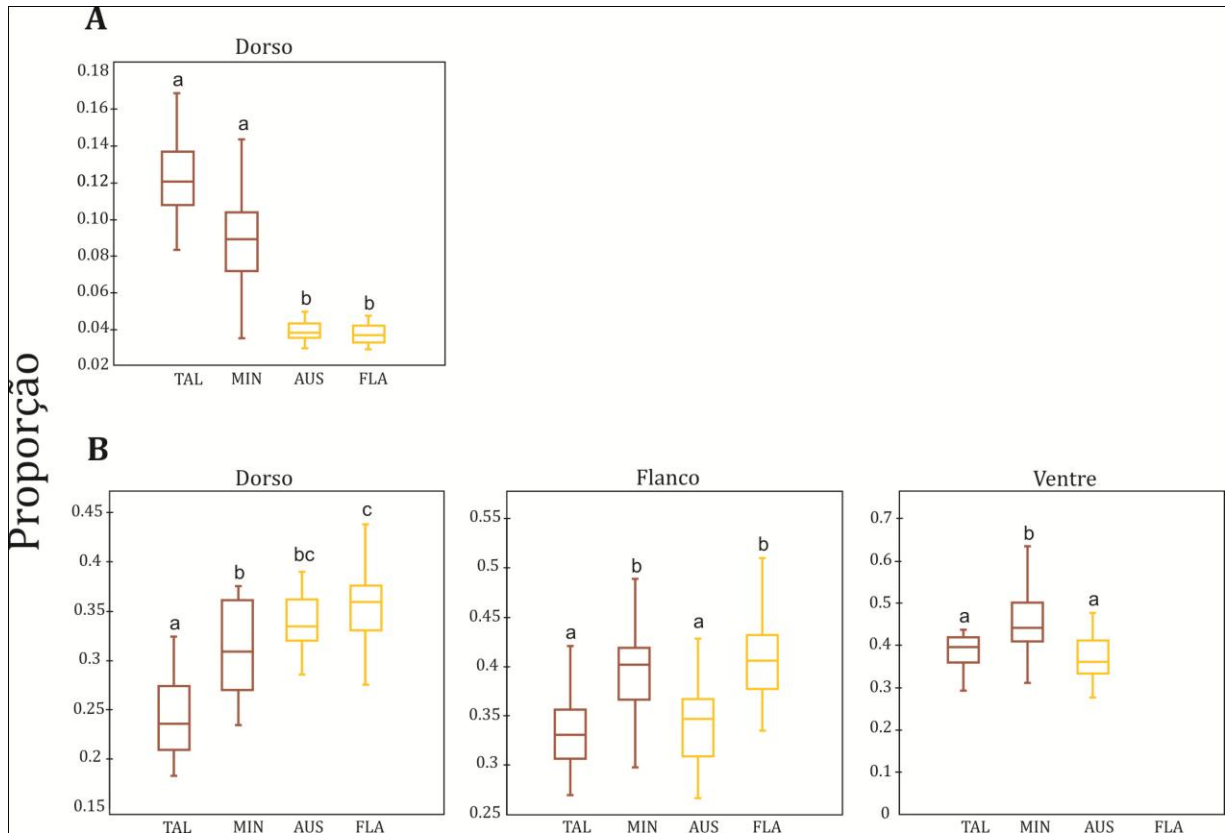


Figura 4-6. Representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada no comprimento proporcional das bandas terminal (A) e subterminal (B) nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo).

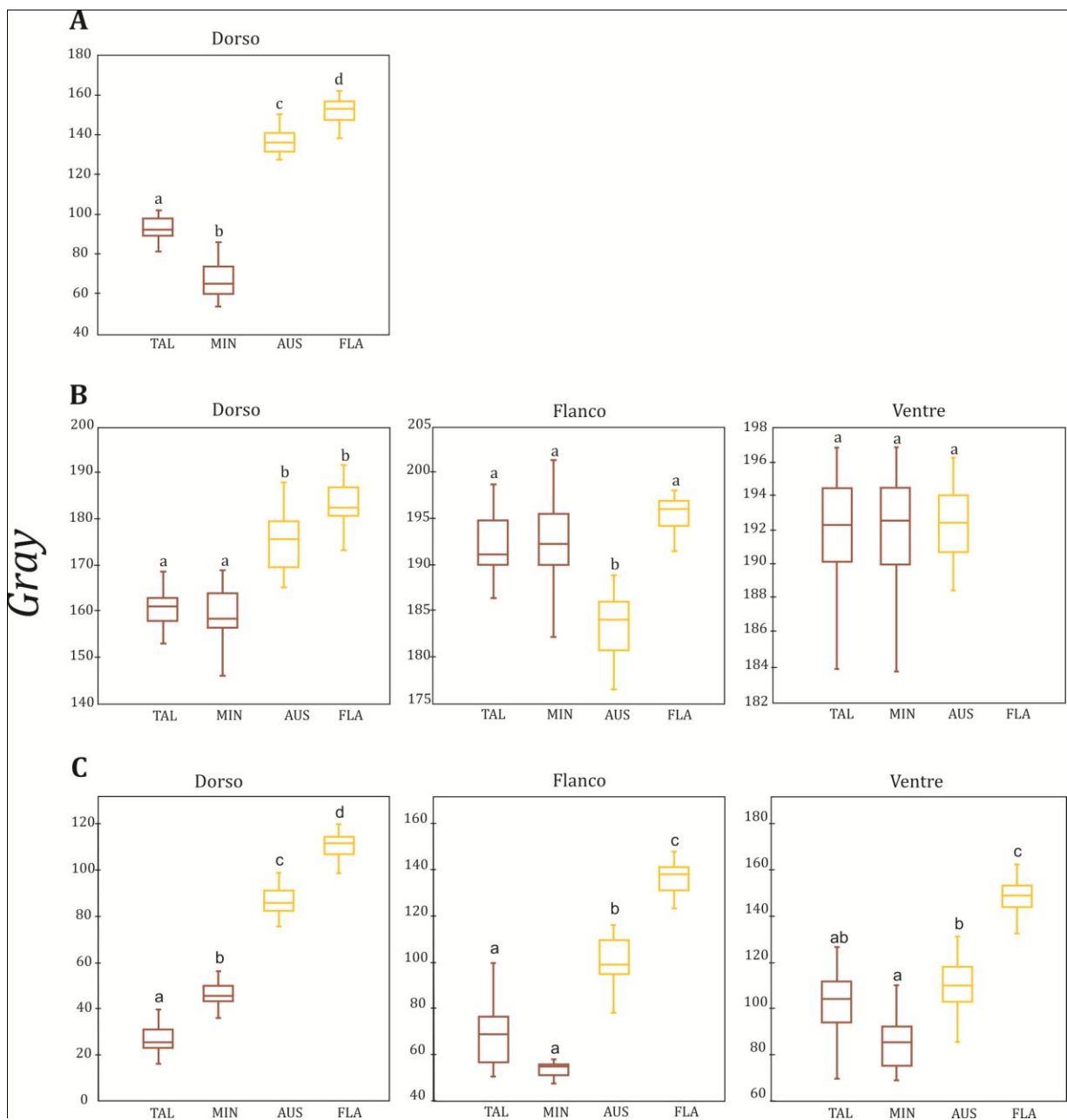


Figura 4-7. Representação por *Box-plots* da variabilidade na densidade do pelo para as bandas terminal (A) e subterminal (B), e para pelagem (C) nas quatro espécies de *Ctenomys*: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*; FLA, *C. flamarioni*, evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de cada região corporal analisada (dorso, flanco e ventre). As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo).

