Ana Paula Aprício Assis

Estudo de padrões de distribuição da
diversidade genética e morfológica em
Didelphis aurita (Didelphidae,
Didelphimorphia): investigando a biogeografia
da Floresta Atlântica

Study of the patterns of distribution of genetics and
morphological variation in *Didelphis aurita* (Didelphidae,
Didelphimorphia): investigating the Atlantic Forest
biogeography

São Paulo
2011

Ana Paula Aprício Assis

Estudo de padrões de distribuição da
diversidade genética e morfológica em
Didelphis aurita (Didelphidae,
Didelphimorphia): investigando a biogeografia
da Floresta Atlântica

Study of the patterns of distribution of genetics and
morphological variation in *Didelphis aurita* (Didelphidae,
Didelphimorphia): investigating the Atlantic Forest
biogeography

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Biologia, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Versão corrigida

Orientador: Prof.Dr. Gabriel Marroig

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Aprício-Assis, Ana Paula

Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita* (Didelphidae, Didelphimorphia): investigando a biogeografia da Floresta Atlântica

185 páginas- **Versão corrigida.** A versão original encontra-se disponível na biblioteca do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Biogeografia 2. *Didelphis aurita* 3. Floresta Atlântica. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Lena Geise

Prof(a). Dr. João Alexandrino

Prof(a). Dr. Gabriel Henrique Marroig Zambonato
Orientador(a)

Ao meu porto seguro:
Paulo, Ana Lúcia,
Fábio, Mariana, Daniela e Marlon

"I can't believe that!" said Alice.

"Can't you?" the queen said in a pitying tone. "Try again,
draw a long breath, and shut your eyes."

Alice laughed. "There's no use trying," she said. "One can't
believe impossible things."

"I dare say you haven't had much practice," said the queen.
"When I was your age, I always did it for half an hour a day.
Why, sometimes I've believed as many as six impossible
things before breakfast."

Lewis Carroll

Agradecimentos

“...The notion that one can begin anything at all from scratch, free from the past, or unindebted to others, could not conceivably be more wrong...” Karl Popper

Em primeiro lugar gostaria de agradecer meu orientador Gabriel, em especial por ser um exemplo de ética. Principalmente por me dar independência para trabalhar. Você não tem ideia do quão feliz eu fui e sou neste laboratório,

As pessoas que ao longo destes anos ajudaram no desenvolvimento deste projeto:

Em especial a todos os pesquisadores que doaram tecidos: Prof. Dr. Rui Cerqueira (Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ), Profa. Dra. Lena Geise (Universidade Estadual do Rio de Janeiro-UERJ), Prof. Dr. James Patton (Museum of Vertebrate Zoology, University of California-MVZ), Prof. Dr. Mario de Vivo (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo-MZUSP), Prof. Dr. Miguel Trefault (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Yatiyo Yassuda (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Renata Pardini (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Valéria Fagundes (Universidade Federal do Espírito Santo-UFES), Profa. Dra. Eleonora Costa (Universidade Federal do Espírito Santo-UFES), Prof. Dr. Maurício Graipel (Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC), Prof. Dr. Diego Astúa de Moraes (Universidade Federal de Pernambuco-UFPE), Prof. Dr. Renato Gregorin (Universidade Federal de Lavras) e Msc. Paulo Asfora (Universidade Estadual do Rio de Janeiro-UERJ).

À Sofia Silva, Miguel Carneiro e Prof. Nuno Ferrand que desenvolveram os primers (G6PD) usados aqui,

À Leila Shirai por te sido praticamente uma orientadora na minha iniciação científica e uma grande companheira neste mestrado,

Ao Harley Sebastião que me ajudou muito com as análises morfológicas,

As amigas Daniela Rossoni e Bárbara Costa por terem me ajudado com várias análises, me ensinado muito sobre mamíferos além de lerem e se disporem a discutir vários aspectos desta dissertação,

Ao Guilherme Garcia pela ajuda com as contas,

À grande amiga Ana Cristina Fazza por ter lido toda minha dissertação, conferido as referências bibliográficas e colocado muitas vírgulas,

À Roberta Paresque por toda ajuda com a parte molecular, sem você o caminho seria muito mais difícil, além de ser muito menos divertido,

À Tavani Palomares Medeiros que me hospedou um mês no Rio de Janeiro, com direito a passeios turísticos e caipirinha com mpb na praia.

Ao curador do Museu Nacional no Rio de Janeiro Prof. Dr. João Alves e à Stella que permitiram meu acesso à coleção e por terem sido extremamente prestativos,

Ao curador do Museu de Zoologia da USP Prof. Dr. Mario de Vivo, e a Juliana por terem permitido meu trabalho na coleção,

Ao Paulo Asfora por ter me ensinado muito sobre mamíferos e por ter coletado a maior parte dos *Didelphis* do Nordeste, permitindo a existência do capítulo 3 e por ter cedido gentilmente fotos de *D. aurita*,

Aos membros da banca por se disporem a ler e contribuir para este trabalho,

Aos melhores professores que alguém pode ter: à Prof. Denise Rossa-Feres, espero um dia ter o seu entusiasmo ao ensinar; ao Prof. Reinaldo Feres, que ensinando invertebrados fez com que eu me apaixonasse por evolução; e a Prof Renata Pardini, por permitir a coleta do meu primeiro pequeno mamífero e por ser um exemplo profissional de ética e ciência de qualidade,

Ao Prof Diogo Meyer que me apresentou a coalescência,

A Prof Dr. Joseph Heled, que tão pacientemente me explicou como implementar o “extended bayesian skyline plot” em várias horas de gtalk,

A Fapesp pelo apoio financeiro,

Ao meu pai que deu todo apoio, fazendo muito mais que o necessário para que seguíssemos nossos sonhos, não só para mim como para todos meus irmãos... A sua alegria de estudar sempre me inspirou,

A minha mãe, meu exemplo de vida, que tem o maior coração do mundo (tem que ter pra caber 5 filhos), que não faz ideia do que eu faço, mas que tem o maior orgulho de mim mesmo assim,

Aos meus irmãos: Dani, Má, Fábio e Marlon, companheiros da vida,

Aos irmãos que a vida me deu e sem os quais minha vida seria extremamente monótona: Oscarzinho, Helô, Tatá, Paula, Nadia, Cris, Bruna, Brumas, Carol, Vanessa, Gabriel, Hil, Cíntia, Miuk, Ana Z e Elen,

Aos amigos que fiz no laboratório: Karina, Leila, Arthur, Felipe (Fino), Harley, Guilherme (Pato), Dani, Bárbara (Tafinha), Roberta e Diogo... e mais recentemente

Alex e Aninha. Todos vocês me ajudaram muito, desde de análises e discussões até as baladas... Vocês são ótimos!

As meninas que moram comigo: Thati, Carol e Dé, muito obrigada por terem aguentado fósseis, esqueletos e peles de cobras espalhados pela casa!

A todos os gambás que morreram para que este trabalho pudesse ser feito!

A John, Paul, George, Ringo, Cazuzza, Vinícius, Toquinho, Cartola, e muitos outros, que me ajudaram a superar horas e mais horas de intermináveis alinhamentos! Eu não conseguiria sem vocês,

Ao Guilherme, por ser você, por ter tido toda a paciência do mundo, por gostar de mim apesar daquilo que eu sou, e digo mais, eu sou muito melhor com você.... tenho certeza que a gente ainda tem muito pela frente...

Índice

Capítulo 1.		01
<i>Introdução</i>	Biogeografia	02
	Mata Atlântica	05
	Modelos de diversificação	11
	Gambás-de-orelhas-pretas	15
	A abordagem	18
	Referências bibliográficas	19
 Capítulo 2.		 24
<i>Metodologia e Resultados gerais</i>	Metodologia	25
	Resultados	35
	Referências bibliográficas	40
 Capítulo 3.		 41
<i>Biogeografia dos gambás-de-orelhas-pretas:</i>	Resumo	42
<i>Analisando a história</i>	Abstract	43
<i>biogeográfica das florestas tropicais</i>	Introdução	44
	Material e Metodologia	48
	Resultados	57
	Discussão	69
	Conclusões	80
	Referências bibliográficas	81
 Capítulo 4.		 86
<i>Estudo de padrões de variação genética e morfológica em Didelphis aurita: testando a Hipótese de Refúgios na Mata Atlântica</i>	Resumo	87
	Abstract	88
	Introdução	89
	Material e Metodologia	94
	Resultados	110
	Discussão	132
	Conclusões	148
	Referências bibliográficas	149
 Capítulo 5.		 154
<i>Considerações Finais</i>		
Resumo		157
Abstract		158
Anexos		159

Capítulo 1

Introdução

A biogeografia é a ciência que busca entender as distribuições geográficas atuais e passadas das espécies de animais e plantas (MacDonald, 2002). Os objetivos da biogeografia são descobrir onde os organismos vivem, em que abundância e porque vivem (ou não) em determinada área. Esta é uma ciência ampla e multidisciplinar. Conhecimentos de biologia, geografia, climatologia e geologia são necessários para um completo entendimento dos processos que originaram a distribuição das diferentes espécies.

A distribuição de uma espécie depende tanto de aspectos ecológicos, como por exemplo, temperatura, umidade, luminosidade quanto de aspectos históricos. Por exemplo, não encontramos um urso polar (*Ursus maritimus*) vivendo nas florestas tropicais, isto porque ecologicamente é um animal que está adaptado à temperaturas mais frias. Mesmo assim não encontramos este mesmo urso vivendo no pólo sul da terra, região que possui variáveis ecológicas similares às do hábitat deste animal (Ártico). Isso acontece porque historicamente a linhagem que deu origem aos ursos polares habitavam a Laurásia e não a Gondwana.

A noção de que história e ecologia se interligam determinando a distribuição das espécies já é antiga. Charles Darwin em seu livro a “Origem das Espécies” (1858) usou a distribuição geográfica de plantas e animais como uma das evidências suportando a teoria da evolução. Na mesma época de Darwin, Alfred Russel Wallace, co-descobridor da teoria de seleção natural, escreveu o livro “A distribuição geográfica dos animais” (1876). Este naturalista estudou a distribuição das espécies em locais os mais variados como o arquipélago malaio e a Amazônia, sendo, portanto, considerado o pai da biogeografia.

Uma das perguntas mais instigantes no campo da biogeografia é entender porque existem tantas espécies nos neotrópicos, em especial em suas florestas tropicais (Floresta Amazônica e Floresta Atlântica). Esta pergunta se subdivide em duas outras igualmente interessantes: como surgiu tal diversidade de espécies, e como esta diversidade vem sendo mantida e por quanto tempo. É provável que ambas as respostas contribuam para a biodiversidade neotropical.

O objetivo desta dissertação é contribuir com um estudo de caso a fim de aumentar o conhecimento sobre a primeira destas perguntas. A pergunta sobre a origem da biota neotropical. Mais especificamente, quais os mecanismos e processos que levaram ao surgimento e diversificação em uma das florestas tropicais deste continente, a Mata Atlântica.