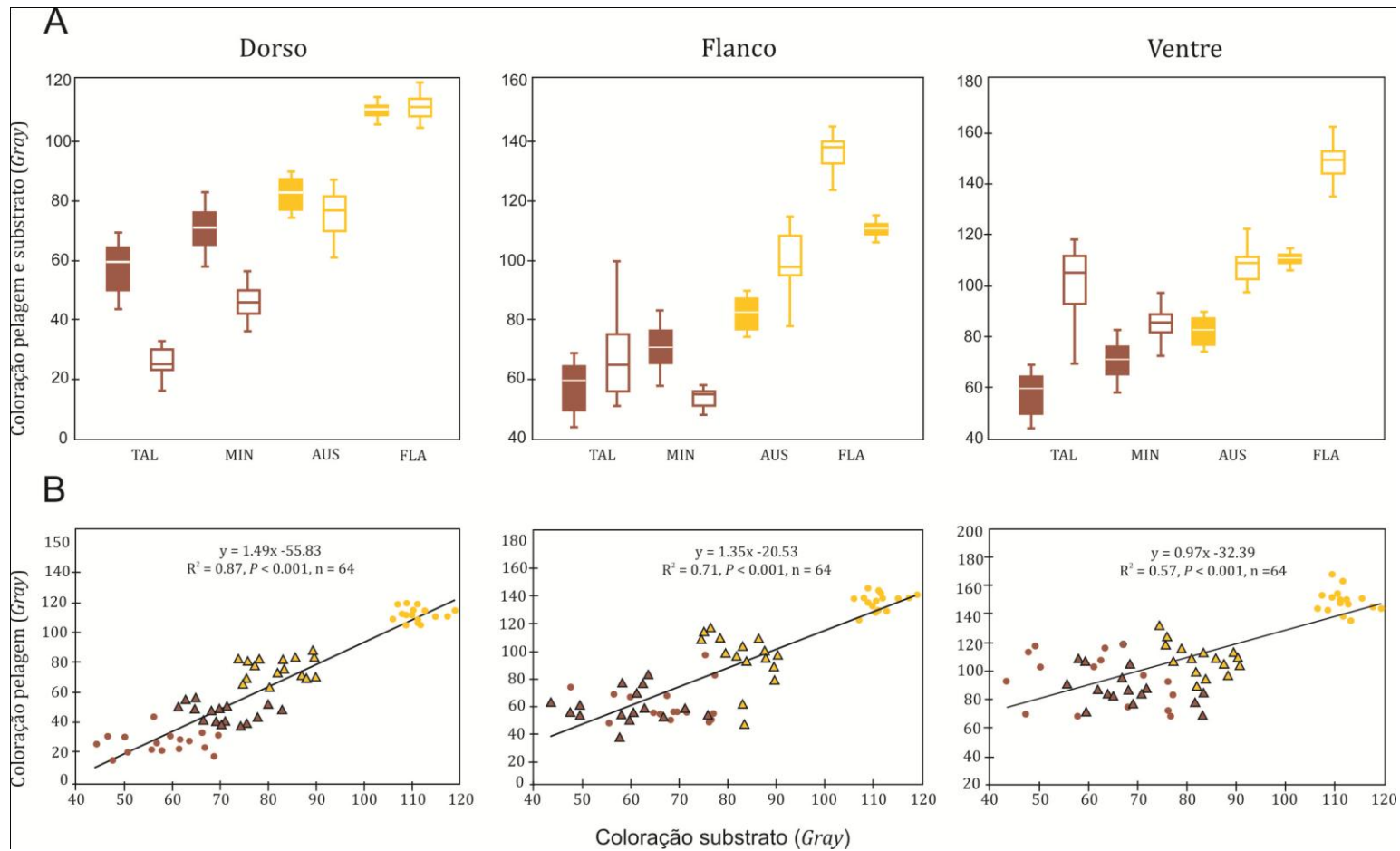


FIGURA 4-8. Associação da coloração do substrato com pelagem nas quatro espécies de *Ctenomys* analisadas: TAL, *C. talarum*; MIN, *C. minutus*; AUS, *C. australis*, FLA, *C. flamarioni*. As cores indicam os fenótipos escuros (marrom) e claros (amarelo). A) representação por *Box-plots* da variabilidade encontrada na cor do substrato (*box* preenchidos) e da pelagem dorsal (*box* não-preenchidos), evidenciando a mediana, e o primeiro e terceiro quartil. Letras distintas sobre o *box-plot* indicam significância estatística entre espécies, dentro de uma dada região corporal analisada. B) regressão linear da coloração do substrato pela cor da pelagem. Os círculos representam as espécies *C. talarum* e *C. flamarioni*, e os triângulos *C. minutus* e *C. australis*.

CAPÍTULO 5

EVOLUÇÃO DO PELO TIPO ESPINHO EM ROEDORES: UMA ANÁLISE MOLECULAR E MORFOLÓGICA

Gislene L. Gonçalves¹, Gilson R. P. Moreira², Hopi E. Hoekstra³ & Thales R.O. Freitas¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9.500, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9.500, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

³Department of Organismic and Evolutionary Biology and The Museum of Comparative Zoology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA

Manuscrito em preparação

Introdução

A presença de pelos é um traço característico dos mamíferos, os quais possuem diversas funções, incluindo a termorregulação, proteção física ao ambiente e defesa contra predadores (Wilson & Reeder 2005). Ao longo da trajetória evolutiva, diversos traços adaptativos são refletidos na considerável variação existente quanto à morfologia dos pelos (Chernova & Kuznetsov 2001). A modificação de pelos-guarda no tipo espinho *sensu stricto* encontra-se presente em algumas linhagens, como équidnas (Tachiglossidae), insetívoros (Tenrecidae e Erinaceidae) e nos roedores ouriços (Hystricidae e Erethizontidae). Ainda, espinhos de diferentes tipos, caracterizados por variações em dureza, também denominados de “semi-espinhos” ou “pelos aristiformes”, ocorrem em diversos gêneros, representativos de quatro famílias de roedores: Heteromyidae (*Liomys* e *Heteromys*), Cricetidae (*Neacomys* e *Scolomys*), Muridae (e.g. *Tokudaia*, *Conilurus*, *Zyzomys*, *Arvicanthis*, *Golunda*, *Leopoldamys*, *Maxomys*, *Niviventer*, *Grunomys*, *Echiotrix*, e *Acomys*) e Echimyidae (e.g., *Proechimys*, *Hoplomys*, *Euryzygomatomys*, *Carterodon*, *Mesomys*, *Lonchotrix* e *Echimys*) (Wilson & Reeder 2005).

De maneira geral, os espinhos foram amplamente estudados em Erethizontidae e Hystricidae (Schwarz 1939; Po-Chedley & Shadle 1955; Findlay 1977; Weer 1983; Sokolov & Chernova 1998). Aspectos ultraestruturais (e.g. padrão da cutícula e número de escamas) dos pelos aristiformes foram descritos em detalhes para diferentes táxons, em particular equimídeos e murídeos (Chernova & Kuznetsov 2001; Hoey et al. 2004), tendo como objetivo principal a identificação de caracteres únicos para diagnóstico taxonômico.

A exceção dos ouriços (Erethizontidae e Hystricidae), em que os espinhos são claramente protetivos, nos demais táxons se desconhece a função destas estruturas.

Considera-se que a modificação dos pelos-guarda em espinhos, com diferentes graus de dureza, evoluiu pelo menos seis vezes independentemente dentro de Rodentia (Hoey et al. 2004). Entretanto, os aspectos estruturais da morfologia envolvidos na convergência deste fenótipo, se existentes, ainda não foram investigados em detalhe. Como exceção, citam-se as inferências com base em descrições ultraestruturais comparativas e dados morfométricos apresentados por Chernova & Kuznetsov (2001), para espécies representativas das principais famílias de roedores contendo espécies espinhentas e, por Hoey et al. (2004), em relação, a Muridae e Echimyidae. Assim, são pouco conhecidos os caminhos evolutivos que conduziram a modificação estrutural do pelo em espinho, e em particular, se existe convergência entre os mecanismos que levaram à evolução da pelagem espinhenta dentre as diferentes famílias de roedores que apresentam esta característica.

As bases genéticas responsáveis pela variação morfológica dos pelos também são desconhecidas. Entretanto, recentemente foi reportado o envolvimento do receptor da ectodisplasina-A (*ectodysplasin-A receptor; Edar*), equivalente ao locus *Downless* em camundongos, na evolução morfológica dentro da rota do gene *Eda* (Pantalacci et al. 2008). Assim, o *Edar* constitui-se em potencial candidato para explicar às variações morfológicas existente no pelo, pois codifica uma proteína trans-membrana que regula a rota de desenvolvimento de estruturas ectodérmicas, cujos domínios são homólogos aos da família de receptores do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor; TNF*) (Headon & Overbeek 1999; Mikkola & Thesleff 2003). Tais receptores sinalizam

predominantemente através do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e fatores de transcrição (Mikkola & Thesleff 2003). Neste processo de sinalização, o *Edar* é recrutado em cascata pelo *Eda* (Ectodisplasina-A), causando o co-recrutamento do *Edar DD* (EDAR *death domain*) associado ao *Edar*; por fim, a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Fig. 5-1). As mutações que inibem a ação desta rota metabólica impedem a formação do folículo capilar em camundongos e humanos (Botchkarev & Fessing 2005; Courtois & Smahi 2006; Thesleff & Mikkola 2002), demonstrando o completo envolvimento deste gene na formação e estrutura de anexos epidérmicos.

Recentemente, estudos em populações humanas demonstraram a existência de uma associação significativa de um SNP (*single nucleotide polymorphism*) no *Edar* (1540C), o qual causa a substituição Val³⁷⁰Ala, com o aumento na espessura (= diminuição no grau de elipticidade) do cabelo em asiáticos (Fujimoto et al. 2008). Em confirmação, Mou et al. (2008) relevaram que este SNP aumenta a sinalização do *Edar* in vitro. Ainda, que a elevação da função original do *Edar* em camundongos (ativada pelo aumento do número de cópias), modifica alguns aspectos da morfologia do cabelo; por exemplo, altera o diâmetro/elipticidade, para a forma asiática. Assim, esses estudos apresentaram uma conexão relevante entre a variação fenotípica quanto à espessura e a forma da secção transversal do pelo (elíptica / circular) e o alelo 1540C.

O camundongo mutante para o *Edar* produzido por Mou et al. (2008) apresentou a pelagem convertida, aparentemente, no fenótipo dos roedores silvestres que possuem pelos aristiformes (e.g. *Acomys spinosissimus*). Este aspecto sugere caminhos evolutivos similares na conversão de pelos-guarda no tipo espinho em outras espécies, sugerindo assim a possibilidade de investigar a evolução molecular deste gene em mamíferos

silvestres; ou seja, quanto ao papel do *Edar* na convergência fenotípica das diferentes famílias de roedores espinhentos. Neste contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar seqüências do *Edar* em espécies dentro das seis famílias de roedores que apresentam esta característica (Cricetidae, Muridae, Heteromyidae, Echimyidae, Erethizontidae e Hystricidae). Em especial, é investigada a existência do alelo 1540C, e outras substituições potencialmente associadas ao fenótipo “espinhento”. Também, em suporte, são caracterizados e medidos, de forma comparativa, os principais aspectos ultraestruturais dos pelos-guarda ou espinhos para os táxons sequenciados, de forma a investigar a existência de associação entre os padrões morfológicos obtidos com a presença/ausência do alelo no *Edar* e/ou de outras mutações.

Material e métodos

Procedimento experimental

Para a investigação de variantes moleculares do *Edar*, as seis principais famílias de roedores reconhecidas por apresentarem fenótipos espinhentos (Chernova & Kuznetsov 2001) foram contempladas. Utilizou-se uma amostra de DNA de 11 espécies representativas de táxons com fenótipo espinhento; *Acomys spinosissimus* (FMNH-196233), *Heteromys desmarestianus* (MVZ-223183), *Proechimys brevicauda* (MVZ-190660), *Proechimys semispinosus* (MVZ-225062), *Atherurus macrourus* (MVZ-186559), *Erethizon dorsatum* (JMC112), *Coendou spinosus* (MRS15), *Neacomys spinosus* (MVZ-193762) e, não espinhento; *Lophuromys aquilus* (FMNH-189129), *Dipodomys panamintinus* (MVZ-221901) e *Peromyscus maniculatus* (CRL8273) (Tab. 5-1).

Em relação à comparação morfológica, assumiu-se que os espinhos (e/ou pelos aristiformes) são pelos-guarda modificados, conforme já explicitado. Assim, para cada espécie estudada, foram utilizados em comparação os espinhos em si, quando presentes, ou os pelos-guarda correspondentes (na ausência de espinhos típicos, pertencentes às 11 espécies anteriormente mencionadas. Os táxons foram escolhidos com base em conhecimento taxonômico e morfológico prévio, de forma a contemplar duas espécies filogeneticamente relacionadas, e táxons com diferentes durezas de espinhos. O objetivo deste desenho experimental foi controlar o efeito filogenético sobre o funcional nas inferências efetuadas posteriormente.