Para entendermos de forma global o que gerou a diversidade na Floresta Atlântica, precisamos em primeiro lugar entender a fundo sua história geológica, geográfica e ecológica. Isso porque conforme dito acima estes são os fatores que afetam a distribuição das espécies e desta forma o surgimento de novas espécies. Basicamente, os fatores levados em consideração podem ser listados como: variação latitudinal, variação altitudinal, (e, portanto, variação climática) alteração histórica do relevo, presença de rios, e alteração no nível do mar. A contrapartida biológica desta história também possui características que devem ser levadas em consideração, tais como: área de vida e/ou capacidade de dispersão, generalidade ou especialização de hábito e habitat, biologia reprodutiva, tamanho populacional, expectativa de vida, tempo de geração, entre outros. Dessa forma, responder a esta pergunta necessita de uma abordagem integrativa, que leve em consideração aspectos específicos do grupo e região estudados, o que suscita a necessidade de estudos multidisciplinares e

conhecimentos bastante diversos. Esta dissertação não tem, portanto, a presunção de ser a última palavra sobre biogeografia da Floresta Atlântica, e sim contribuir com uma pequena parte no entendimento dos processos que foram importantes na diversificação da sua biota através de um estudo de caso.

Desta forma começarei apresentando as características do bioma focal deste estudo, a Mata Atlântica, dando especial ênfase a processos ecológicos e históricos que possam afetar a diversidade biológica. Posteriormente, serão detalhadas as hipóteses de diversificação que já foram propostas para este bioma. E por fim será discutido o organismo escolhido para estudo, levando-se em consideração aspectos ecológicos e históricos da escolha.

A Mata Atlântica é uma das maiores florestas tropicais do mundo, originalmente cobrindo uma região de cerca de 150 milhões de hectares em ambientes altamente heterogêneos (Ribeiro et al., 2009). Sua distribuição abrange desde o norte do Rio Grande do Norte ao sul do Rio Grande do Sul, por toda costa brasileira, se estendendo centenas de quilômetros continente adentro (Disnerstein *et al*, 1995).

É uma floresta que ocupa uma larga faixa latitudinal (de 5° sul a 30° sul) o que implica em grande variação da temperatura e umidade, cobrindo regiões tropicais e sub-tropicais. Além disso, a ampla variação longitudinal também é importante na produção de diferentes composições florestais, por causa da diminuição na quantidade de chuva quanto mais longe da costa. Regiões costeiras recebem muitas chuvas ao longo do ano, superando os 4000mm, enquanto regiões interiores recebem cerca de 1000mm/ano (Câmara, 2003). A Floresta Atlântica também possui uma ampla variação altitudinal (do nível do mar até cerca de 1700 metros), além de múltiplos tipos vegetacionais tais como, formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas (Figura 1.1) (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1993).

Esta é uma das florestas mais diversas do mundo, e também possui elevados níveis de endemismo (Myers *et al.*, 2000). Sua riqueza inclui mais de 20.000 espécies de plantas, 260 espécies de mamíferos, 680 espécies de pássaros, 200 de répteis e 280 espécies de anfíbios, além de muitas espécies que ainda necessitam de descrições científicas formais (Goerck, 1997; Mittermeier *et al.*, 1999; Silva & Casteleti, 2003). Estima-se que a fauna e flora da Floresta Atlântica corresponda a 1-8% de todas as espécies do mundo (Silva & Casteleti, 2003).

Figura 1.1. Tipos vegetacionais originais da Mata Atlântica brasileira. Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2006.

No entanto, esta é também uma das florestas mais ameaçadas do mundo, sendo considerada uma das áreas prioritárias para conservação (*hotspot*) (Myers *et al.*, 2000). Ribeiro *et al.* (2009) estimaram que restam cerca de 12% de sua cobertura original (Figura 1.2). Sendo que a maior parte dos fragmentos ocupam uma área inferior à 50 hectares cada (Ribeiro *et al.*, 2009).

Sob uma perspectiva atual, a Floresta Atlântica encontra-se isolada de qualquer outra formação vegetal florestal da América do Sul pelas formações abertas: Cerrado, Caatinga e Chaco (Silva *et al.*, 2004). A importância do ponto de vista biogeográfico é

de que caso táxons irmãos não sejam reciprocamente monofiléticos, isso pode indicar um contato histórico da Mata Atlântica com outras florestas.

Figura 1.2. Distribuição da Floresta Atlântica no Brasil, com os fragmentos florestais ainda restantes. Modificada de Ribeiro *et al.* (2009).

A Floresta Atlântica possui relevo e história geológica complexa, possuindo várias unidades de relevo, desde planaltos na sua porção interior, serras e planícies costeiras. O planalto Atlântico localizado desde o norte de Santa Catarina até o sul da Bahia é delimitado em sua borda oriental pelas Serra do Mar, Mantiqueira e Espinhaço. São nestas serras onde se localizam as maiores altitudes da Floresta Atlântica, sendo que as altitudes vão diminuindo em sua região ocidental (Freitas,

1951). Os tipos vegetais nestas porções são: campos de altitude nos topos de algumas de suas montanhas, floresta ombrófila densa nas encostas das montanhas e planícies costeiras, e floresta semidecidual na sua porção mais interior. O Planalto da Borborema se localiza nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco e, igualmente ao Planalto Atlântico, possui suas maiores altitudes na porção oriental, diminuindo em direção ao interior. Os tipos vegetacionais do Planalto da Borborema seguem o mesmo padrão das outras serras (Freitas, 1951). A hipótese mais aceita para a formação de suas montanhas, tais como Serra do Mar (2500 m de altura) e Serra da Mantiqueira (2700 m de altura), é a de que foram formadas por arqueamento e ruptura do escudo brasileiro, sendo que o primeiro levantamento provavelmente ocorreu durante o Cenozóico (Simpson, 1979 *apud* Lara & Patton, 2000). Três períodos de movimentos epirogenéticos contribuíram para o aumento de 1200 m ou mais, sendo o primeiro no final do Cretáceo e os outros dois durante o Terciário (Freitas, 1951). As Serras do Mar, da Mantiqueira, do Espinhaço e Borborema foram formadas durante as duas últimas partes do soerguimento, diretamente ligadas ao soerguimento dos Andes (Freitas, 1951). Infelizmente existem poucos dados precisos sobre o tempo e magnitude de soerguimento. Alguns estudos afirmam que a taxa de soerguimento da Serra do Mar foi baixa no começo do Cretáceo (Soares & Landin, 1976), aumentando significativamente no Mioceno, continuando até recentemente há cerca de 52.000 - 20.000 anos atrás (Petri & Fúlvaro, 1983; Riccomini *et al.*, 1989).

Diferentemente da Amazônia, a maior parte dos rios da floresta Atlântica são de pequeno porte, isto é, são rios relativamente estreitos e rasos, com fundos pedregosos, e por isso em sua maioria não devem ser uma barreira à dispersão da maior parte das espécies. Alguns deles, entretanto, possuem um porte maior como o

Rio Paraíba do Sul, Rio São Francisco ou Rio Doce. Na literatura há poucos registros sobre a formação destes rios, tornando, portanto, difícil caracterizar o período de formação, ou quando atingiram o atual curso e foz. Martin *et al.* (1993) fizeram uma revisão sobre o estabelecimento dos deltas dos principais rios atlânticos (Doce, Paraíba do Sul, São Francisco e Jequitinhonha), e afirmam que estes só atingiram a foz atual depois da última grande transgressão quaternária (transgressão Flandriana- 6.000-3.000 anos) alguns deles passando por períodos estuarinos.

Outro fator importante são as mudanças climáticas cíclicas que ocorrem devido aos ciclos de Milankovitch e que aparentemente tiveram grande importância no Quaternário. Embora para o hemisfério norte seja bem estabelecido que houveram ciclos glaciais (tempo frio e seco) e interglaciais (chuvoso e úmido), para o hemisfério sul é bastante discutido como os períodos glaciais teriam afetado o clima e a vegetação na. Behling (2002) compilou dados de 14 sítios palinológicos ao longo das porções sul e sudeste da Mata Atlântica concluindo que as regiões hoje ocupadas por florestas de araucárias, foram substituídas durante o último período glacial por gramíneas. Os registros para o sudeste do Brasil mostraram que as regiões hoje ocupadas por cerrado e floresta semidecídua, foram também substituídas por gramíneas e em alguns locais por florestas de galeria subtropicais (Behling, 2002). Esta revisão mostra que as gramíneas dominaram as regiões sul e sudeste do Brasil (20° sul – 28° sul) durante a última era glacial, sendo o clima estimado para esta região em cerca de 5-7°C mais frio que o atual. Este padrão é concordante com o encontrado por Ledru *et al.* (2009) para um sítio palinológico no estado de São Paulo. Outros autores encontraram um padrão de clima mais frio, porém com permanência do clima úmido, tanto por evidências palinológicas quanto geomorfológicas, para áreas de Santa

Catarina e São Paulo (Oliveira *et al.*, 2008; Pessenda *et al.*, 2009). Na porção nordeste da Floresta Atlântica este padrão se inverte, sendo que Auler *et al.* (2004), baseados em dados de espeleotemas mostraram que houveram períodos mais úmidos nos últimos 210 mil anos. Dados biogeográficos, paleontológicos e palinológicos também dão suporte a estes períodos mais úmidos com expansão dos ambientes florestais (Wang *et al.*, 2004; Auler *et al.*, 2004; Vivo, 1997; Ledru, 1993; Prado & Gibbs, 1993).

A biodiversidade dos trópicos tem intrigado os naturalistas desde Darwin, sendo que várias hipóteses já foram propostas para explicar os padrões de distribuição e biodiversidade que se encontram nos trópicos. Dentre as hipóteses propostas, a maior parte estão de acordo com a escola biogeográfica clássica, baseadas em eventos de separação vicariante (alopátrica) entre as espécies.

Especificamente para a Mata Atlântica várias hipóteses foram propostas, sendo que parte delas foram originalmente propostas para a Amazônia e depois estendidas para a Floresta Atlântica. É importante ressaltar que a Floresta Atlântica possui história geológica igualmente complexa e distinta da região amazônica, o que torna hipóteses propostas para um dos biomas não necessariamente aplicáveis ao outro.

A **Hipótese de Refúgios** foi proposta primariamente para explicar a distribuição de aves na Amazônia por Haffer (1969) e a distribuição de lagartos do gênero *Anolis*, na Mata Atlântica por Vanzolini e Williams (1970). Esta hipótese se fundamenta nas mudanças climáticas cíclicas ocorridas durante o Terciário e Pleistoceno, nos quais períodos glaciais e interglaciais se intercalaram. Acredita-se que estas mudanças na temperatura e umidade foram responsáveis por contrações e expansões da floresta, levando as espécies a se isolarem por um tempo considerável, o que teria resultado no surgimento de novas espécies (Marroig & Cerqueira, 1997; Haffer, 1993). Dados sobre a importância das retrações florestais na Mata Atlântica são escassos, como visto acima, sendo que existe certo consenso de que pelo menos no sul da Mata Atlântica houve retração da floresta. Diversos estudos recuperaram o padrão esperado para esta hipótese (alta diversidade nas regiões de refúgios e baixa divergência nas regiões que sofreram retrações durante as eras glaciais, além de evidência de expansão

demográfica nestas regiões), como exemplo Carnaval *et al.* (2009) com anfíbios; Cabanne *et al.* (2008) e Cabanne *et al.* (2007) com uma espécie de passeriforme; além de estudos que encontram um claro padrão de expansão demográfica em clados do sul da floresta o que é concordante com os dados de palinologia (*e.g.* Grazziotin *et al.*, 2006, com jararaca, Tchaika *et al.*, 2007, com lobo-guará e Martins *et al.*, 2007, com morcego-vampiro). Contudo, a influência de refúgios na Mata Atlântica está longe de ser consenso e vários estudos rejeitam esta hipótese (*e.g.* Lara *et al.*, 2005, e Lara & Patton, 2000, com roedores, Leite, 2003 e Geise *et al.*, 2001 também com roedores).