As amostras de tecido (músculo) e de pelos (removidos da região posterior central do dorso) foram obtidas a partir de empréstimos de diferentes coleções científicas norte-americanas, a saber: *Museum of Comparative Zoology* (MCZ; Harvard University, Cambridge), *Museum of Vertebrate Zoology* (MVZ; University of California, Berkeley), *Field Museum* (FMNH; Chicago), *National Museum of Natural History*, Smithsonian Institute (NMNH; Washington DC).

Amplificação e sequenciamento do *Edar*

O DNA genômico total foi extraído de amostras de músculo, preservadas em DMSO, através do kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, e estocados a -20°C para posterior utilização como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR). Desenhou-se seis oligonucleotídeos degenerados para amplificação específica do domínio da morte (*death domain*), localizado no éxon 11 (12

em *Homo sapiens*) do gene que codifica para a proteína Edar, totalizando 320 pares de base (pb) (Tab. 5-2). Foram alinhadas seqüências de diferentes mamíferos, em particular os roedores *Rattus*, *Mus*, *Cavia* e *Dipodomys*, obtidos do ENSEMBL para a avaliação de regiões conservadas. Os oligonucleotídeos foram desenvolvidos no programa Primer3, seguindo os critérios de menor valor de auto complementariedade e temperatura de anelamento. Designou-se o éxon 11 por conter o sítio 1540C, onde foi verificado o SNP associado à variação na espessura do cabelo em humanos; também, devido à importância deste domínio no reconhecimento do ligante *Edar death domain* (*EdarDD*), cuja região é altamente conservada (Pantalacci et al. 2008). Assim, considerou-se que substituições neste sítio possuem maior relevância funcional. Em particular, utilizou-se o conjunto de oligonucleotídeos EdarF2-EdarR6 para amplificação das amostras de equimídeos e EdarF1-EdarR5 para os murídeos. Os demais foram amplificados com os oligonucleotídeos EdarF2-EdarR1. Para a reação de amplificação, utilizou-se 1.5ul MgCl₂ (50uM), AmpliTaqGold (Invitrogen), e um gradiente *touch down* de 60° a 50°C de temperatura de anelamento.

Os produtos foram verificados em gel de agarose 1%, revelados com Sybr Green (Invitrogen), e purificados com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e Exonuclease I (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram sequenciados em ambos os sentidos utilizando os mesmos oligonucleotídeos da PCR. Para tanto, utilizou-se o kit de terminadores marcados no sequenciador automático ABI (Applied Biosystems). O alinhamento das seqüências obtidas pelo método descrito foi realizado automaticamente no programa Codon Code Aligner (CodonCode Corporation) e corrigido manualmente através da verificação de todos os sítios variáveis, confrontando as seqüências em ambos

os sentidos e conferindo os cromatogramas, com o intuito de minimizar os possíveis erros na leitura do sequenciamento, e confirmar sítios heterozigotos.

Filogenia e mapeamento de caracteres

As mudanças não sinônimas de aminoácidos encontradas no *Edar* foram mapeadas sob uma filogenia neutra reconstruída com base na utilização de sequências parciais do gene *Citocromo b* (*Cit-b*) de 11 espécies, sendo nove espécies obtidas do Genbank (*D. panamintinus*, AY926384; *H. desmateristianus*, GU646996; *A. spinosissimus*, AM409396; *P. maniculatus*, JF489123; *N. spinosus*, EU579504; *A. macrourus*, FJ931121; *S. spinosus*, EU544662; *E. dorsatum*, FJ357428). Para as três espécies remanescentes (*L. aquilus*, *P. brevicauda*, *P. semispinosus*), sequenciou-se o gene *Cit-b* com os oligonucleotídeos MVZ05 e MVZ26, utilizando as condições descritas em Smith & Patton (1993).

A reconstrução filogenética foi feita pelo método bayesiano através do programa MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), com 1.000.000 de ciclos do algoritmo da cadeia de Markov e Monte Carlo e parâmetros padrão, descartando-se *ca.* 25% das árvores iniciais, e utilizando parâmetros padrão. Para o enraizamento da árvore, utilizou-se a espécie de lagomorfo *Oryctolagus cuniculus* (NC001913). O mapeamento dos caracteres foi feito com a ajuda do programa MacClade4 (Maddison & Maddison 2000).

Caracterização morfológica e morfométrica dos pelos

Para as avaliações morfométricas, um total de 10 pelos representativos (um por amostra) foi selecionado, os quais foram fotografados em vista dorsal com o auxílio de uma câmera digital Sony® Cyber-Shot DSC-H20. A seguir, pelo uso de um bisturi, foram seccionados transversalmente na região de maior diâmetro. As secções transversais correspondentes foram fotografadas em estereomicroscópio Leica® M125 equipado com ocular micrométrica e tendo acoplado à câmera citada.

As imagens digitalizadas obtidas foram analisadas com o software Axion Vision 4.8, adotando-se como referência os parâmetros lineares representados na Figura 5-1. O grau de achatamento foi obtido pela divisão da largura pela espessura (d/c). A concavidade relativa foi considerada como sendo a razão entre a profundidade do sulco dorsal (= zero, quando inexistente) e a largura (b/d) da secção transversal.

Para a caracterização da ultraestrutura das secções transversais, exemplares representativos adicionais foram utilizados. As porções resultantes foram montadas em fita dupla-face, sobre suportes metálicos e metalizados com ouro/carbono em equipamento Bal-tec® SCD050, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM5800 existente no CME.

Para as descrições quanto à ultraestrutura dos pelos, adotou-se a terminologia descrita em Chernova & Kuznetsov (2001) e, especificamente em relação à forma da secção transversal, baseou-se na classificação proposta por Teerink (1991). Para facilitar a

interpretação, os resultados correspondentes são apresentados conforme a ordenação filogenética, das espécies ancestrais para as derivadas.

Resultados

Variabilidade genética do gene *Edar*

Um total de 244 pb do éxon 11 do *Edar* foi sequenciado em todas as espécies analisadas. O alelo 1540 C não foi observado nos roedores silvestres incluídos neste estudo, sendo que todas as espécies foram homozigotas para o alelo T (correspondente ao sítio 59 neste estudo; Fig. 5-2). Entretanto, verificou-se 57 sítios nucleotídicos variáveis e quatro mudanças não sinônimas de aminoácidos: Ser¹¹Asn; Ala²⁸Val; Gly⁵⁵Ser; Asp⁶⁹Glu (Fig. 5-2; 5-3). Estas mudanças foram mapeadas na filogenia reconstruída com seqüências do *Cit-b*, sendo exclusivas de táxons com fenótipo espinhento dentro de cada família (Fig. 5-4).

Variação na forma dos pelos

Quanto à forma da secção transversal, constatou-se uma convergência para a maioria dos casos estudados (Heromyidae, Muridae, Cricetidae, Echimyidae e Hystricidae) qual seja: a presença de um sulco dorsal associado à existência de cristas longitudinais laterais (Figs. 5-4B, D, F, G-I). Nesses casos, a secção variou progressivamente, das espécies ancestrais para as derivadas, de côncavo-convexa (e.g. Fig. 5-4B), à tri-concava (e.g. Fig. 5-4H) e à quadri-concava (Fig. 5-4I). Ou seja, nessa ordem, houve uma migração das cristas citadas para a face dorsal e uma diminuição da curvatura ventral. Tal cenário foi contrastado em relação às espécies pares não

espinhentas dentro das famílias ancestrais, cuja secção transversal correspondente aos pelos-guarda não apresentou sulco e cristas laterais diferenciadas, variando de bi-convexa à bi-côncava (Figs. 5-4A, C, E). Para os Erethizontidae, em particular, foi observada uma secção transversal aproximadamente circular, sem sulcos e cristas (Figs. 5-4 J-K).

Nos pelos-guarda das linhagens não espinhentas ancestrais analisadas, a existência de células na área medular foi escassa ou de formato indefinido (Figs. 5-4A, C, E). Embora dados quantitativos quanto às dimensões correspondentes não sejam apresentados, nos espinhos sulcados, e particularmente em Echimyidae e Hystricidae, verificou-se um aumento expressivo da área cortical em relação à medular (Figs. 5-4B, D, F-I). Também, observou-se nesses casos, e em maior grau em Hystricidae, o desenvolvimento de septos transversais internos, que ocorrem entremeados na área medular. As células medulares além de ocorrerem proporcionalmente em menor número, nesses casos, são de formato e tamanho relativamente variável, tendendo ao laminar.

Ao contrário do verificado para os espinhos sulcados, a medulados espinhos circulares (Erizonthidae) apresenta aspecto alveolar uniforme com inúmeras células de pequeno tamanho, preenchendo a totalidade do lúmen, sem a presença de septos intercalados e associada a um córtex de reduzida espessura (Figs. 5-4J, K).

Variação na morfometria dos pelos

Quanto às dimensões lineares correspondentes aos espinhos sulcados, constatou-se um aumento progressivo no tamanho, de acordo com a ordenação filogenética, tanto

em relação ao comprimento quanto à largura e à espessura (Fig. 5-5). Dentro de cada linhagem ancestral, nesses casos, o aumento foi aparentemente proporcionalmente maior nos espinhos comparado aos pelos-guarda, em relação à largura e à espessura. Como resultado, houve um aumento, na ordem filogenética, quanto ao perímetro e à área da secção transversal. Em consequência disso, houve uma diminuição na razão correspondente (perímetro/área), visto que o último parâmetro, ao contrário do primeiro, cresce na razão do quadrado da dimensão linear. Quanto à essa razão especificamente, houve expressiva diferença dentro das linhagens basais, onde foi menor nos espinhos, comparado aos pelos-guarda. Não foi constatada a existência de um padrão homogêneo quanto ao grau de achatamento em relação à ordenação filogenética. A concavidade relativa, porém, foi similar dentre os espinhos e expressivamente menor nos pelos-guarda das linhagens basais (Fig. 5-5).

Quanto às dimensões dos espinhos cilíndricos (Erizonthidae), em particular, constatou-se os valores mais elevados em relação ao comprimento e à espessura (= diâmetro) (Fig. 5-5). As pequenas oscilações quanto à largura e espessura em relação à unidade, neste caso, resultaram supostamente dos erros inerentes aos métodos de preparação do material e medição adotados. Por terem a secção transversal aproximadamente cilíndrica, onde a razão perímetro/área é minimizada, tais espinhos tiveram os menores valores quanto à razão correspondente. Também, por terem a secção transversal com esse formato, sem sulco e cristas, apresentaram grau de achatamento próximo à unidade e, à concavidade relativa, nula (Fig. 5-5).

Discussão

O conhecimento a cerca dos genes envolvidos com a estrutura do pelo são escassos, diferentemente daqueles relacionados à coloração (ver Hoekstra 2006). O mapeamento de mutações no gene *Edar*, associado a mudanças morfológicas conspícuas, tal como o grau de elipticidade no corte transversal verificado em cabelos (Fujimoto et al. 2008) e conseqüências para a flexibilidade correspondente, foi um ponto de partida para considerar a evolução de pelos-guarda modificados em espinho em outros mamíferos, como roedores. A inferência do papel do *Edar* em outros mamíferos é relevante para responder questões inerentes aos processos evolutivos de diversificação correspondentes; por exemplo, no sentido de compreender sobre quais mecanismos conduziram a evolução dos pelos espinhentos, uma estrutura de defesa proeminente, que evoluiu pelo menos seis vezes em roedores.

Neste estudo, no entanto, não foi observada a substituição 1540 T→C (Val³⁷⁰Ala) associada à variação na estrutura do cabelo em populações asiáticas (Fujimoto et al. 2008). Por outro lado, verificou-se outras quatro mudanças não-sinônimas no *Edar*, todas elas únicas em táxons com fenótipo pelagem espinhenta, cujos gêneros-irmãos que não possuem tal fenótipo, não apresentaram tal substituição. Portanto, este resultado ressalta o potencial envolvimento destas substituições na variação morfológica encontrada em roedores silvestres. Entretanto, não evidencia uma relação direta de causa-efeito como mecanismo simples de associação fenótipo-genótipo, uma vez que outros táxons com fenótipo espinhento não compartilharam a mesma mudança, como por exemplo, em *A. macrourus* e *S. spinosus*; este último com padrão morfológico do espinho praticamente

idêntico ao de *E. dorsatum* (que possui a mudança Gly⁵⁵Ser). Ou seja, para verificar o envolvimento das mudanças verificadas no *Edar* é necessário demonstrar se existe variação na função da proteína, e, por conseguinte, os efeitos funcionais da substituição de aminoácidos. Este tipo de experimentos será abordado em breve, em complemento a este estudo.

Cabe ressaltar que o alelo 1540C foi fortemente associado à morfologia do pelo em humanos (Fujimoto et al. 2008) e camundongos mutantes (Mou et al. 2008). Alguns aspectos, porém, devem ser ponderados sobre estes dois estudos, em comparação aos dados em discussão. Primeiro, que em humanos avaliou-se apenas o parâmetro elipticidade (= razão espessura /diâmetro; a qual foi menor, tendendo a circularidade, nas populações asiáticas), sem detalhamento de outras variáveis que compõe a estrutura de um pelo mais rígido. Segundo, em conformidade ao argumento, que nas espécies estudadas, tanto os pelos-guarda quanto os espinhos sulcados, os quais apresentaram menor flexibilidade em relação, não possuem secção transversal com formato circular; ou seja, a mutação específica observada pelos autores poderá não ter significado biológico para essas linhagens de roedores. Em adição, nos casos aonde a secção foi circular no presente estudo (Erizonthidae), a mutação citada não foi constatada. Terceiro, que o formato do corte transversal observado por Mou et al. (2008) no camundongo tipo selvagem difere daquele verificado para outras populações de *Mus musculus*, por nós avaliadas, conforme dados inéditos. Assim, a relação encontrada pelos autores pode ser explicada pelo menos em parte, pelo fato de que diferentes formas e tamanho de pelo podem ser obtidos para uma dada espécie, dependendo da unidade selecionada e da posição do corte transversal correspondente (e.g. Teerink 1991). Assim, embora sejam de

alta relevância os demais dados apresentados por Mou et al. (2008), a conversão dos pelos-guarda em maior espessura em *M. musculus* em si deve ser melhor avaliada.

Os resultados quanto à morfologia apresentados neste estudo mostram claramente que existem outros caminhos para converter um pelo-guarda regular em espinho. Uma das rotas correspondentes, para a qual cinco das seis linhagens testadas convergiram, consiste não somente no aumento do tamanho (comprimento, largura e espessura), mas também da concavidade relativa da secção transversal, dada pela formação de um sulco dorsal, associado a cristas laterais. Em adição, nesse caso, há um aumento da área cortical e diminuição da medular, bem como a formação de septos transversais, que atuam como reforços de sustentação interna, conforme já apontado em linhas gerais por Chernova & Kuznetsov (2001). Esses autores, porém, associaram a existência de um sulco nesses espinhos ao aumento da área superficial, que em adição a peculiaridades ultraestruturais existentes nas escamas cuticulares desses espinhos nas espécies tropicais e subtropicais estudadas, teria importante função termorreguladora (perda de calor) e condensação de água. Por outro lado, o efeito do aumento da área de secção transversal, e em particular da camada cortical correspondente, na redução da flexibilidade de uma dada fibra tem sido reconhecida, pelo menos para espécies vegetais (e.g. Rusu et al. 2011), o que explicaria a maior robustez e aumento relativo do córtex nos espinhos em relação aos pelos-guarda. No nosso ponto de vista, a forma sulcada destes espinhos, de aspecto geral lanceolado, constitui-se numa adaptação adicional ao aumento do tamanho e da rigidez interna, também relacionada com a resistência à flambagem elástica (= encurvatura, resultante de compressão axial), bem como em relação à torção (dada pela concavidade da secção transversal e cristas laterais). Tais características são necessárias para o

adequado desempenho da função deste tipo de espinho. Em *A. macrourus*, aonde os espinhos tem função mecânico-protetora reconhecida, sabe-se que por carga de compressão axial, há a penetração da ponta deste no corpo do predador durante o ato de defesa. Nesse caso, posteriormente, há a retração do espinho como um todo ou a quebra da porção distal (Chernova & Kuznetsov 2001), a qual é curta, tem secção menor, sendo comparativamente enfraquecida quanto aos reforços internos e com secção desprovida de sulco e que, neste caso, permanece no corpo do predador.

A segunda trajetória evolutiva, correspondente aos espinhos de secção circular dos Eretizonthidae, ao contrário, está associada a um arquétipo que maximiza a flambagem elástica. Tal propriedade é dada pela secção transversal pequena em relação ao comprimento, pela escassez do córtex e abundância de medula alveolar com elevada maciez, contínua sem septos (Karam & Gibson 1995). A penetração deste tipo de espinho no predador/oponente, a qual acontece com maior profundidade comparada ao caso anterior, está de fato associada inicialmente à encurvadura por compressão axial. Após, também neste caso, dá-se a quebra do espinho, em região mais proximal, no corpo do espinho, comparado ao caso anterior, o que acontece com relativa facilidade, permanecendo assim grande parte deste no corpo do predador/oponente (Chernova & Kuznetsov 2001).

Em resumo, os resultados deste estudo não corroboraram a existência da substituição Val³⁷⁰Ala encontrada em populações humanas asiáticas e associada ao grau de elipsidade do pelo. Porém, quatro outras foram obtidas somente para o fenótipo espinhento em pares filogenéticos aparentados testados, o que sugere possível envolvimento do *Edar* na alteração da função da proteína levando a variações estruturais

no pelo. Entretanto, nem todas as espécies com espinho apresentaram mutação no gene *Edar*. Também, não foi constatada uma associação direta das mutações observadas com a variação morfológica existente nos pelos dentre essas linhagens, o que precisa ser mais bem elucidado.

A análise morfométrica demonstrou que as variações existentes nos pelos-guarda e espinhos, entre e dentro das linhagens de roedores estudadas, são complexas. A inferência quanto à existência de um padrão correspondente requereu além da determinação do índice de elipsidade referida. Os resultados quanto à comparação morfométrica utilizando parâmetros e índices lineares adicionais, indicou a existência de dois cenários quanto à evolução destes espinhos – um relacionado ao tipo com secção transversal “sulcada” existente (Heromyidae, Muridae, Cricetidae, Echimyidae e Hystriidae) e, a outra, ao tipo “circular” (Erizonthidae). Tais tipos morfológicos aparentemente estão associados ao modo operacional diferenciado destes, o que também deve ser melhor explorado. Com vistas a confirmar a existência destes padrões, pretende-se ainda aumentar o número de espécies analisadas por linhagem, quanto aos parâmetros morfométricos avaliados. Paralelamente, será feita uma comparação destes parâmetros com as respectivas propriedades tensiométricas, as quais também serão estudadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos curadores dos museus pelo empréstimo de material: Judith M. Chupasko (MCZ, Harvard University), Chris Conroy (MVZ, University of California, Berkeley), e Bruce D. Patterson (Field Museum). Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pelo uso de equipamentos na obtenção das micrografias, e ao Denis Santos Silva (UFRGS) pela edição da Figura 5-4.

Referências

- Botchkarev V.A. & Fessing M.Y. 2005. Edar signaling in the control of hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 10:247–251.
- Chernova OF, Kuznetsov GV. 2001. Structural features of spines in some rodents (Rodentia: Myomorpha, Hystricomorpha). *Biology Bulletin* 28: 371–382
- Courtois G, Smahi A. 2006. NF-kappaB-related genetic diseases. *Cell Death and Differentiation* 13: 843–851.
- Findlay GH. 1977. Rhythmic Pigmentation in Porcupine Quills. *Mammalian Biology* 42: 231–239.
- Fujimoto A, Kimura R, Ohashi J, Omi K, Yuliwulandari R, Batubara L, et al. 2008. A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Human Molecular Genetics* 17:835–843
- Headon DJ, Overbeek PA. 1999. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nature Genetics* 22: 370–374.

- Hoekstra HE. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97: 222–234.
- Hoey KA, Wise RR, Adler GH. 2004. Ultrastructure of echimyid and murid rodent spines. *Journal of Zoology* 263: 307–315
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Karam GN, Gibson LJ. 1995. Elastic buckling of cylindrical shells with elastic cores. I – Analysis. *International Journal of Solids Structures* 32: 1259-1283.
- Maddison DR, Maddison WP. 2001. MacClade4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.03. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Mou C, Thomason HA, Willan PM, Clowes C, Harris WE, Drew CF, Dixon J, Dixon J, Headon DJ. 2008. Enhanced ectodysplasin-A receptor (EDAR) signaling alters multiple fiber characteristics to produce the East Asian hair form. *Human Mutation* 29:1405-11
- Pantalacci S, Chaumot A, Benoit G, Sadier A, Delsuc F, Douzery EJP, Laudet V. 2008. Conserved features and evolutionary shifts of the EDA Signaling pathway involved in vertebrate skin appendage development. *Molecular Biology and Evolution* 25: 912–928.
- Po-Chedley DS, Shadle AR. 1955. Pelage of the Porcupine, *Erethizon dorsatum dorsatum*. *Journal of Mammalogy* 36: 84–95.
- Rusu M, Mörseburg K, Gregersen O, Yamakawa A, Liukkonen S. 2011. Relation between fibre flexibility and cross-sectional properties. *BioResources* 6: 641-655.