Outra hipótese proposta para o bioma amazônico (Wallace, 1849; Ayres & Clutton-Brock, 1992), mas depois extrapolada para a Mata Atlântica é a **Hipótese de Rios** (Pellegrino *et al.*, 2005), a qual se baseia na separação de espécies pelo surgimento e ascensão do nível da água de afluentes de uma rede de rios, o que restringiria o fluxo gênico entre populações em cada margem, levando a diferenciação de espécies. Conforme já mencionado, a dimensão dos rios atlânticos são menores que os amazônicos sendo, portanto, mais discutível o papel deles como barreiras à dispersão. Além disso, a escassez de informações confiáveis a respeito de sua origem torna mais complicada a determinação de sua atuação como barreiras primárias ou secundárias e o eventual teste desta hipótese. O estudo citado para Mata Atlântica foi realizado com lagartos na região sudeste e sul da Mata Atlântica (Pellegrino *et al.*, 2005).

A **Hipótese de Vicariância Geotectônica** (Platnick & Nelson, 1978; Cracraft & Prum, 1988) prediz que as populações são separadas por eventos de mudanças paleogeográficas (como a separação de continentes ou soerguimento de montanhas) e se diferenciam alopatricamente por longos períodos de tempo. Esta hipótese é

amplamente discutida na literatura para os mais variados ambientes e táxons (*e.g.* Ribas *et al.*, 2005; Cracraft & Prum, 1988), sendo que toda uma escola biogeográfica se desenvolveu baseada em eventos de separação vicariante. Para a Mata Atlântica, poucos estudos exploram os efeitos do soerguimento de suas montanhas. Um dos poucos exemplos é o trabalho de Leite (2003) que relaciona o soerguimento das montanhas com a diversificação de um grupo de roedores equimídeos. A questão relevante para estudos biogeográficos é se estas serras são suficientemente altas para funcionar como uma barreira para a fauna e se sim, quando elas se tornaram efetivamente uma barreira. Além do estudo de Leite (2003), a hipótese de vicariância geotectônica até hoje não foi explicitamente testada na Mata Atlântica, embora suas inúmeras serras e picos sugiram que estas possam ter tido um papel na diferenciação de linhagens. O mais próximo de um teste formal desta hipótese na Mata Atlântica foi realizado por Cabanne *et al.* (2007) e Cabanne *et al.* (2008) que demonstraram para uma espécie de passeriforme que a formação das montanhas não teve influência na geração de diversidade genética deste grupo. Lara *et al.* (2005), encontraram um padrão em espécies de mamíferos não voadores que pode ser explicado por isolamento em montanhas, embora não tenham testado o tempo de divergência necessário para a corroboração da hipótese.

A **Hipótese de Gradientes Ecológicos** é a única dentre as apresentadas aqui que não é baseada em modelos de especiação alopátrica. Esta hipótese postula que seleção diversificadora sobre fortes gradientes ambientais seria suficiente para causar a diferenciação e especiação, mesmo tendo fluxo gênico (Endler, 1977). Esta hipótese baseia-se nas diferenças ecológicas entre habitats. Como a Mata Atlântica possui um gradiente latitudinal e de tipos vegetacionais bem grande, esta hipótese já foi proposta

mais de uma vez para explicar possíveis divergências entre linhagens (Lara & Patton, 2000; Leite, 2003). O único estudo que encontrou evidência de associação entre diferentes habitats (gradiente ecológico) foi o de Lara & Patton (2000), no qual táxons apareciam associados a diferentes tipos de habitats, como floresta ombrófila densa e floresta semidecidual (táxons costeiros e táxons interiores). Por outro lado, Marroig *et al.* (2004) encontraram resultados contrários aos esperados por esta hipótese, uma vez que não encontraram associação entre clima e outras variáveis ecológicas com a diversidade morfológica em um grupo de espécies de saguis (*Callithrix*).

Um padrão amplamente encontrado na Floresta Atlântica é uma quebra entre táxons do Norte e do Sul da floresta. Embora nem todos os estudos concordem na posição geográfica exata desta quebra, ela em geral ocorre entre os estados de Espírito Santo e a Bahia (Moraes-Barros *et al.*, 2006; Tchaika *et al.*, 2007; Lara & Patton, 2000; Ditchfield, 2000; Geise *et al.*, 2001; Grazziotin *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2007). A razão para tal divisão geralmente é atribuída a isolamento por distância, ou alguma diferenciação da vegetação (Lara & Patton, 2000), mas nunca foi explorado de maneira empírica se há uma razão histórica ou ecológica para a quebra dos mais variados táxons ocorrerem mais ou menos na mesma região.

Os estudos biogeográficos empíricos na Mata Atlântica ainda são escassos e os padrões que eles recuperam nem sempre são congruentes, o que é esperado dado que diferentes eventos históricos afetam de maneira diferente os táxons. Mesmo porque esta floresta possui grande variação física (orográfica, latitudinal e de tipos de vegetação) e diferentes organismos são naturalmente afetados por diferentes fatores ecológicos.

Gambás-de-orelhas-pretas

A ordem Didelphimorphia é endêmica e autóctone do novo mundo (Marshall *et al.*, 1979). Esta ordem faz parte dos mamíferos metatérios (marsupiais) e, portanto, não possuem placenta verdadeira. Existe dentro desta ordem apenas uma família, a família Didelphidae, com 19 gêneros e 96 espécies viventes (Gardner, 2008; Voss & Jansa, 2003). A família Didelphidae pode ser subdividida em duas sub-famílias: Caluromyinae e Didelphinae (Gardner, 2008). Dentro de Didelphinae está o gênero *Didelphis*, gênero no qual estão os maiores animais da família (Gardner, 2008).

O gênero *Didelphis* é formado por seis espécies que se distribuem por toda a América do Sul, com uma espécie ocorrendo na América do Norte. Esta espécie, *D. virginiana*, é a espécie basal do gênero (Patton *et al.*, 2003). As outras espécies do grupo podem ser divididas em gambás-de-orelhas-brancas (grupo *albiventris*) e gambás-de-orelhas-pretas (grupo *marsupialis*). O primeiro grupo é formado pelas espécies: *D. albiventris*, *D. imperfecta* e *D. pernigra* e ocupam as áreas abertas da América do Sul. O segundo grupo é formado por *D. marsupialis* e *D. aurita* que ocupam as regiões florestais da América do Sul (Cerqueira, 1985; Voss & Jansa, 2009).

Há debate na literatura se as espécies do grupo *marsupialis* podem ser consideradas espécies distintas (Cabrera, 1957; Hershkovitz, 1969), uma vez que, por caracteres qualitativos elas não podem ser separadas. Porém, dado que ambas formam grupos distintos baseados tanto em características moleculares (Patton *et al.*, 2003) quanto morfométricas (Cerqueira & Lemos, 2000), atualmente são aceitas como duas espécies. Além disso, estas espécies possuem distribuições em locais diferentes

(*D. marsupialis* na Amazônia e *D. aurita* na Mata Atlântica- Figura 1.3) e, portanto, do ponto de vista atual elas supostamente estão isoladas reprodutivamente.

A espécie *D. aurita* (Figura 1.4) é endêmica da Floresta Atlântica. Esta é uma espécie que se distribui por toda a floresta em todos os tipos vegetacionais. A reprodução em *D. aurita* é sazonal começando no meio da estação seca e terminando no fim da estação chuvosa (Kajin *et al.*, 2008). Gambás são onívoros-insetívoros (Cáceres & Monteiro-Filho, 2001), com grande variação em dieta, incluindo invertebrados (em grande parte ártropodes da serrapilheira), pequenos vertebrados e frutas (Vieira & Izar, 1999; Santori *et al.*, 1995). Esta ampla variação na dieta parece estar associada à disponibilidade de recursos no ambiente, sendo que estes animais possuem uma dieta oportunista consumindo em maior quantidade os itens mais acessíveis em cada época do ano (Lessa & Geise, 2010). Estes animais são escansoriais, conseguindo usar todos os estratos da mata (Cunha & Vieira, 2005). Em áreas fragmentadas onde outros grandes predadores estão ausentes espécies de *Didelphis* tendem a aumentar sua abundância. Consequentemente, a importância e influência destes gambás sobre outras espécies da comunidade aumentam (Fonseca & Robinson, 1990). São animais noturnos e vágéis, andando cerca de 1.868 ± 55 m²/dia (Loretto & Vieira, 2005). O tempo de geração é de 330,7 dias, ou seja, um ano (Kajin *et al.*, 2008).

Figura 1.3 Distribuição marginal dos gambás-de-orelhas-pretas. Os triângulos representam *D. marsupialis* e os círculos representam *D. aurita*. Modificado de Gardner (2008).

Figura 1.4. Indivíduo jovem de *Didelphis aurita* do estado de Pernambuco. Foto: Paulo Asfora.

Dado que a história e dinâmica do ambiente no qual os organismos estão inseridos afetam sua diversidade e evolução, a proposta desta dissertação foi estudar *D. aurita* a fim de analisar de forma integrada a influência destes fatores (história evolutiva e dinâmica ambiental) na diversificação deste grupo. Esta espécie foi escolhida por ser endêmica, comum e amplamente distribuída pela Mata Atlântica. Desta forma, a história da espécie deve estar intimamente relacionada à história da floresta. Outro ponto que levou a escolha de *D. aurita* é a alta vagilidade destes organismos e sua tolerância a diversos tipos de habitats florestais o que permite levantar a hipótese *a priori* que quebras ao longo da distribuição da espécie devem ser resultado principalmente de sinal histórico de interrupção do fluxo gênico e não devida a diferenciação em demes altamente localizadas.

As abordagens escolhidas para a realização deste trabalho foram: estudar a variação morfológica nos crânios e a variação molecular de marcadores independentes. No Capítulo 3 analisei os padrões de distribuição da variação em todos os indivíduos coletados, com ênfase nos indivíduos do Nordeste brasileiro, sendo que estes indivíduos mostraram-se bastante diferenciados. O capítulo 4 foca-se na distribuição sul e sudeste de *D. aurita*, testando em especial uma das hipóteses de diversificação para esta floresta: a Hipótese de Refúgios.

Referências Bibliográficas

- Auler AS, Wang X, Edwards RL, Cheng H, Cristalli PS, Smart PL (2004) Palaeoenvironments in semi-arid northeastern Brazil inferred from high precision mass spectrometric speleothem and travertine ages and the dynamics of South American rainforests. *Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers The Virtual Scientific Journal* 2(2): 2.
- Ayres JMC, Clutton-Brock TH (1992) River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140: 531-537.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177(1-2): 19-27
- Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of Linnean Society* 91: 73-84.
- Cabanne GS, d'Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760-773.
- Cabrera A (1957) Catalogo de los mamíferos de America del Sur. *Rev. Mus. Arg. Cienc.Nat. Bs. As. (Zool., 4: 1-732.*
- Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA (2001) Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna & Environment*, Lisse **36**: 85-92.
- Câmara IG (2003) Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds) *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. CABS and Island Press, Washington, 31-42.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Cerqueira R (1985) The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). *Journal of Biogeography* 12: 135-145.
- Cerqueira R, Lemos B (2000) Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia* 64: 319-327.
- Cracraft J, Prum RO (1988) Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution* 42: 603-620.
- Cunha AA, Vieira MV (2005) Age, season, and vertical use of the Atlantic rainforest by the common opossum, *Didelphis aurita* Wied 1826. *Acta Theriologica* 50: 551-560.

- Darwin CR (1859) On the origin of species by means of natural selection. J. Murray, London.
- Dinerstein E, Olson DM, Graham PJ, Webster AL, Primm SA, Bookbinder MP, Ledec G (1995) A conservation assesment of the terrestrial ecorregions of latin America and the Caribbean. The World Bank, Washington D.C., USA.
- Ditchfield AD (2000) The comparative phylogeography of neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9: 1307-1318.
- Endler JA (1977) Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton.
- Fonseca GAB, Robinson JG (1990) Forest size and structure: competitive and predatory effects on small mammal communities. *Biological Conservation* 53: 265-294.
- Freitas RO (1951) Ensaio sobre o relevo tectônico do Brasil. *Revista brasileira de Geografia* 2: 171-222.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1993) Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2009) Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica: Período 2005-2008, São Paulo.
- Gardner AL (2008) Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. The University of Chicago Press.
- Geise L, Smith MF, Patton JL (2001) Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in Southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82(1): 92-101.
- Goerck JM (1997) Patterns of rarity in the birds of the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Biology* 11: 112–118.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology* 15: 3969–3982.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- ____ (1993) Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. *Biogeography* 69: 15-45.
- Hershkovitz P (1969) The evolution of mammals in southern continents. VI. The recent mammals of the neotropical region: a zoogeographie and ecological review. *Quarterly Review in Biology*, 44: 1-70.
- Kajin M, Cerqueira R, Vieira MV, Gentile R (2008) Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. *Revista Brasileira de Zoologia* 25: 206-213.

- Lara MC, Patton JL (2000) Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal Linnean Society* 130: 661–686.
- Lara MC, Geise L, Schneider CJ (2005) Diversification of small mammals in the Atlantic forest of Brazil: testing the alternatives. *University of California Publications in Zoology*. 133: 311–334.
- Ledru MP (1993) Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90–98.
- Ledru MP, Mourguiart P, Riccomini C (2009) Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* 271: 140-152.
- Leite Y (2003) Evolution and systematics of the Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae), with description of two new species. *Tese de doutorado- University of California. Berkeley*. Vol.132.
- Lessa, L. G. & Geise, L.(2010) Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros: análise do estado do conhecimento atual. *Oecologia australis*. 14(4) 910-910.
- Loretto D, Vieira MV (2005) The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). *Journal of Mammalogy* 86: 287-293.
- MacDonald GM (2002) Biogeography: Introduction to Space, Time and Life. John Willey & Sons Inc.
- Marroig G, Cerqueira R (1997) Plio-Pleistocene South American history and the Amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology* 2(2): 103-118.
- Marroig G, Cropp S, Cheverud JM (2004) Systematics and evolution of the *Jacchus* group of marmosets (Platyrrhini). *American Journal of Physical Anthropology* 123: 11-22.
- Marshall LG, Butler RF, Drake RE, Curtis GH, Tedford RH (1979) Calibration of the Great American Interchange. *Science* 204: 272-279.
- Martin L, Suguio K, Flexor JM (1993) As flutuações do nível do mar durante o Quaternário superior e a evolução geológica dos deltas brasileiros. *Boletim IGUSP, Publicação Especial* 15: 186.
- Martins FM, Ditchfield AD, Meyer D, Morgante JS (2007) Mitochondrial DNA reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zool Syst Evol Research* 45(4): 372-378.
- Mittermeier RA, Myers N, Robles Gil P, Mittermeier CC (1999) Hotspots. Agrupación Sierra Madre, CEMEX, Mexico City.
- Moraes-Barros N, Silva JAB, Miyaki CY, Morgante JS (2006) Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genetica* 126: 189–198.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- Oliveira MAT, Behling H, Pessenda LCR (2008) Late-Pleistocene and mid-Holocene environmental changes in highland valley head areas of Santa Catarina state, Southern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences* 26: 55-67.
- Patton JL, Costa L, Jones M (2003) Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials 63-81..
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13–26.
- Pessenda LCR, Oliveira PE, Mofatto M, Medeiros VB, Garcia RJF, Aravena R, Bendassoli JA, Leite AZ, Saad AR, Etchebehere ML (2009) The evolution of a tropical rainforest/grassland mosaic in southeastern Brazil since 28,000 14C yr BP based on carbon isotopes and pollen records. *Quaternary Research*
- Petri S, Fulfaro VJ (1983) Geologia do Brasil - Fanerozoico. Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Platnick N, Nelson G (1978) A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology* 27: 1-16.
- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902-927.
- Ribas CC, Gaban-Lima R, Miyaki CY, Cracraft J (2005) Historical biogeography and diversification within the neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography* 32: 1409–1427
- Ribeiro M C, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142(6): 1141-1153.
- Riccomini C, Peloggia AUG, Saloni JCL, Kohnke MK, Figueira RM (1989) Neotectonic activity in the Serra do Mar rift system (southeastern Brazil). *Journal of South American Earth Sciences* 2(2): 191–197.
- Santori RT, Astua de Moraes D, Cerqueira R (1995) Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia* 59: 511-516.
- Silva JMC, Santos MC, Castelletti CHM (2004) Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest, South America. *Global Ecology and Biogeography* 13: 85-92.
- Silva JMC, Casteleti CHM (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds) The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. CABS and Island Press, Washington, 43–59.

- Simpson BB (1979) Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. In: Duellman WE (Ed) *The South American herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal*. Monograph of the Museum of Natural History, University of Kansas, 157–188.
- Soares PC, Landim PMB (1976) Comparison between the tectonic evolution of the intracratonic and marginal basins in South America. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 48(Suppl.): 313–324.
- Tchaika L, Eizirik E, Oliveira TG, Cândido-JR JF, Freitas TRO (2007) Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology* 16: 819–839.
- Vanzolini PE, Williams EE (1970) South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia (São Paulo)* 19: 1–298.
- Vieira EM, Izar P (1999) Interactions between aroids and arboreal mammals in the Brazilian Atlantic rainforest. *Plant ecology* 145: 75–82.
- Vivo MDC (1997) Mammalian evidence of historical ecological change in the castinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. *Journal of Comparative Biology*, 2(1): 65–73.
- Voss RS, Jansa SA (2003) Phylogenetic studies on Didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of Didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 276: 1–82.
- _____ (2009) Phylogenetic relationships and classification of Didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bulletin of The American Museum of Natural History*.
- Wallace AR (1849) On the monkeys of the Amazon. *Procl. Zool. Soc. Lond.* 20: 361–362.
- Wallace AR (1876) *The Geographical Distribution of Animals*. New York, Harper & brother publishers.
- Wang XF, Auler AS, Edwards RL, Cheng H, Cristalli PS, Smart PL, Richards DA, Shen CC (2004) Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature* 432: 740–743.

Capítulo 2

Metodologia e Resultados Gerais

Amostras moleculares:

Foram utilizados neste estudo amostras de tecido de fígado ou orelha cedidas gentilmente pelos seguintes pesquisadores e instituições: Prof. Dr. Rui Cerqueira (Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ), Profa. Dra. Lena Geise (Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ), Prof. Dr. James Patton (Museum of Vertebrate Zoology, University of California-MVZ), Prof. Dr. Mario de Vivo (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo-MZUSP), Prof. Dr. Miguel Trefault (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Yatiyo Yassuda (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Renata Pardini (Universidade de São Paulo-USP), Profa. Dra. Valéria Fagundes (Universidade Federal do Espírito Santo-UFES), Profa. Dra. Leonora Costa (Universidade Federal do Espírito Santo-UFES), Prof. Dr. Maurício Graipel (Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC), Prof. Dr. Diego Astúa de Moraes (Universidade Federal de Pernambuco-UFPE), Prof. Dr. Renato Gregorin (Universidade Federal de Lavras) e Msc. Paulo Asfora (Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ).

Todas as amostras de tecidos foram preservadas em etanol absoluto e armazenadas à -20° C. A Figura 2.1 mostra as localidades das amostras utilizadas neste estudo. Além das amostras sequenciadas neste projeto, estão presentes nesta figura amostras de *D. marsupialis* provenientes do *GenBank* ou cedidas pelo Prof. Dr. James Patton e amostras de *D. aurita* sequenciadas pela Msc. Leila Shirai para o marcador citocromo b (cit-b). Também foram utilizadas amostras de *D. albiventris* como grupo externo nas análises. As informações de número de indivíduos, coordenadas

geográficas assim como os respectivos números de campo/tombo e sexo estão disponíveis no Anexo 1.

Figura 2.1. Localidades das amostras utilizadas, em azul temos as amostras de *D. aurita*, em cinza *D. albiventris*, em vermelho *D. marsupialis* e verde Nordeste.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Os tecidos foram extraídos a partir de dois protocolos distintos, primeiramente de acordo com o protocolo de extração salina de Alijanabi e Martinez (1997), e nos casos em que a reação de extração não funcionou, estes tecidos foram submetidos ao

protocolo de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, modificado de Sambrook *et al.* (1989) (Anexo 2).

Foram escolhidos dois marcadores nucleares com herança parental distinta. O primeiro foi a porção compreendida entre o éxon 5 e 7 do gene da Glucose-6-fosfatase (G6PD) presente no cromossomo X. E o segundo, de herança autossômica, foi o íntron 7 do gene β -fibrinogênio (β -Fib), presente no cromossomo 3 de camundongo (*Mus musculus*), mas não descrito para marsupiais.

Para amplificar o gene G6PD utilizou-se um protocolo de *nested*-PCR, usando dois pares de iniciadores desenhados pelos colaboradores do projeto do Centro de Investigação da Biodiversidade (CIBIO, Universidade do Porto, Portugal), Sofia Silva e Miguel Carneiro, liderados pelo Prof. Dr. Nuno Ferrand. O protocolo consiste de duas reações de PCR, ambas utilizando as mesmas concentrações de reagentes: 0,8X de tampão; 1,6mM de magnésio; 0,4pmol de cada iniciador; 1mM de cada dNTP; 0,02 U de Taq Dna Polimerase; 0,8 μ l de DNA em um volume final de 10 μ l. Na primeira reação de PCR as sequências dos iniciadores utilizados são *forward* 5' GAG CCA CCT CCT TTC AGC GTC TC 3' e *reverse* 5' TCA GAG TTG GTG GAG GCA GGT TT 3'. A segunda reação de PCR é feita com o produto do primeiro PCR no lugar do DNA extraído e as sequências dos *primers* utilizados são: *forward* 5' CAC ATG AAC TCC CTG CAC CAT GG 3' e *reverse* 5' AGG AGG TGG TTC TGC ATC ACG TC 3'. Estes iniciadores geraram um produto de 2000 pares de base de regiões intrônicas e exônicas. Os produtos foram então visualizados em gel de agarose 1% corados com *Gelred* (Uniscience).

Para o gene β -fib foram utilizados os iniciadores β -fib *fwd*/ β -fib *rev*, descritos no trabalho de Matocq *et al.* (2007). A reação de amplificação utilizada foi igual à

anterior porém com os iniciadores específicos. Estes iniciadores amplificam uma região de cerca de 650 pares de base também visualizados em gel de agarose 1% corados com *Gelred* (Uniscience).

Além destes dois marcadores, foram sequenciados 15 indivíduos de *D. aurita* de Pernambuco e Alagoas (Anexo 1) para o marcador mitocondrial cit-b utilizando os iniciadores MVZ5 e MVZ14 (Smith & Patton, 1991). O protocolo de PCR usado foi o mesmo que para os outros dois marcadores. Este protocolo amplifica todo o gene citocromo b com cerca de 1200 pares de base, igualmente visualizados em gel de agarose 1% corado com *Gelred* (Uniscience).