- Schwarz E. 1939. A New Porcupine (*Thecurus*) from Borneo, Journal of Mammalogy 20: 246–248.
- Smith MF, Patton JL. 1993. Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. Biological Journal of the Linnean Society 50:149-177.
- Sokolov VE, Chernova OF. 1998. New Data on Structure of Quills in Hysticomorpha (Rodentia). Dokl. Ross. Akad. Nauk 363: 429–432.
- Teerink BJ. 1991. Hair of west European mammals: atlas and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Thesleff I, Mikkola ML. 2002. Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. Science STKE: PE22.
- Weer DJ. 1983. Specific Distinction in Old World Porcupines. Zool Garten 53: 226–232.
- Wilson DE, Reeder DM. 2005. Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference. Johns Hopkins University Press. Pp. 2.142

Tabela 5-1. Amostras de roedores utilizadas para análise de pelos neste estudo.

Família	Espécie	Fenótipo	N	Identificação das amostras	Coleção científica
Heteromyidae	<i>Dipodomys panamintinus</i>	Não espinhento	10	BANGS-8426; MCZ-30157; MCZ-50896; MCZ-8427; MCZ-8469; MCZ-8470; MCZ-10561; MCZ-10562; MCZ-10563; MCZ-30155	MCZ
	<i>Heteromys desmarestianus</i>	Espinhento	10	BANGS-10714; BANGS-10715; MCZ-10355; MCZ-10358; MCZ-28964; MCZ-28965; MCZ-28966; MCZ-41298; MCZ-47300; MCZ-61799	MCZ
Muridae	<i>Lophuromys aquilus</i>	Não espinhento	10	MCZ-43393; MCZ-43394; MCZ-43395; MCZ-43396; MCZ-43397; MCZ-43398; MCZ-43399; MCZ-43400; MCZ-43401; MCZ-43402	MCZ
	<i>Acomys spinosissimus</i>	Espinhento	10	NMNH-470462; NMNH-352823; NMNH-367158; NMNH-428825; NMNH-367092; NMNH-367023; NMNH-367080; NMNH-367124; NMNH-428798; NMNH-352828	NMNH
Cricetidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Não espinhento	10	BANGS-1475; BANGS-1476; BANGS-1477; BANGS-1478; BANGS-1479; BANGS-4803; BANGS-4804; BANGS-4805; BANGS-4806; BANGS-7930	MCZ
	<i>Neacomys spinosus</i>	Espinhento	10	MCZ-27061; MCZ-27357; MCZ-27358; MCZ-27359; MCZ-27360; MCZ-27594; MCZ-38697; MCZ-38698; MCZ-38699; MCZ-38700	MCZ
Echimyidae	<i>Proechimys brevicauda</i>	Semi-espinhento	10	MCZ-26936; MCZ-27368; MCZ-27369; NMNH-259574; NMNH-559412; NMNH-461334; NMNH-559411; NMNH-530937; NMNH-530939; NMNH-530940	MCZ; NMNH
	<i>Proechimys semispinosus</i>	Espinhento	10	MCZ-10069; MCZ-10070; MCZ-10071; MCZ-10072; MCZ-10073; MCZ-10075; MCZ-10076; MCZ-10178; MCZ-10179; MCZ-10185	MCZ
Hystricidae	<i>Atherurus macrourus</i>	Espinhento	10	MVZ-23390; MVZ-14740; MVZ-18610; MVZ-24331; MVZ-32274; MVZ-32277; MVZ-32278; MVZ-32279; MVZ-32280; MVZ-32281	MCZ
Erethizontidae	<i>Coendou villosus</i>	Espinhento	1	MRS15	UFRGS
	<i>Erethizon dorsatum</i>	Espinhento	10	BANGS-2018; BANGS-2694; BANGS-5704; BANGS-6801; BANGS-6802; BANGS-1307; BANGS-1309; BANGS-7277; MCZ-655496; MCZ-655497	MCZ

Tabela 5-2. Lista de primers desenhados para amplificação da região do domínio da morte (*death domain*) do gene *Edar*.

Nome	Sequencia 5'→3'	Posição (<i>Forward/Reverse</i>)
EDAR_F1	GTCTCAGCCCCACCGAGTTG	For
EDAR_F2	GYCTCAGCCCCACVGAGYTS	For
EDAR_R1	TCAGGACGCAGCTGGGGGTG	Rev
EDAR_R2	AGGACGCAGCTGGGGGTGGG	Rev
EDAR_R3	TCAGGAYGCRGCBGGGGGYG	Rev
EDAR_R4	TCAGGARGCAGCYGCCGVGG	Rev

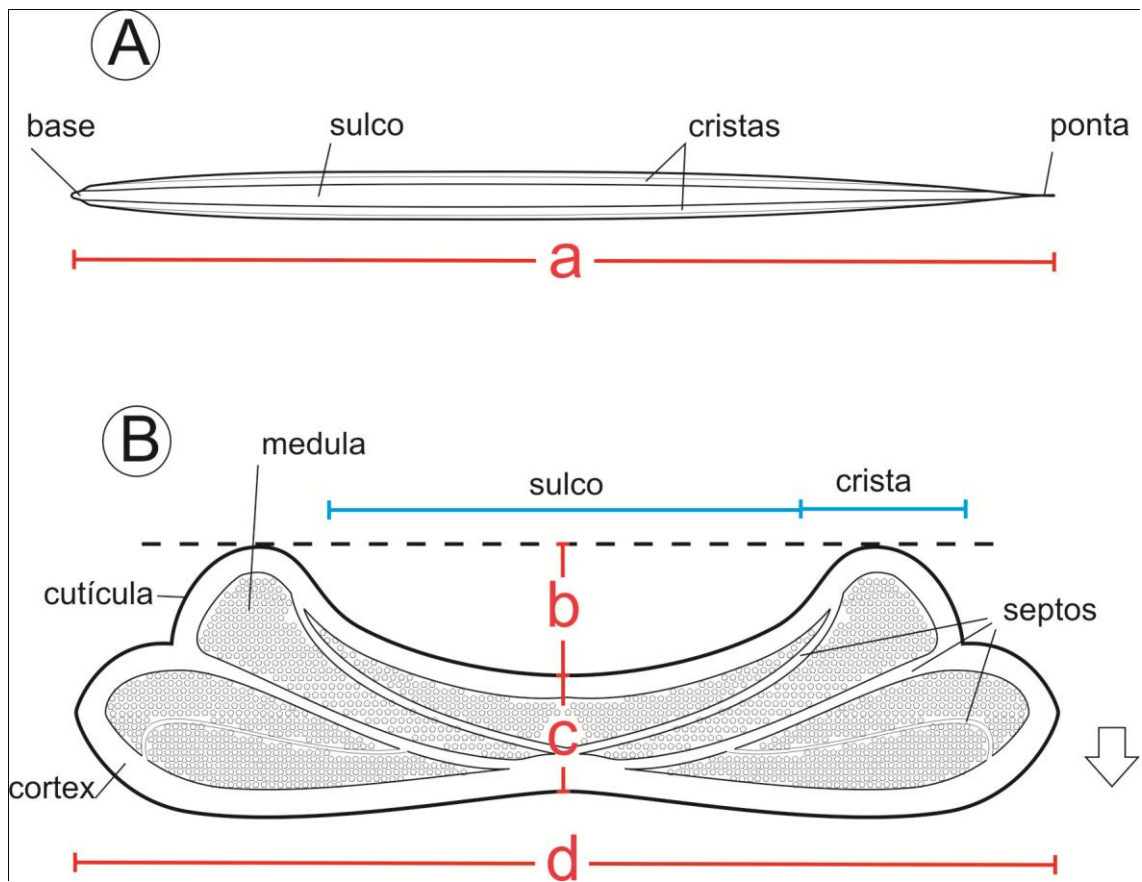


Figura 5-1. Representação esquemática de um espinho de *Atherurus macrourus*, em vista dorsal (A) e em secção transversal (B), com os principais componentes estruturais e respectivas medidas efetuadas. a = comprimento; b = profundidade do sulco; c = espessura; d = largura. Seta indica o sentido dorso-ventral.