O perfil de amplificação para os três genes foi desnaturação inicial a 92°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todos os produtos amplificados foram purificados com kit *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, Alemanha) e sequenciados com o *Big Dye terminator kit* (Applied Biosystems) pelo serviço de sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP, usando para o gene G6Pd os iniciadores G6PD-*fwd* e G6PD-int-*fwd*, para o gene β -fibrinogênio os iniciadores β -fib-*fwd* e β -fib-*rev* e para o marcador citb o iniciador MVZ5 (vide sequências dos iniciadores no Anexo 3).

Foram adicionadas ao banco de sequências geradas neste mestrado, sequências produzidas para o marcador cit-b durante o mestrado da aluna Leila Shirai, no laboratório de Evolução de mamíferos (processo Fapesp número 05/57798-8).

Também foram utilizadas sequências de *D. marsupialis*, *D. virginiana* e *Philander opossum* e *Philander frenatus* provenientes do *GenBank* (Anexo 1).

Das sequências à análise dos dados

Uma vez obtidas as sequências, estas foram alinhadas com o auxílio do programa Bioedit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999) usando o algoritmo de alinhamento Clustal W (Thompson *et al.*, 1997). Posteriormente ao alinhamento cada sequência foi manualmente conferida com o respectivo cromatograma para detectar possíveis erros de leitura do seqüenciador.

A fim de determinar a fase das posições heterozigotas encontradas, foi utilizado o programa Phase versão 2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003), o qual calcula, a partir de um método bayesiano, a probabilidade de diferentes combinações entre as fases. Este procedimento foi necessário apenas para o marcador G6PD, uma vez que foram encontradas duas posições heterozigotas, e para o gene β -Fib apenas uma.

Uma vez que dois dos marcadores possuem herança diplóide, estando, portanto, expostos a possíveis eventos de recombinação, foi importante averiguar se havia evidência de recombinação intra-locus, o que afetaria algumas das análises tais como a reconstrução filogenética e análise de IM. Desta forma foi realizado o teste Phi no programa Splitstree versão 4 (Huson & Bryant, 2006) com resultado não significativo para ambos os locos.

Morfologia

Os crânios medidos para análises morfológicas foram crânios devidamente identificados e tombados provenientes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), do Museu Nacional no Rio de Janeiro (MN) e da coleção do laboratório do Prof. Diego Astúa de Moraes da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os crânios de *D. aurita* adultos existentes nas coleções foram medidos. Além de *D. aurita*, foram medidos também crânios de *D. marsupialis*.

A distribuição das localidades de coleta dos crânios pode ser vista na Figura 2.2 e o Anexo 4 apresenta o número de tombo, local de coleta e coordenadas geográficas.

Os crânios foram medidos com o auxílio de um braço digitalizador modelo Microscribe 3DX (Microscribe, IL). Foram tomados 20 marcadores geométricos (sete tomados na linha central, e 12 em ambos os lados) em cada crânio (Tabela 2.1), que posteriormente foram transformados em 35 distâncias euclidianas utilizadas para as análises (Tabela 2.2). A Figura 2.3 apresenta um crânio de *D. marsupialis* com os marcadores tomados e as respectivas distâncias euclidianas.

Os pontos tomados foram escolhidos por representarem bem a forma do crânio de mamíferos sem serem redundantes, sendo que estes marcadores são padronizados e utilizados por todos os integrantes do Laboratório de Evolução de Mamíferos (Porto *et al.*, 2009, Shirai & Marroig, 2010, Marroig & Cheverud, 2001, Oliveira *et al.*, 2009).

Tabela 2.1. Marcadores geométricos definidos e suas respectivas descrições.

Marcador geométrico	Descrição
<i>Centrais</i>	
IS	interincisivo superior
NSL	extremidade rostral do nasal (posição medial)
NA	sutura entre frontal e nasal (posição medial)
BR	sutura entre frontal e parietal (posição medial)
LD	sutura entre parietal e supra occipital (posição medial)
BA	ponto mediano ventral da margem do forâmen magno
OPI	ponto mediano dorsal da margem do forâmen magno
PNS	espinha caudal do nasal
<i>Laterais</i>	
PM	sutura entre maxilar e pré-maxilar no alvéolo
ZS	sutura superior entre jugal e maxilar
PT	sutura entre frontal, parietal e esfenoide
TSP	sutura entre temporal, esfenóide e parietal
AS	sutura entre parietal, temporal e supra-occipital
ZI	sutura inferior entre jugal e maxilar
MT	tuberosidade maxilar, caudal ao quarto molar
APET	porção petrosal do temporal
JP	processo jugular
TS	sutura entre temporal e esfenóide no petrosal
EAM	meato auditivo externo rostral
ZYGO	sutura inferior entre jugal e temporal

Uma vez que o aparelho digitalizador Microscribe possui uma elevada precisão, medindo com milímetros de precisão é extremamente importante que cada ponto seja tomado precisamente sobre o marcador geométrico. Uma forma de avaliar a precisão do medidor é medir cada crânio duas vezes e submetê-los a uma análise de repetibilidade que avalia se existem grandes diferenças nas medidas tomadas.

O teste é feito via uma Análise de Variância (ANOVA) entre as duas réplicas para cada distância medida, tendo, portanto, como variável independente os espécimens e como variável dependente as medidas. Isto equivale a calcular o coeficiente de correlação intra-classe (Falconer, 1989). O valor de repetibilidade nos mostra o quanto da variação encontrada é devido a variação entre as duas medições em relação ao quanto é devido a variação populacional desta medida (diferenças entre indivíduos). Valores maiores do que 0,9 para repetibilidade (r^2) são considerados bons, uma vez que este valor indica que 90% da variação encontrada se deve as diferenças entre os exemplares, mostrando que o erro da medição é muito menor que a variação entre crânios.

Tal teste foi realizado no pacote de estatística Systat 11 (*Systat Software Inc.*).

Uma vez que a repetibilidade das medidas foram altas, para todas as análises subsequentes foram utilizados as médias entre as duas medições.

Tabela 2.2. Distâncias euclidianas utilizadas nas análises com a respectiva região e sub-região.

Medidas	Regiões	Subregiões	Medidas	Regiões	Subregiões
ISPM	Face	Oral	ZSZI	Face	Oral, zigomático
ISNSL	Face	Nasal	ZIMT	Face	Oral
ISPNS	Face	Oral, nasal	ZIZYGO	Face	Zigomático
PMZS	Face	Oral	ZITSP	Face	Zigomático
PMZI	Face	Oral	MTPNS	Face	Oral
PMMT	Face	Oral	PNSAPET	Neurocrânio	Base
NSLNA	Face	Nasal	APETBA	Neurocrânio	Base
NSLZS	Face	Nasal	APETS	Neurocrânio	Base
NSLZI	Face	Nasal	BAEAM	Neurocrânio	Base
NAPNS	Face	Nasal	EAMZYGO	Face	Zigomático
NABR	Neurocrânio	Calota	ZYGOTSP	Neurocrânio	Zigomático
BRPT	Neurocrânio	Calota	BAOPI	Neurocrânio	Base
BRAPET	Neurocrânio	Calota	LDAS	Neurocrânio	Calota
PTAPET	Neurocrânio	Calota	BRLD	Neurocrânio	Calota
PTBA	Neurocrânio	Calota	OPILD	Neurocrânio	Calota
PTEAM	Neurocrânio	Calota	PTAS	Neurocrânio	Calota
PTZYGO	Neurocrânio	Zigomático	JPAS	Neurocrânio	Calota

PTTSP	Neurocrânio	Calota, zigomático	
-------	-------------	-----------------------	--

Figura 2.2. Distribuição dos crânios utilizados nas análises. Em azul *D. aurita* e em vermelho *D. marsupialis* em verde Nordeste.

Como erros de medição podem ocorrer, por exemplo, trocar a ordem de medição dos pontos, cada indivíduo foi analisado a fim de avaliar se existiam medidas muito discrepantes. Isto foi feito usando o módulo “*steam-and-leaf*” do Systat 11 para

verificar a presença de pontos extremos (*outliers*) na amostra. Crânios que apresentaram medidas muito diferentes foram excluídos das análises subsequentes.

Figura 2.3. Crânio de *D. marsupialis* com 21 marcadores geométricos tomados e as distâncias euclidianas utilizadas nas análises (acima).

Em muitos mamíferos, incluindo marsupiais (Astúa, 2010), existem diferenças entre crânios de machos e fêmeas (dimorfismo sexual). Para verificar se este é o caso nas duas espécies de *Didelphis* analisadas, realizamos no Systat 11 uma ANOVA para cada espécie utilizando como fator independente o sexo e fator dependente as medidas. Como observamos dimorfismo para uma das espécies (*D. aurita*), foi possível determinar o sexo para indivíduos que não o possuíam anotado nos livros de tombo. Para isso realizamos uma Análise Discriminante clássica usando como variável agrupadora o sexo e preditora as medidas. Foram utilizados nas análises posteriores apenas os indivíduos cujo sexo foi determinado com mais de 90% de probabilidade na fase classificatória da análise discriminante.

Os resultados aqui apresentados são descritivos e sua finalidade é apenas verificar a acurácia na coleta de dados e apresentar os dados que serão utilizados nos próximos capítulos.

Sequências obtidas

Foram obtidas 113 seqüências completas para o gene G6PD, sendo destas 104 de *D. aurita*, uma de *D. marsupialis* e oito de *D. albiventris*. Para o gene β -Fib foram obtidas 106 seqüências completas: 89 de *D. aurita*, uma de *D. marsupialis* e oito de *D. albiventris*. Para o citocromo b foram obtidas 15 seqüências para *D. aurita*. Além destas, foram incorporadas ao banco de dados 81 seqüências de *D. aurita* e dez de *D. albiventris* provenientes da Msc. Leila Shirai, 29 seqüências de *D. marsupialis*, nove de *D. virginiana*, três de *Philander opossum* e uma de *Philander frenatus* do GenBank ou cedidas pelo Prof. Dr. James Patton. Todas estas do marcador citcromo b. No caso de ausência de uma das seqüências (*forward* ou *reverse*), a amostra foi descartada das análises.

O marcador G6PD, localiza-se no cromossomo sexual X, então para cada fêmea sequenciada foram geradas duas seqüências e para os machos apenas uma. Consequentemente, algumas fêmeas apresentaram sítios heterozigotos. Para estas amostras as fases dos haplótipos foram estimadas com probabilidade superior a 90% pelo programa Phase. Dois indivíduos foram excluídos das análises finais uma vez que em seus registros de coleta não constam o sexo destes. No entanto, o indivíduo ESTR1583 (*D. marsupialis*), mesmo não possuindo a informação de sexo, foi incluído na

base de dados por se tratar do único indivíduo de *D. marsupialis* sequenciado para este gene. Temos por fim 48 machos e 64 fêmeas, totalizando 177 sequências (uma de *D. marsupialis*, 12 *D. albiventris*, 37 do Nordeste e 127 *D. aurita*).

O marcador β -fibrinogênio, por se localizar em um cromossomo autossômico, teve para cada animal sequenciado duas sequências geradas. Não foi necessário utilizar o programa Phase para determinar as fases dos haplótipos, pois apenas um sítio apresentou indivíduos heterozigotos. Nas cercanias do par de base 300 foi encontrada uma repetição de sítios (cauda poli-A), havendo uma grande diferença na quantidade de pares de base de um indivíduo para outro, chegando a diferir em até 5 bases. Como não foi possível definir o quanto destas diferenças são de natureza biológica e o quanto se deve a um erro de leitura da polimerase durante o sequenciamento, estes sítios foram retirados das análises subsequentes. Além disso, oito indivíduos apresentaram uma deleção de cerca de cinco pares de bases (próximo do 320pb) e, por ser uma região repetitiva, não foi possível definir a posição exata da deleção e portanto, sua homologia. Estes indivíduos também foram retirados das análises.