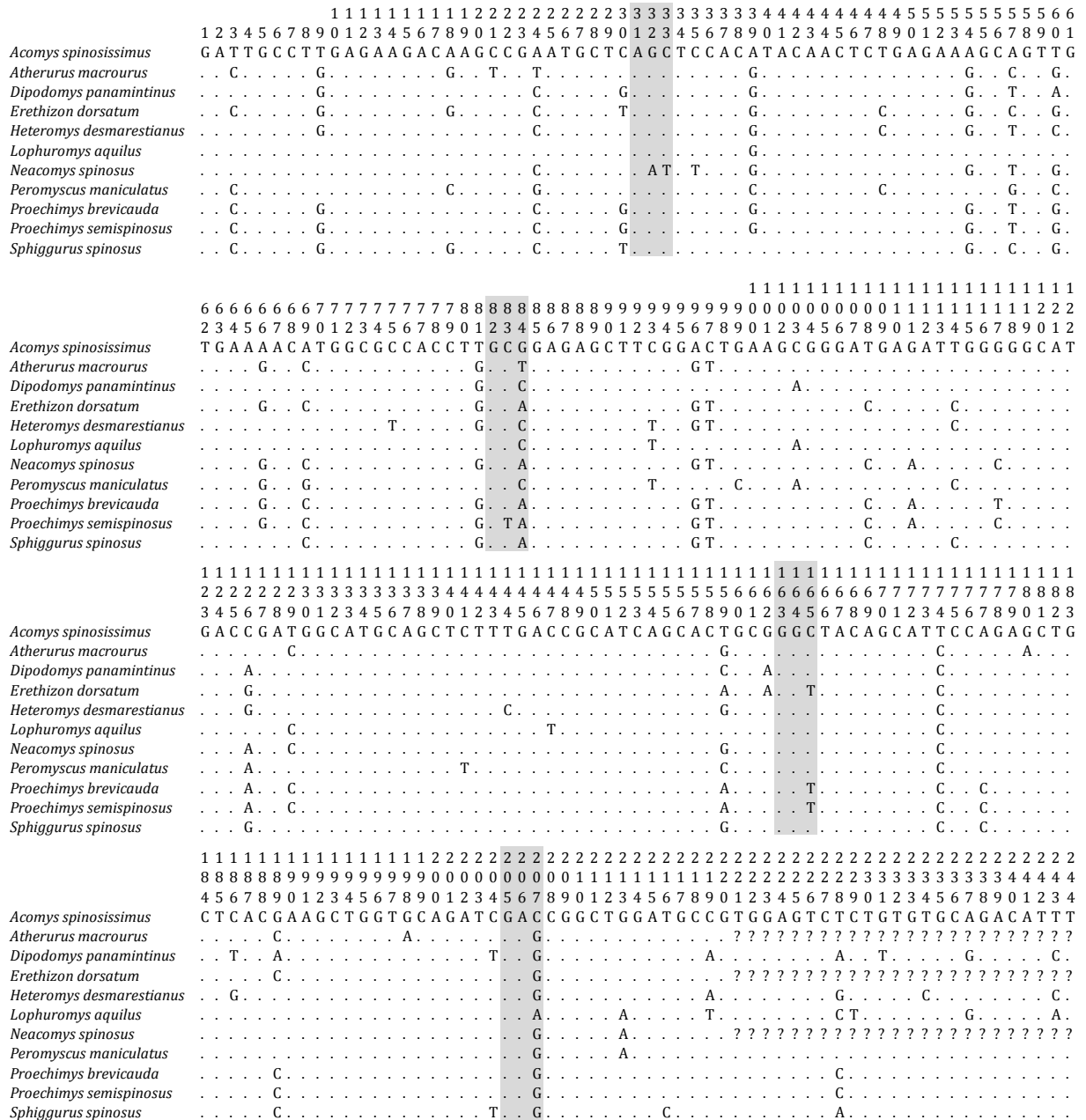


Figura 5-2. Alinhamento de 244 sítios do éxon 11 do gene *Edar* nas espécies de roedores estudadas. As colunas sombreadas indicam mudanças que resultam em diferentes aminoácidos.

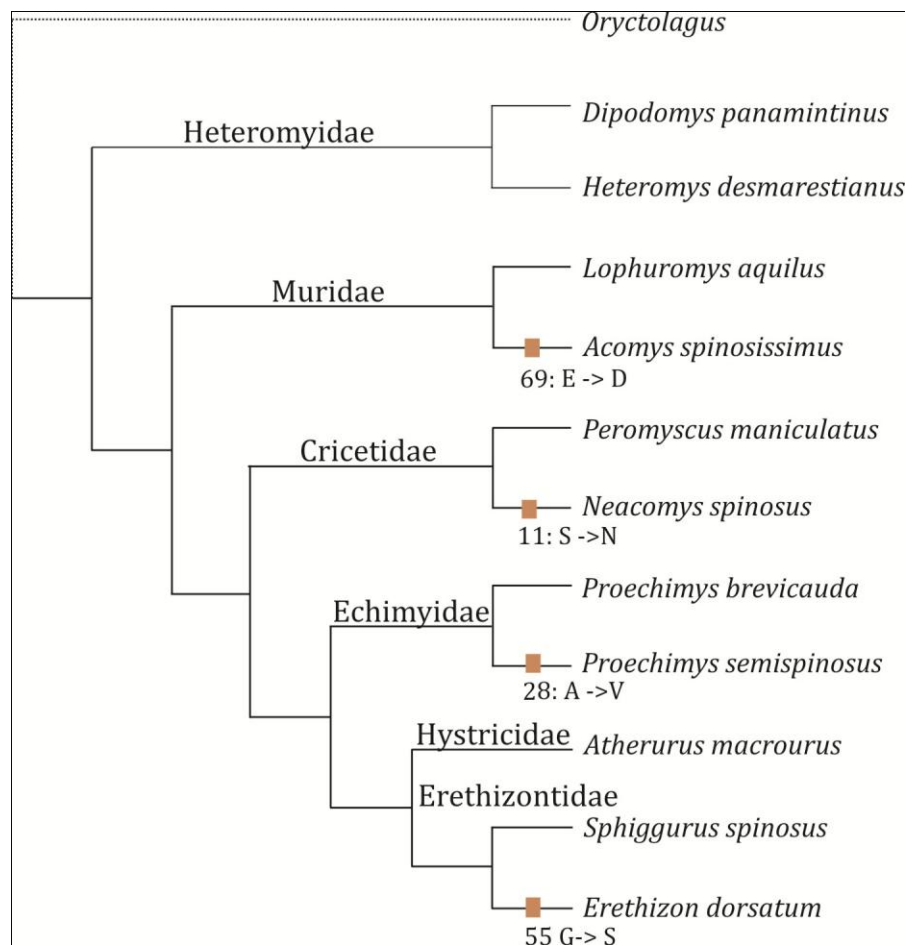


Figura 5-3. Árvore filogenética bayesiana das 11 espécies (compreendendo seis famílias; identificadas sobre os ramos) dos roedores amostrados, reconstruída com base em sequências parciais do gene *Citocromo b*. As quatro substituições de aminoácidos estão mapeadas na filogenia, sendo representadas pelos quadrados marrons, como mudanças únicas em táxons com fenótipo espinhento.

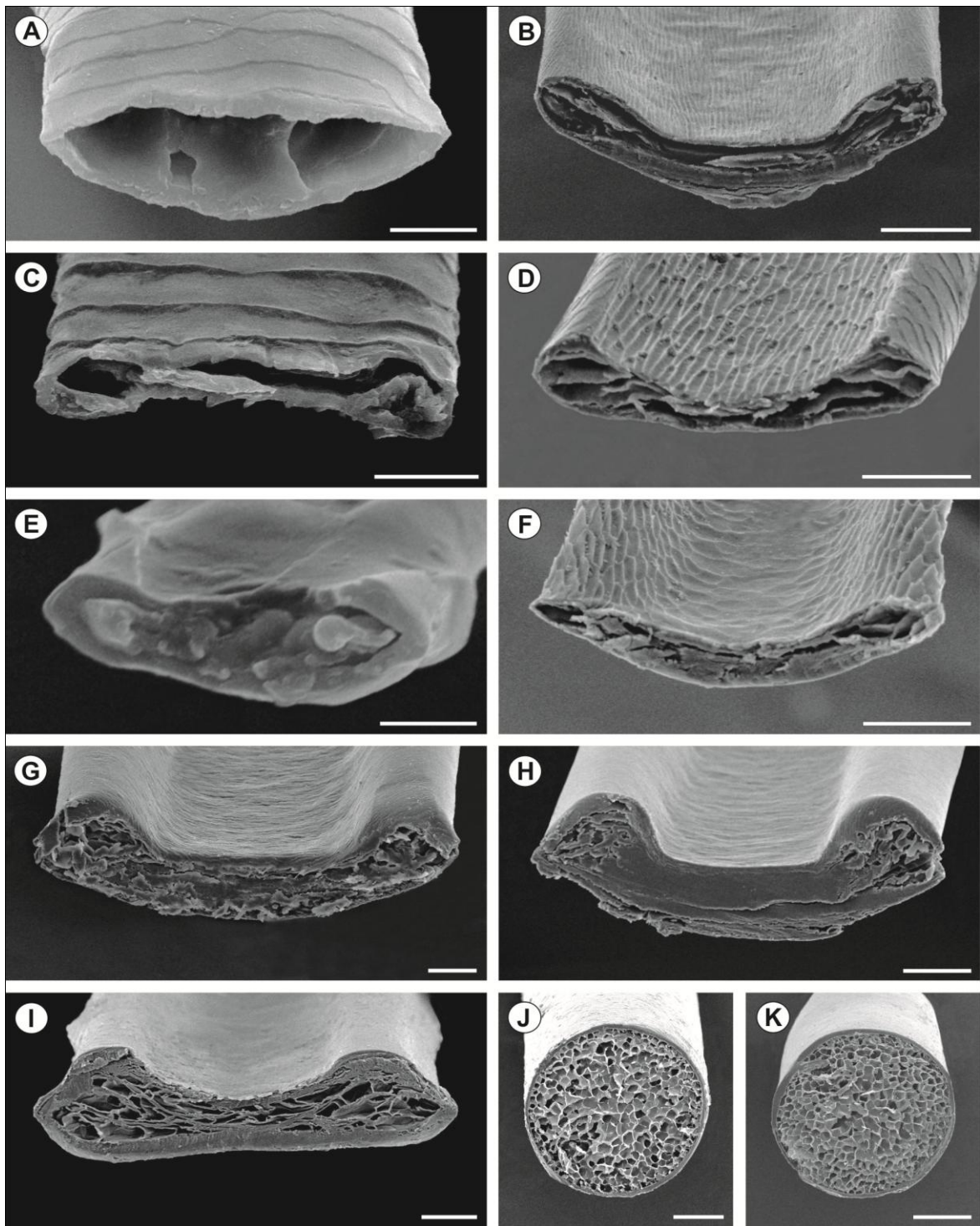


Figura 5-4. Micrografias de seções transversais dos pelos guardas (A, C, E) e espinhos dorsais estudados (B, D, F-K), em microscopia eletrônica de varredura. A, *Dipodomys panamintinus*; B, *Heteromys desmarestianus* (Heteromyidae); C, *Lophuromys aquilus*; D, *Acomys spinosissimus* (Muridae); E, *Peromyscus maniculatus*; *Neacomys spinosus* (Cricetidae); F, *Proechimys brevicauda*; G, *Proechimys semispinosus* (Echimyidae); H, *Atherurus macrourus* (Hystricidae); I, *Coendou spinosus*; J, *Erethizon dorsatum* (Erethizontidae). Barras = 10, 100, 20, 100, 5, 100, 100, 200, 200, 200 e 500 μ m, respectivamente.

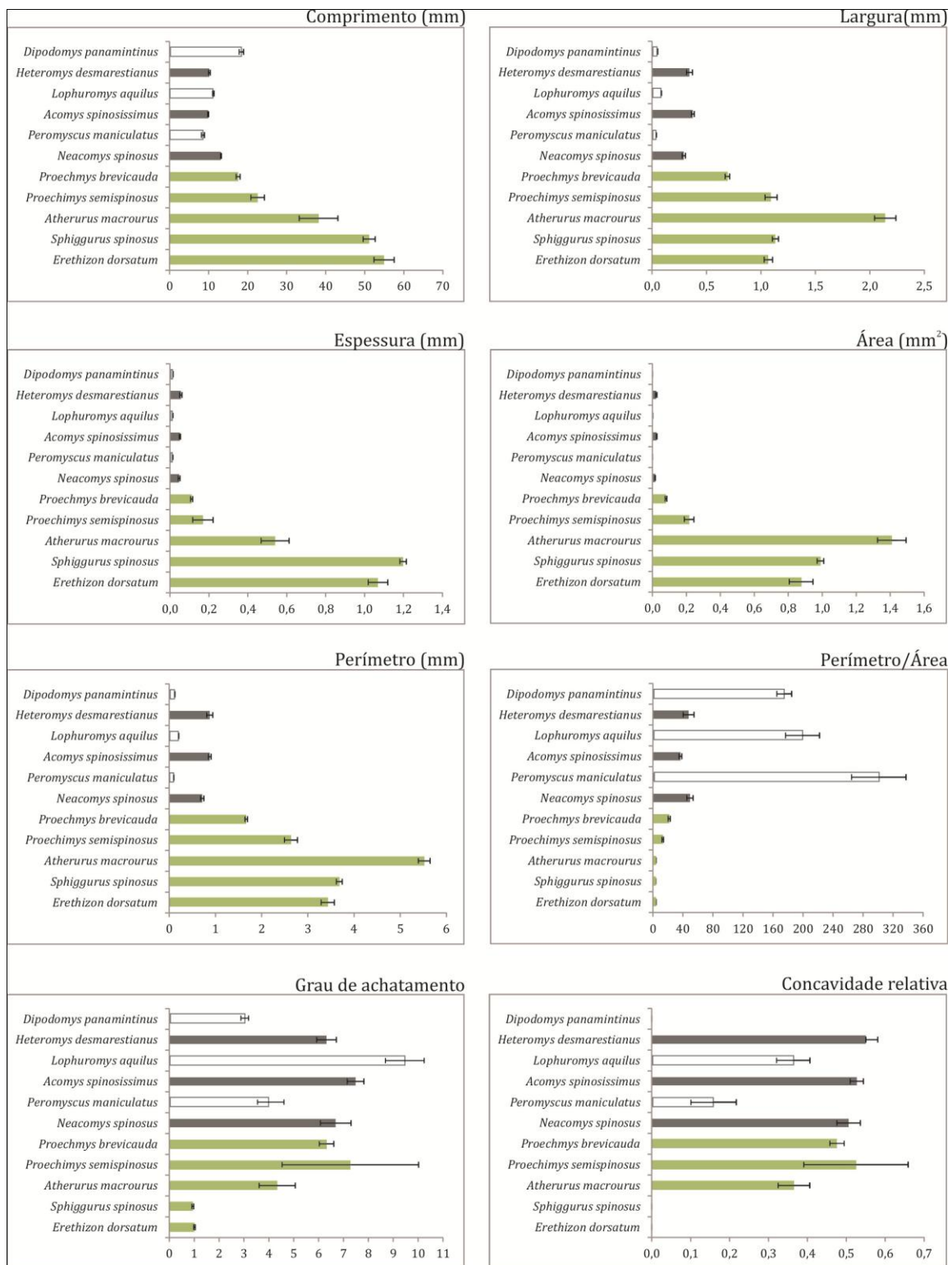


Figura 5-5. Variações morfométricas (média + erro padrão) nos pelos dentre os roedores estudados. Barras cinzas vazias e sólidas, respectivamente, são intercaladas consecutivamente para as espécies não-espinhentas (pelos - guarda) e espinhentas (espinhos) em Heteromyiidae, Muridae e Cricetidae. Em relação aos ratos espinhentos verdadeiros (Echimyidae) e ouriços (Hystricidae e Erethizontidae), são representados por barras verdes sólidas.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL

Diversos aspectos da pesquisa evolutiva são motivados pelo desejo de compreender como a diversidade surge e é mantida na natureza. Embora esta questão seja abordada desde o século 19, e em particular amplamente exposta por Charles Darwin, apenas recentemente tornou-se possível questionar a base genética das modificações evolutivas—isto é, as mudanças exatas que permitem os organismos se adaptarem ao ambiente. A compreensão de genes e mutações que dão origem a mudanças morfológicas, como coloração e estrutura do pelo, permite fazer inferências também sobre o processo evolutivo. Questões complexas, tal como adaptação local, são efetivamente inferidas quando se conhece regiões cromossômicas, genes e mutações responsáveis pela variação adaptativa (Hoekstra 2010).

Neste estudo foram abordadas questões evolutivas amplas, envolvendo, por exemplo, o quão frequente a seleção depende dos mesmos genes e/ou mutação para direcionar a evolução de fenótipos similares e independentes, isto é, convergência evolutiva. Ainda, se mutações vantajosas tendem a afetar a função proteica (i.e. mutações na própria proteína), ou a correspondente expressão temporal-espacial (i.e. mutações

fora da proteína que controlam a regulação). Por fim, se mutações em genes altamente pleiotrópicos poder ser responsáveis por mudanças morfológicas conspícuas.

Através da abordagem do gene *Mc1r* verificou-se que a seleção não necessariamente depende dos mesmos genes ou mutações pra governar a direção evolutiva de um dado caráter, neste caso, a coloração da pelagem. Embora já tenha sido amplamente demonstrado o envolvimento de substituições no *Mc1r* com mudanças conspícuas na coloração clara e escura em diversos estudos com vertebrados (Hubbard et al. 2010), outros evidenciam a ausência de padrão neste gene para diferentes grupos de mamíferos, como primatas (Mundy & Kelly 2003), cetartiodáctilos (Ayub et al. 2009), mustelídeos (Hosoda et al. 2005) e roedores (Wlasiuk et al. 2007), mesmo que a variabilidade verificada, tanto genética como morfológica, seja alta em todos estes exemplos. Portanto, é notória a complexidade de caminhos evolutivos possíveis na determinação de fenótipos similares. Embora não seja completamente descartado o papel do *Mc1r* na pigmentação de tuco-tucos (considerando-se a função chave deste gene na rota de formação do pigmento eumelânico), verificou-se que mudanças estruturais não explicam os padrões de diferenciação de cor verificados em *Ctenomys*. No entanto, diferenças significativas no padrão espacial de expressão do *Mc1r* foram observadas ao longo de diferentes regiões corporais (dorso, flanco e ventre) dentro dos fenótipos, mas não entre diferentes fenótipos. Este resultado indica a atuação diferencial do *Mc1r* em *Ctenomys*, em particular entre regiões corporais que possuem gradativa diluição da pigmentação, culminando com o ventre claro. Porém, o fato de não terem sido observadas diferenças significativas entre regiões corporais no indivíduo melânico indica que possivelmente este fenótipo porte alguma mudança regulatória no *Mc1r* (ou no próprio antagonista), que impeça o ligante

Agouti de atuar no sistema, mantendo, portanto, a ativação constitutiva e consequente expressão apenas de eumelanina. Para os demais fenótipos (claro e escuro), parece existir um envolvimento do *Mc1r* que talvez não seja através do ajuste fino da cor (variação contínua), mas em modificações conspícuas (discretas), como verificadas em determinadas espécies de primatas por Mundy & Kelly (2003).

A semelhança do exemplo das subespécies de *Peromyscus polionotus* da Costa do Golfo e do Atlântico, nos Estados Unidos (Hoekstra et al. 2006; Steiner et al. 2009), os resultados obtidos para os tuco-tucos sugerem que genes diferentes (e.g. *Agouti*) e/ou mutações são responsáveis por fenótipos convergentes, em particular os claros, como *C. australis* e *C. flamarioni*. Verificou-se uma mutação única no *Mc1r* em *C. australis* (98 Ile→Val), entretanto, não foi possível estabelecer uma relação direta de causa-efeito, uma vez que não se sabe se esta mudança implica em alterações na função da proteína; isto é, se reduz a atividade do receptor. Para demonstrar a associação de mudanças estruturais e/ou regulatórias do *Mc1r* com os fenótipos pigmentação em tuco-tucos são necessários ensaios que possibilite medir as consequências funcionais. Também, é fundamental investigar regiões regulatórias não transcritas (UTR) a montante da região codificante (embora tenha sido feito neste estudo, a região sequenciada foi pouco significativa em termos proporcionais ao tamanho total deste segmento).

Neste estudo, também, foi investigada a evolução do gene *Mc1r* entre diferentes linhagens de mamíferos, em particular em roedores, de forma a testar a aceleração empírica que é sugerida para este grupo com base em dados de outros genes nucleares. Pela primeira vez, foram comparados múltiplos grupos de mamíferos (nove ordens), incluindo diversas linhagens. Provavelmente por este fato, não tenha sido verificado um

padrão de aceleração conspícuo em roedores. Em adição, não foram verificadas mudanças nas taxas de substituição sinônimas e não-sinônimas entre linhagens de roedores e demais mamíferos. No entanto, percebeu-se um padrão de aceleração linhagem-específica, onde alguns grupos parecem ter taxas de substituição maiores que outros, incluído a linhagem dos tuco-tucos. Mais especificamente, observou-se que um único táxon contribui significativamente para a aceleração: *C. leucodon*. Assim, as possíveis razões para esta aceleração pontual é discutível, sendo possivelmente mais associada a diferentes pressões seletivas ao longo da trajetória evolutiva de uma dada espécie (cujas assinaturas podem ser evidenciadas nos padrões de substituições dos genes) do que em relação ao tamanho efetivo populacional, como sugerido por Li (1997) e Graur & Li (2000). Entretanto, não se descarta a influência de diferentes traços na história de vida das espécies em moldar os padrões de substituição verificados.

Foram observadas pressões seletivas relaxadas em determinados domínio da proteína *Mc1r*, a maior parte em porções extracelular e/ou transmembrana, evidenciado pela alta variabilidade dentro e entre diferentes grupos de vertebrados. Isto demonstra que determinadas porções do *Mc1r* possuem maior relevância funcional, em particular os domínios intracelulares. Ainda, os resultados de taxas de substituição para o *Mc1r* indicaram que este gene possui evolução rápida, próxima a genes do sistema imune (e.g. interferon, imunoglobulinas).