Morfologia

Foram medidos 354 crânios, sendo 132 fêmeas, 161 machos e 61 de sexo indeterminado. Dentre estes, 283 eram de *D. aurita* (104 fêmeas, 143 machos e 36 indeterminados), 69 de *D. marsupialis* (27 fêmeas, 25 indeterminado e 16 machos) e três indivíduos da população do Nordeste (dois machos e uma fêmea).

Análises de Variância (ANOVA) foram realizadas para verificar se existia dimorfismo sexual, tendo sexo como fator dependente e as medidas como fator independente. Para a maior parte das medidas o teste univariado mostrou-se significativo, mostrando que existem diferenças entre os sexos. A única medida que não apresentou valor significativo para o teste foi BRLD, sendo que PTAPET apresentou-se marginalmente significativa ($p=0.052$). O teste multivariado (todas as medidas juntas) também se mostrou significativo (Wilk's $\lambda = 0.30$, com 32.2 graus de liberdade e probabilidade $p<0.01$). Para *D. marsupialis* encontramos o padrão oposto. No teste ANOVA univariado apenas 5 medidas apresentaram-se significantes BRPT, EAMZYGO, ZYGOTSP, LDAS e OPILD. No teste multivariado não foi detectada diferenças entre os sexos (Wilk's $\lambda= 0.11$; 35.7 graus de liberdade, valor de $p =0.25$).

Temos então um cenário em que uma espécie apresenta dimorfismo sexual (*D. aurita*) e outra não (*D. marsupialis*). Determinar se existe dimorfismo sexual é importante, pois quando existente este deve ser considerado nas análises ou estaremos inflando a variância dos dados e eventualmente confundindo variação intra com interpopulacional.

Dessa forma, foi possível através de uma análise discriminante separar os crânios nos dois sexos e, portanto, determinar o sexo dos crânios sem esta informação para *D. aurita*. Dos 36 indivíduos indeterminados quanto ao sexo conseguimos determinar o sexo de 27 animais com probabilidade acima de 90%, 13 fêmeas e 14 machos, os nove crânios cujo sexo não pode ser determinando foram retirados das análises.

A Tabela 2.3 apresenta o resultado dos testes de repetibilidade. Uma vez que este teste compara a variância das duas medidas feitas de um mesmo crânio com a

variância entre os diferentes crânios, torna-se importante separar *D. aurita* em machos e fêmeas para não inflar a variância entre crânios.

Todas as repetibilidades tiveram valores acima de 0,971 o que mostra que o erro de medição não está influenciando os dados e podemos então usar apenas as médias das réplicas. Para os crânios do Nordeste não realizei análise de repetibilidade uma vez que o número de crânios é muito pequeno para calcular a variância da população.

Tabela 2.3. Repetibilidades calculadas para as diferentes medidas

	<i>D. marsupialis</i>	<i>D. aurita</i> macho	<i>D. aurita</i> fêmea
ISPM	0,996	0,997	0,990
ISNSL	0,991	0,988	0,989
ISPNS	1,000	1,000	0,999
PMZS	0,999	0,999	0,998
PMZI	0,999	0,999	0,999
PMMT	0,998	0,999	0,998
NSLNA	0,999	1,000	0,999
NSLZS	0,999	1,000	0,999
NSLZI	1,000	1,000	0,999
NABR	0,999	0,999	0,999
NAPNS	0,998	0,999	0,997
BRPT	0,997	0,998	0,996
BRAPET	0,999	0,999	0,998
PTAPET	0,998	0,997	0,995
PTBA	0,999	0,999	0,998
PTEAM	0,998	0,998	0,996
PTZYGO	0,999	0,999	0,998
PTTSP	0,998	0,997	0,996
ZSZI	0,997	0,997	0,996
ZIMT	0,995	0,997	0,991
ZIZYGO	0,999	1,000	0,999
ZITSP	0,999	1,000	0,999
MTPNS	0,998	0,998	0,998
PNSAPET	0,999	0,999	0,998
APETBA	0,992	0,996	0,992
APETTS	0,978	0,986	0,966
BAEAM	0,994	0,996	0,994
EAMZYGO	0,995	0,997	0,988
ZYGOTSP	0,999	0,999	0,997
LDAS	0,997	0,999	0,997
BRLD	0,999	0,999	0,998

OPILD	0,998	0,999	0,998
PTAS	0,999	0,999	0,998
JPAS	0,994	0,997	0,996
BAOPI	0,977	0,978	0,971

Referências Bibliográficas

- Alijanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques *Nucleic Acids Research* 25(22): 4692-4693.
- Astúa, D. (2010). Cranial sexual dimorphism in new world marsupials and a test of Rensch's rule in Didelphidae. *Journal of mammalogy*, 91(4):1011-1024
- Falconer DS (1989) Introduction to quantitative genetics. Longman Scientific & Technical, Essex, Inglaterra..
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95–98.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular. Biology and Evolution* 23(2): 254-267.
- Marroig, G., Cheverud, J.M. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55(12): 2576-2600.
- Matocq MD, Shurtliff QR, Feldman CR (2007) Phylogenetics of the woodrat genus *Neotoma* (Rodentia: Muridae): implications for the evolution of phenotypic variation in male external. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 637-652.
- Oliveira, F.B., Porto, A., Marroig, G. 2009. Covariance structure in the skull of Catarrhini: a case of pattern stasis and magnitude evolution. *Journal of Human Evolution* 56: 417-430.
- Porto, A., Oliveira, F., Shirai, L.T., de Conto, V., Marroig, G. 2009. The evolution of modularity in the mammalian skull I: morphological integration patterns and magnitudes. *Evolutionary Biology*, doi: 10.1007/s11692-008-9038-3.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Vol 2. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nova York.
- Shirai, L.T., Marroig, G. 2010. Skull modularity in neotropical marsupials and monkeys: size variation and evolutionary constraint and flexibility. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* n/a. doi: 10.1002/jez.b.21367.
- Stephens M, Smith N, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.
- Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics* 73: 1162-1169
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.

Capítulo 3

*Biogeografia dos gambás-de-orelhas-pretas:
Analisando a história biogeográfica
das florestas neotropicais*

Existem duas grandes formações florestais na América do Sul: a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica. Hoje em dia estas florestas encontram-se separadas por uma diagonal seca formada pelos biomas Cerrado e Caatinga. No entanto, há evidências de que ambas já foram conectadas em um passado não tão distante. O objetivo deste trabalho é explorar as relações biogeográficas entre estas duas florestas utilizando um grupo de espécies que são endêmicas e amplamente distribuídas nestas duas florestas: *D. aurita* que ocorre por toda Mata Atlântica e *D. marsupialis* que ocorre na Floresta Amazônica. Foram utilizados dados provenientes de três marcadores moleculares com padrões de herança distintos, além de análises de dados de morfometria craniana. Os resultados indicam que ambas as espécies são bastante diferenciadas, além de mostrar a existência de um terceiro grupo que ocorre no norte da distribuição da Mata Atlântica o qual provavelmente forma uma terceira espécie. As análises de Fst e IM mostram ainda que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre estes três grupos e a árvore reconstruída pelo método bayesiano indica que a divergência entre os três grupos é bastante recente tendo ocorrido no Pleistoceno há cerca de 640- 750 mil anos. As mudanças na distribuição das áreas florestais, devido aos eventos cíclicos de períodos glaciais, devem ter sido um importante fator na especiação deste grupo, uma vez que as datas de divergência coincidem com um período de amplas mudanças na paisagem da América do Sul.

There are two major rainforests in South America: the Amazon Forest and the Atlantic Forest. Nowadays, these two forests are separated from each other by a dryer corridor formed by the Caatinga and Cerrado biomes. However there are evidences that both forests have been connected in the past. The aim of this work is to explore the biogeographical relations between these forests using a widespread and endemic group of species from these biomes: the opossum *D. aurita*, widely distributed through the Atlantic Forest, and *D. marsupialis* that is widespread in the Amazon forest. Three molecular markers with different inheritance patterns have been used allied with skull morphometric analysis. The results indicate that both species are distinct and point to a new species distributed in the northeast of the Atlantic Forest. Fst and IM analysis show that the three groups have little or even none gene flow between them and the Bayesian phylogenetic tree points to a recent divergence (640.000-750.000 years before present) between the groups in the Pleistocene period. The distributional shifts that have occurred in the forests distributions due to the glaciations cycles might have played a key role in the speciation of this group, since the divergence between the species occurred in a period in which the South American landscapes were suffering considerable changes.

Nos neotrópicos existem duas grandes formações florestais: a maior é a Floresta Amazônica, que ocupa parte do centro-oeste e norte do Brasil, Colômbia, Bolívia e Peru, e a Floresta Atlântica que ocupa a costa do Brasil desde o norte do Rio Grande do Norte ao sul do Rio Grande do Sul, adentrando o interior do continente chegando à Argentina. Estas duas florestas são separadas por um corredor de vegetação mais seco que inclui o Chaco paraguaio e argentino, o Cerrado no centro do Brasil e a Caatinga no nordeste brasileiro. Este amplo corredor seco tem sido considerado como um importante fator limitando o fluxo gênico entre as duas formações florestais (Costa, 2003 ; Raven & Axelrod, 1974; Rizzini, 1979). No entanto, embora estas duas formações florestais pareçam isoladas, elas são conectadas por longos corredores de florestas de galeria (Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Vivo, 1997). Alguns autores sugerem que estes corredores de matas ciliares poderiam permitir o fluxo gênico entre espécies da Floresta Amazônica e Floresta Atlântica (Costa, 2003).

As florestas da América do Sul surgiram a partir do Eoceno (embora existam alguns indícios de que talvez já existissem durante o Paleoceno) (Burnham & Johnson, 2004) e há várias evidências de que ambas as formações florestais já foram conectadas em algum momento. Acredita-se que a diagonal seca, que atualmente separa as duas florestas, surgiu no final do período Terciário (Bigarella *et al.*, 1975), sendo que a formação do bioma Caatinga ocorreu durante o fim do Plioceno e começo do Quaternário (Cole, 1960; Ab'Saber, 1974). Vivo (1997) sugeriu que uma floresta mélica capaz de suportar formas arbóreas existiu onde hoje é a Caatinga, conectando a porção mais leste da Amazônia e Floresta Atlântica. Durante todo o período

Quaternário existem indícios de que a região da Caatinga experimentou fases mais úmidas. Por exemplo, baseado em dados de crescimento de espeleotemas, um padrão consistente de 12 fases mais úmidas (pluviais) de durações variadas pode ser inferido para os últimos 210 mil anos (Auler *et al.*, 2004). Além disso, dados biogeográficos e paleontológicos também dão suporte a existência de florestas mais úmidas nestes períodos no bioma (Wang *et al.*, 2004; Auler *et al.*, 2004; Vivo, 1997). O registro palinológico mostra que durante 33.000 e 25.000 anos atrás o Cerrado brasileiro era mais úmido que hoje em dia e coberto por florestas (Ledru, 1993), e durante o último máximo glacial (18000-12000 anos atrás), o corredor xérico atual estava coberto por extensivas formações florestais (Prado & Gibbs, 1993). Estes estudos apontam para uma predominância de florestas sazonais mais úmidas no centro do Brasil durante a maior parte do Pleistoceno.

Vários autores apontam para a existência de similaridades entre a fauna e flora destas duas florestas (Rizzini, 1979; Andrade-Lima, 1964), o que ajuda a corroborar a hipótese de ambas terem sido conectadas no passado. Como os estudos apontam para um região florestal na região nordeste durante o Quaternário (Behling *et al.*, 2000; Auler *et al.*, 2004), a proposta é que estas conexões ocorreram através de mudanças na distribuição das florestas ocorridas com os períodos glaciais.

Pensando nisso, a proposta do presente trabalho é estudar a variação genética e geográfica entre duas espécies que são irmãs e amplamente distribuídas entre estas duas florestas. A ideia é testar se estas conexões entre as duas florestas foram capazes de conectar a fauna destas e se as dinâmicas do Quaternário tiveram um papel importante na especiação deste grupo.

As espécies escolhidas são gambás do gênero *Didelphis*. O gênero *Didelphis* é o gênero com os maiores marsupiais neotropicais (peso variando de 847-1290 g para *D. aurita*- Leite *et al.*, 1996). São animais onívoros (Julien-Lafférière & Atramentowicz, 1990; Santori *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 1996) e escansoriais capazes de usar todos os estratos da mata (Cunha & Vieira, 2005). Estes animais são ativos principalmente durante a noite (Santori *et al.*, 1995) e são bastante vágéis, chegando a andar cerca de $1.868 \pm 55 \text{ m}^2/\text{dia}$ (Loretto & Vieira, 2005). O tempo de geração é de 330,7 dias, ou seja, um ano (Kajin *et al.*, 2008).

Existem 6 espécies de gambás que se distribuem por toda a América. Há uma espécie que ocorre na América do Norte, *D. virginiana*, e todas as outras são neotropicais. As espécies sul-americanas se dividem em dois grupos: o grupo de gambás-de-orelhas-brancas (grupo *albiventris*) que ocupam as áreas abertas: *D. albiventris*, *D. imperfecta* e *D. pernigra*, e o grupo formado pelos gambás-de-orelhas-pretas (grupo *marsupialis*) que são as espécies focais deste estudo, *D. aurita* e *D. marsupialis* as quais ocupam as regiões florestais.

D. marsupialis se distribui pela Floresta Amazônica e *D. aurita* se distribuí por toda a Floresta Atlântica. Há grande debate na literatura se estas espécies são realmente distintas ou não. Enquanto trabalhos anteriores tratavam-as como subespécies: *D. marsupialis marsupialis* e *D. m. aurita* (Cabrera, 1957; Hershkovitz, 1969), trabalhos mais recentes as consideram como espécies válidas, baseados tanto em análises moleculares (Patton *et al.*, 2003), quanto análises morfométricas (Cerqueira & Lemos, 2000). Estes autores usam como argumento que como atualmente as duas formações florestais são completamente isoladas uma das outras,

estes animais não teriam como cruzar-se no ambiente natural, caracterizando um isolamento reprodutivo entre elas.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de *D. aurita* coletadas por toda Mata Atlântica e amostras de *D. marsupialis* coletadas por toda sua distribuição. A abordagem inclui seqüenciamento de três marcadores moleculares diferentes, um mitocondrial citocromo b (cit-b), outro presente no cromossomo X, o íntron 5 a 7 do gene da glucose-6-fosfatase (G6PD), e outro autossômico, o íntron 7 do gene do beta-fibrinogênio (β -Fib). Além disso, crânios de ambas as espécies foram medidos com auxílio de um digitalizador 3D para analisar as diferenças morfológicas entre as espécies.

As perguntas que se buscou responder são: o fato destas duas florestas estarem isoladas atualmente garante que não exista fluxo gênico entre estas espécies? E as mudanças na distribuição florestal devida a dinâmica climática do Quaternário foram realmente relevantes para o processo de divergência/especiação destas linhagens?

Amostras moleculares

Foram utilizadas neste capítulo 177 sequências completas para o gene G6PD com 1037 pares de base (127 de *D. aurita*, 1 *D. marsupialis*, 12 *D. albiventris*, 37 do norte do Rio São Francisco no Nordeste brasileiro). Para o gene β -Fib foram utilizadas 196 sequências completas com 537 pares de base (178 de *D. aurita*, 2 *D. marsupialis* e 16 *D. albiventris*). Para o cit-b foram utilizadas 148 sequências com 600 pares de base (96 de *D. aurita*, 10 de *D. albiventris*, 29 de *D. marsupialis*, 9 de *D. virginiana* e 4 de *Philander opossum*). Detalhes sobre extração, reação de PCR, sequenciamento e alinhamento estão apresentados no capítulo 2.

Amostras morfológicas

Foram utilizados crânios medidos de acordo com a metodologia descrita no capítulo 2, totalizando: 67 crânios de *D. marsupialis*, 266 crânios de *D. aurita* (foram incluídos nesta amostra os crânios para os quais o sexo estava indeterminado) e 3 crânios da população Nordeste. Os crânios são provenientes das coleções do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (Mzusp), do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MN) e do Laboratório do Prof.Dr. Diego Astúa de Moraes da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram utilizados apenas crânios adultos, com todos os molares eclodidos.

Teste de estruturação populacional

Inicialmente é imprescindível analisar se existe algum indício de estruturação genética na amostra. A estruturação genética afeta todas as análises descritivas de diversidade genética, uma vez que infla o valor dos diferentes índices de diversidade como o número de haplótipos, diferenças par a par e diversidade nucleodítica. A estruturação genética pode também enviesar o resultado dos testes de neutralidade, podendo levar a resultados espúrios. Além disso, análises de estruturação populacional como o F_{st} ¹ ou IM ² necessitam dos agrupamentos definidos a priori.

Sendo assim, como uma primeira exploração dos dados, foi construída uma rede haplotípica utilizando o método *Minimum Spanning Tree* (Prim, 1957) no programa Hapstar versão 0.5 (Teacher & Griffiths, 2010). Foram utilizados todos os diferentes haplótipos encontrados para cada marcador. Esta rede é construída a partir da matriz de distâncias par a par entre todos os pares de haplótipos (Excoffier *et al.*, 2005). Uma vez que estas redes contabilizam cada passo mutacional, a utilização delas geralmente é restrita a populações. Porém, como o objetivo deste capítulo é averiguar o relacionamento entre os diferentes táxons florestais de gambá-de-orelha-preta, produziu-se esta rede com as amostras disponíveis de *D. aurita* e *D. marsupialis*. Quando existentes, estes agrupamentos foram confrontados com a localidade de amostra das sequências para visualização de possíveis padrões de estruturação geográfica.

¹ coeficiente de endocruzamento ou de estruturação populacional sensu Wright, 1951

² Modelo de isolamento com migração, implementado pelo programa IM de Hey & Nielsen, 2004.

Análises de diversidade genética

Análises descritivas da diversidade genética foram realizadas para as populações encontradas. Estas análises foram conduzidas no programa Dnasp versão 5.10 (Librado & Rozas, 2009) e Arlequin versão 3.1.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Para cada marcador foi analisado o número de haplótipos, diversidade nucleotídica e número médio de diferenças par a par.

Diferenciação genética: Fst

Os diferentes agrupamentos (concordantes com a geografia) formados pela rede de haplótipos foram utilizados para definir as diferentes populações, e estas foram submetidas à análise de Fst. A análise de Fst foi conduzida no programa Arlequin versão 3.1.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005) baseada no número de diferenças nucleotídicas par a par. Esta análise pode ser vista como um estimador das distâncias genéticas entre as populações (Excoffier *et al.*, 2005). Altos níveis de Fst (acima de 0.25) significam que a taxa de migração entre as populações é baixa e/ou o tempo de divergência entre elas é alto. Portanto, embora ele seja um bom teste para visualizar a diferenciação entre populações, não nos permite distinguir qual evento evolutivo (migração ou divergência) tem maior influência sobre os dados.

Divergência e taxa de migração entre as populações

Para diferenciar o efeito destes dois fenômenos (migração/divergência), entre a população de *D. aurita* encontrada no Nordeste (daqui para frente referenciada como Nordeste) e a população que engloba o restante de sua distribuição, foi utilizado o programa IM (Hey & Nielsen, 2004 ; Hey & Nielsen, 2007). Este programa implementa

um modelo de isolamento com migração para dados genéticos de um par de populações intimamente relacionadas.

Figura 3.1. Parâmetros estimados pelo programa IM. t =tempo de divergência, $N1$ = tamanho efetivo da população 1, $N2$ =tamanho da população 2 e N_a = tamanho efetivo da população ancestral. μ = taxa de mutação, m = taxa de migração , sendo $m1$ da população 1 para 2 e $m2$ da população 2 para 1 (modificado de Hey & Nielsen, 2004).

Existem seis parâmetros para os quais é possível obter uma estimativa: taxa de migração (permitindo que duas populações troquem genes em uma taxa distinta, $m1$ e $m2$), tamanho efetivo de cada população (N_e) e da população ancestral (N_a) e tempo de divergência (Figura 3.1).

O programa funciona através de simulações conhecidas como cadeias de Markov-MonteCarlo (MCMC). Ele começa simulando uma genealogia para cada locus no banco de dados e para os diferentes parâmetros. A cada passo ele refaz estas simulações (conhecidas como os elos da cadeia ou iterações) e cada novo valor pode ser aceito ou rejeitado dependendo do valor da estimativa (caso seja rejeitado permanece-se com o valor antigo). A quantidade de vezes que um novo valor é aceito

é chamada de taxa de aceitação. Caso esta seja muito baixa, isto significa que a cadeia não está explorando o espaço amostral dos parâmetros de maneira eficiente. No geral, é necessário correr o programa por milhões de iterações para ter estimativas confiáveis dos parâmetros. Para a presente análise foram realizados 30.000.000 de passos, sendo que os primeiros 300.000 foram descartados como período de *burn-in* (neste período é muito alta a chance da cadeia estar correlacionada e não estar estimando os valores de forma adequada). Foram realizadas corridas preliminares para definição de *priors* (valores dados a priori para cada parâmetro como limite superior do espaço amostral). Posteriormente, foram realizadas três corridas com diferentes números *seeds* para estimar a convergência das diferentes corridas com os *priors* definidos. Os valores de *prior* utilizados foram: m_1 , $m_2=10$; $t=50$, θ_1 , $\theta_2=20$ e $\theta_a=30$.

Esta análise foi realizada utilizando os três marcadores, atentando-se que estes possuem padrões de herança distintos. Isto é feito no arquivo de entrada do programa. Isto é importante, pois o cálculo das estimativas demográficas, assim como dos tempos de coalescência, depende do padrão de herança do marcador. Por exemplo, marcadores de herança mitocondrial possuem $\frac{1}{4}$ do N_e de um marcador autossômico. Para realizar esta análise apenas os indivíduos com todas as posições definidas foram utilizados, isto é, as sequências que possuíam alguma posição não determinada foram excluídas³.

Para estimar o tamanho efetivo de cada população foi utilizado o valor estimado de θ e substituído na fórmula:

³ Os indivíduos excluídos da análise foram: IIM-258, SC253, SC355, TAP1715, FS1220, FS1401, FS1407, PHA250, PHA245 para beta-fib; RG1360, para G6PD e nenhum indivíduo para o cit-b.

$$\Theta=4Ne\mu \quad (1)$$

Sendo que, Ne representa o tamanho efetivo da população e μ a taxa de mutação. Para estimar a taxa de mutação de cada marcador foi calculado o número de diferenças par a par médio entre *D. aurita* e *D. albiventris*, menos o número médio de diferenças dentro de cada uma destas espécies, dividido pelo tempo de divergência entre elas (no caso 2.21Maa em cada ramo), tempo este calculado pelo programa Beast (vide abaixo). O valor da taxa de mutação para cada marcador encontrado foi: cit-b:1.75%/ Maa/ sítio, G6PD:0.5% / Maa/sítio e β -Fib 0.4%/Maa/sítio. O programa IM calcula o valor de Ne já corrigindo para diferenças no padrão de herança e utilizando uma média geométrica entre as taxas de mutação, no caso o valor estimado foi de 4.89×10^{-6} por ano.