Além da abordagem molecular do *Mc1r*, tendo como foco a associação com convergências evolutivas entre fenótipos similares, investigou-se neste estudo a convergência em nível morfológico entre espécies filogeneticamente distantes, que ocuparam de forma independente habitats similares no ambiente costeiro. Padrões

conspícuos de convergência morfológica foram observados entre *C. talarum* e *C. minutus* e *C. australis* e *C. flamarioni*. Em particular, verificou-se que o mecanismo utilizado por *C. australis* e *C. flamarioni* na produção da pelagem clara implica na redução do comprimento e densidade de pigmento na banda terminal do pelo. Também, no aumento da banda subterminal, e diminuição da densidade de pigmento. Em *C. talarum* e *C. minutus*, observou-se o aumento no comprimento e densidade de pigmento da banda terminal, e redução da banda subterminal. Assim, torna-se evidente que a variação no padrão de distribuição e densidade de melanina influencia de forma direta a pelagem geral do indivíduo. As espécies claras ocorrem em ambientes com substrato marcadamente mais claro, e menor cobertura vegetal, conforme demonstrado neste estudo. Similarmente, as espécies escuras ocorrem em substratos escuros e cobertura vegetal ampla. Em resumo, observou-se um padrão de associação conspícua entre a coloração da pelagem geral do indivíduo, em particular do dorso e flanco, com a cor do substrato, evidenciando um comportamento críptico anti-predação em potencial. Assim, é sugerido que a manutenção destas espécies nos dois tipos de habitats (dunas e campos) ocorre não somente por influência de características ambientais (e.g. dureza do solo), e de história de vida (e.g. tamanho corporal), mas principalmente por pressões seletivas impostas pela predação diferencial sobre fenótipos conspícuos. Tal consideração é reforçada pela restrição da variância nos parâmetros morfológicos analisados para espécies claras, que potencialmente sofrem maior pressão de seleção em razão da menor cobertura vegetal. Interessantemente, as maiores taxas de dispersão são reportadas para as espécies claras, evidenciando a importância da coloração críptica. Entretanto, as inferências de vantagem adaptativa da coloração da pelagem são especulativas, com apenas base dos dados morfológicos e ecológicos obtidos neste estudo. Dessa forma, são

necessários experimentos controlados para quantificar a taxa de sobrevivência diferencial, como reportado por Vignieri et al. (2010) para o roedor *Peromyscus*. Experimentos deste tipo serão conduzidos após a finalização deste estudo.

Por fim, investigou-se o envolvimento de mutações em um gene altamente pleiotrópico sobre a variação morfológica observada. Especificamente, abordou-se o gene *Edar* e o correspondente papel na conversão de pelos-guarda em espinhos ou pelos aristiformes em diferentes famílias de roedores silvestres. Através de ampla abordagem em termos taxonômicos, compreendendo as principais famílias que possuem táxons representativos do fenótipo espinhento, verificou-se que este tipo de pelagem evoluiu pelo menos seis vezes independentemente em Rodentia, com base em aspectos estruturais do pelo. Quatro famílias (Cricetidae, Muridae, Echimyidae e Erethizontidae) apresentaram mudanças de aminoácidos exclusivas em táxons com fenótipo espinhento, demonstrando a ocorrência de mutações em genes cuja pressão de seleção é alta. O mapeamento de mutações no gene *Edar*, associado a mudanças morfológicas conspícuas, tal como o grau de elipticidade no corte transversal verificado em humanos (Fujimoto et al. 2008), foi um ponto de partida para considerar a evolução de pelos-guarda modificados em espinho em outros mamíferos, como roedores. Assim, sugere-se o envolvimento do *Edar* com a morfologia dos pelos também nas espécies silvestres. Entretanto, similarmente as mudanças encontradas no gene *Mc1r* neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação causal direta entre o *Edar* e determinadas variáveis morfológicas do pelo por duas razões: (i) a espécie de ouriço *Coendou spinosus*, filogeneticamente próxima a *Erethizon dorsatum*, não apresentou a substituição Gly⁵⁵Ser, embora a morfologia dos espinhos destas duas espécies seja idêntica; (ii) são se tem

informação sobre alterações na função do receptor para as quatro substituições de aminoácido encontradas, sendo necessário ensaios *in vitro* de maneira a caracterizar estes possíveis efeitos.

Porém, os dados obtidos nesta pesquisa demonstram que é possível a ocorrência de mutações em genes pleiotrópicos, contrariamente ao sugerido em estudos anteriores. Em adição, a inferência do papel do *Edar* em mamíferos é de extrema relevância para compreensão dos processos evolutivos de diversificação neste grupo. De acordo com os dados morfológicos, cada família apresenta um padrão de espinho ou pelo aristiforme, evidenciando diferentes caminhos evolutivos, isto é, mecanismos que convergiram para a mesma estrutura. Também foram verificados aspectos convergentes nos pelos-guarda modificados das seis famílias, tal como o grau de concavidade e a presença de septos laterais no espinho.

Referencias Bibliográficas

- Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J. 2009. Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) in Cetartiodactyla. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 550–557
- Graur D, Li W.-H: *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland, Sinauer 2000
- Hoekstra HE. 2010. From mice to molecules: the genetic basis of color adaptation. In the *Light of Evolution: Essays from the Laboratory and Field*. (Ed. J.B. Losos). Roberts and Co. Publishers, Greenwood Village, CO.

- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bundry RJ, Insel P, Crossland JP. 2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive color pattern in beach mice. *Science* 313: 101-104.
- Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL, Suzuki H. 2005. Independent nonframeshift deletions in the *Mc1r* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *Journal of Heredity* 96: 607-613.
- Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26:231-239
- Li W-H. 1997. *Molecular evolution*. Sunderland: Sinauer.
- Mundy NI, Kelly J. 2003. Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *American Journal of Physical Anthropology* 121: 67-80.
- Steiner CC, Römpler H, Boettger LM, Schöneberg T, Hoekstra HE. 2009. The genetics basis of phenotypic convergence in beach mice: similar pigmentation patterns but different genes. *Molecular Biology and Evolution* 26: 35-45.
- Vignieri SN, Larson J, Hoekstra E. 2010. The selective advantage of cryptic coloration in mice. *Evolution* 64: 2153-2158.
- Wlasiuk G, Nachman MW. 2007. The genetics of adaptive coat color in gophers: Coding variation at *Mc1r* is not responsible for dorsal color differences. *Journal of Heredity*, 98: 567-574

Apêndice 1

Lista de identificação das amostras de tecido das espécies de ctenomídeos utilizadas.

Espécie	N	Identificação da amostra	Pesquisador- Coleção Científica*	Grupo Filogenético**	Fenótipo(S)	Habitat/Substrato
<i>Ctenomys australis</i>	4	C1; UNMDP1, UNMDP2, UNMDP3	M.MORA-UNMDP	Mendocinus	<i>Agouti</i> claro	Dunas litorâneas/claro
<i>Ctenomys boliviensis</i>	1	NK15367	E.LESSA-UdelaR	Boliviense- Matrogrossense	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys chasiquensis</i>	3	UNMDP7, UNMDP8, UNMDP9	M.MORA-UNMDP	Mendocinus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro Dunas arenosas/claro
<i>Ctenomys dorbygni</i>	1	PM2	P.MIROL-UBA	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys flamarioni</i>	5	G118; JS13; JS15; JS16; JS17	T. FREITAS-UFRGS	Mendocinus	<i>Agouti</i> claro	Dunas litorâneas/claro
<i>Ctenomys haigi</i>	1	MVZ 184888	E. LACEY- MVZ-UC Berkeley	Indefinido	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys lami</i>	5	BC10; NC117; NC119; NC122; NC176	T. FREITAS-UFRGS	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys leucodon</i>	1	NK14790	E.LESSA-UdelaR	Indefinido	<i>Agouti</i> marrom-dourado	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys maulinus</i>	1	MVZ 183300	E. LACEY- MVZ-UC Berkeley	Patagônico	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys mendocinus</i>	1	MVZ 169031	E. LACEY- MVZ-UC Berkeley	Mendocinus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys minutus</i>	5	TR1137; TR1138; TR844; TR845; TR854	T. FREITAS-UFRGS	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro Dunas arenosas/claro
<i>Ctenomys nattereri</i>	1	TR1110	T. FREITAS-UFRGS	Boliviense- Matrogrossense	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys pearsoni</i>	3	EMG1791; EMG1792; CA369	E.LESSA-UdelaR	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro Dunas arenosas/claro
<i>Ctenomys perrensi</i>	1	PM3	E.LESSA-UdelaR	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys porteousi</i>	3	UNMDP10, UNMDP11, UNMDP12	M.MORA-UNMDP	Mendocinus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys rionegrensis</i>	4	EV1043; EV1034; EV1030; EV1031	E.LESSA-UdelaR	Mendocinus	<i>Agouti</i> marrom; melânico	Campos arenosos/escuro Dunas arenosas/claro
<i>Ctenomys roigi</i>	1	PM1	P.MIROL-UBA	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys sociabilis</i>	1	MVZ 166425	E. LACEY- MVZ-UC Berkeley	Indefinido	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys steinbachi</i>	1	NK12133	E.LESSA-UdelaR	Boliviense- Matrogrossense	<i>Agouti</i> marrom	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys talarum</i>	4	IF02, UNMDP4, UNMDP5, UNMDP6	M.MORA-UNMDP	Talarum	<i>Agouti</i> marrom, canelado	Campos arenosos/escuro
<i>Ctenomys torquatus</i>	23	JR320; JR321; JR322; JR323; JR324; JR325; JR334; JR397; JR399; JR400; JR401; JR402; JR412; JR413; JR414; JR415; JR416; TR917; TR918; TR1033; TR1034; TR1258	T. FREITAS-UFRGS	Torquatus	<i>Agouti</i> marrom; <i>Agouti</i> marrom com manchas brancas; acinzentado; melânico;	Campos arenosos/escuro

***Pesquisadores e Instituições:** Matias Sebastián Mora-Universidad Nacional de Mar Del Plata (UNMDP), Argentina; Enrique Lessa-Universidad de La República (UdelaR), Uruguai; Patrícia Mirol-Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina; Thales Renato Ochotorena de Freitas-Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil; Eileen Lacey- Museum of Vertebrate Zoology-University of California (UC) Berkeley, Estados Unidos; ** Os grupos seguem a classificação proposta por Parada *et al.* (2011).