Para calcular a taxa de migração foi usada a seguinte equação:

$$m1=m1 \times \mu \quad (2)$$

Na equação acima, $m1$ representa a estimativa dada pelo programa e $m1$ a taxa de migração por gene por geração da população 1 para 2 no coalescente, isto é, olhando-se para o passado. Portanto, a taxa $m1$ é mais facilmente compreendida quando pensamos que é a taxa na qual genes entram na população 1, vindos da população 2, enquanto o tempo passa.

Para obtenção do número de migrante por geração foi utilizada a fórmula:

$$M=\Theta \times m \quad (3)$$

M corresponde ao número de migrantes por geração, Θ corresponde ao valor de theta estimado pelo programa ($4N\mu$), e m a taxa de migração estimada pelas fórmulas (2).

Árvore filogenética e tempo de divergência entre as populações

Foi utilizada ainda outra abordagem para datar o tempo de divergência entre as diferentes espécies e populações. Foi construída uma árvore filogenética através do método bayesiano utilizando o programa Beast versão 1.4.5 (Drummond & Rambaut, 2007; Drummond *et al.*, 2002). Para construção desta árvore, apenas o marcador cit b foi utilizado uma vez que é o marcador para o qual existe maior número de sequências para diferentes espécies. Como grupos externos foram utilizados diferentes indivíduos de *D. albiventris* (sequenciados no laboratório) *D. virginiana* e *Philander opossum* e *P. frenatus* obtidas no GenBank. Uma vez que as análises descritivas de diversidade genética não apontaram para nenhum evento demográfico desde a coalescência dos haplótipos⁴, usou-se como premissa na análise o modelo coalescente de população de tamanho constante. O modelo de evolução molecular utilizado para o marcador cit b foi GTR +G+I, com 4 classes de gamma distintas, conforme estimado pelo programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007). Foi utilizado o modelo de relógio molecular relaxado (Drummond *et al.*, 2006) tendo como um ponto de calibração o surgimento do gênero *Didelphis* estimado através dos primeiros fósseis deste grupo (Simpson 1972, 1974 apud Steiner *et al.*, 2005) no Plioceno tardio com um *prior* de distribuição normal variando de 4 ± 2 milhões de anos atrás (Maa). Outro ponto de calibração foi a divergência entre *Philander* e *Didelphis* utilizando dados estimados por uma filogenia

⁴ Com exceção de *D. aurita* para o marcador cit-b que aparentemente sofreu uma expansão demográfica, vide capítulo 4

molecular (Steiner *et al.*, 2005) com *prior* de distribuição normal variando de $7,9 \pm 1,5$ Maa. A vantagem de se utilizar um modelo de relógio molecular relaxado é que este relaxa a premissa de taxa constante ao longo dos ramos, além de embutir na análise a incerteza do registro fóssil (por permitir uma distribuição de valores para o ponto de calibração). Foram feitas 100 milhões de iterações (elos da cadeia de Markov), tendo sido descartadas 5 milhões como período de *burn-in*. A distribuição posterior de árvores foi sumarizada no programa Treeanotator versão 1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007), excluindo-se as árvores geradas no período de *burn-in* e visualizadas no Figtree versão 1.3.1. A árvore apresentada aqui é a de maior probabilidade posterior. O programa Tracer (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para visualizar se as cadeias de MCMC geradas foram eficientes em explorar o espaço amostral dos parâmetros (Anexo 5) e para visualizar a distribuição das probabilidades posteriores estimadas.

Tanto para o programa Beast como para o IM foram feitas mais de uma análise a fim de verificar a convergência dos parâmetros, a robustez dos valores estimados e a independência dos valores iniciais para as estimativas finais.

Análise morfológica de diferenciação craniana

Com os crânios disponíveis foi realizada uma análise discriminante para averiguar se os três grupos encontrados nas análises genéticas são também morfológicamente distintos. Como variável agrupadora foi utilizado o grupo ao qual cada indivíduo pertencia, e como preditora foram usadas as 35 medidas do crânio. Nesta análise não foi removido o efeito do dimorfismo sexual, que conforme foi apresentado no Capítulo 2 é bem evidente em *D. aurita*. O motivo para isso, é que se

mantivermos o dimorfismo presente em *D. aurita*, isso aumentará a variância entre os dados e caso seja encontrado diferenciação entre os grupos mesmo assim, é porque ela é bem evidente. Por outro lado ao analisarmos todos os exemplares simplificamos os resultados e teremos estimativas melhores da matriz de variância/covariância ponderada dentro dos grupos e das funções discriminantes. Vale notar que estudos prévios (Sebastião, 2010) mostraram que as matrizes de V/CV são muito semelhantes para todos os grupos de Didelphimorphia e em particular Didelphis.

A análise discriminante é uma técnica estatística multivariada cuja finalidade é estabelecer funções discriminantes que maximizem as diferenças entre grupos definidos a priori, com base em variáveis medidas sobre estes grupos. Além disso, ela verifica se existem diferenças significativas entre estes grupos e determina as variáveis preditoras que mais contribuíram para estas diferenças. Depois de realizada esta análise é possível avaliar a precisão da classificação, reclassificando cada observação com base na função discriminante calculada.

Teste de Estruturação: rede de haplótipos

A rede de haplótipos produzida para o marcador cit-b mostra três grupos distintos, dois já esperados formados pelas espécies *D. marsupialis* e *D. aurita* e um não esperado formado pela distribuição nordeste de *D. aurita*, correspondendo a linhagens coletadas nos estados de Alagoas e Pernambuco ao norte do Rio São Francisco. O número de passos mutacionais diferenciando *D. aurita* e o grupo do Nordeste é maior do que o número entre *D. marsupialis* e *D. aurita*. Para o marcador G6PD foram obtidos dois grupos distintos, um formado pela espécie *D. aurita* e outro, que corresponde a apenas um haplótipo, reunindo a única amostra disponível para este marcador de *D. marsupialis* e os indivíduos do Nordeste. Portanto, as redes de haplótipos produzidas para os marcadores G6PD e cit b (Figura 3.2) mostram a mesma diferenciação entre as amostras de *D. aurita* coletadas nos estados de Alagoas e Pernambuco (referenciadas como Nordeste) e o resto da distribuição. Sendo este o único padrão claro de estruturação dentro de *D. aurita*. As amostras coletadas ao sul de Pernambuco (ou seja, abaixo do rio São Francisco) não formaram agrupamentos evidentes. É interessante notar que tanto para cit b, quanto para G6PD, todos os indivíduos do Nordeste analisados (17 e 25 respectivamente) apresentaram apenas um haplótipo. Para o marcador β -fibrinogênio nenhum padrão pode ser notado, uma vez que existem haplótipos amplamente distribuídos e compartilhados entre todas as populações/espécies. Existem inclusive haplótipos comuns entre *D. marsupialis* e *D. aurita* (Figura 3.2). Mesmo sem um padrão claro, há um haplótipo que só ocorre nos indivíduos do Nordeste, sendo este o mais frequente nesta população.

Figura 3.2. Rede de haplótipos. Em verde tem-se os indivíduos da população nordeste em azul *D. aurita* e em vermelho *D. marsupialis*. Os círculos pretos correspondem aos passos mutacionais entre os diferentes haplótipos.

Devido ao fato do grupo Nordeste apresentar-se bastante diferenciado do restante da distribuição de *D. aurita*, daqui em diante as análises serão feitas separando as duas em populações distintas.

Descritores da diversidade genética

A Tabela 3.1 apresenta as análises descritivas de diversidade em cada população. Ambos os marcadores nucleares apresentaram pouca variação genética, tanto no número médio de diferenças par a par, número de haplótipos e diversidade nucleotídica. Já para o citocromo b foi encontrada uma diversidade genética muito

maior, com um número de haplótipos, diversidade nucleotídica e número de substituições cerca de uma ordem de grandeza maior do que para os marcadores nucleares. No entanto, é notável o fato de que tanto para G6PD quanto para o citb as amostras do Nordeste apresentaram apenas um haplótipo. Para o β -Fib a população do Nordeste apresentou três haplótipos mas dois deles são compartilhados com *D. aurita* ou *D. marsupialis*, sendo o haplótipo mais comum nesta população exclusivo dos indivíduos desta população. Como para G6PD e β -Fib só temos um indivíduo amostrado para *D. marsupialis* nenhuma estatística descritiva pôde ser realizada. Já para citb temos 29 indivíduos amostrados de *D. marsupialis*. A diversidade nucleotídica em *D. marsupialis* é cerca de uma ordem de grandeza maior do que *D. aurita*.

Tabela 3.1. Resumo das análises descritivas de diversidade genética. N= número de sequências analisadas, pb=número de pares de bases para cada marcador; H=número de haplótipos encontrados; π = diversidade nucleotídica; par a par dif= número médio de diferenças par a par.

		N	pb	H	π	Par a par dif
G6PD	<i>D. aurita</i>	127	1037	5	0.0008 $\pm$ 0.0006	0.8069 $\pm$ 0.5855
	Nordeste	37		1	-	-
	<i>D. marsupialis</i>	1		1	-	-
	Total	165		6	0.0014 $\pm$ 0.0001	1.384 $\pm$ 0.467
β -Fib	<i>D. aurita</i>	128	537	6	0.0031 $\pm$ 0.0020	1.6914 $\pm$ 0.9970
	Nordeste	50		3	0.0011 $\pm$ 0.0010	0.6008 $\pm$ 0.4869
	<i>D. marsupialis</i>	2		2	0.0018 $\pm$ 0.0026	1.0000 $\pm$ 1.0000
	Total	180		8	0.0043 $\pm$ 0.0001	1.874 $\pm$ 0.631
Citb	<i>D. aurita</i>	79	600	30	0.0044 $\pm$ 0.0026	2.6199 $\pm$ 1.4156
	Nordeste	17		1	-	-
	<i>D. marsupialis</i>	29		18	0.0152 $\pm$ 0.0080	9.1256 $\pm$ 4.3231
	Total	125		49	0.0201 $\pm$ 0.0014	12.063 $\pm$ 4.086

Diferenciação genética: Fst

Uma vez encontrada estruturação entre a população do Nordeste e o resto da distribuição de *D. aurita*, torna-se importante determinar se estas duas populações estão trocando genes, ou até mesmo verificar qual a relação de parentesco entre *D. aurita*/Nordeste/*D. marsupialis*. Pensando nisso, realizou-se uma análise de Fst que se encontra apresentada para os três marcadores nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4. Para todas as comparações foram obtidos valores elevados de Fst, o que demonstra que existe diferenciação genética entre estes grupos. A maior parte das comparações obteve ainda valores significativos ($p < 0.05$), sendo que apenas na comparação entre *D. aurita* e *D. marsupialis* para os marcadores nucleares estes índices mostraram-se não significativos. Vale ressaltar, no entanto, que para ambos os marcadores a amostra de *D. marsupialis* consistiu de apenas um indivíduo, o que pode ter influenciado a análise. Este padrão é esperado para as comparações entre os gambás-de-orelhas-pretas e *D. albiventris*. Porém, olhando-se mais atentamente para os valores de Fst, vemos ainda que as comparações entre *D. aurita* e Nordeste possuem índices maiores do que as comparações entre *D. aurita* e *D. marsupialis* e até mesmo do que com *D. albiventris* para o marcador cit-b.

Tabela 3.2. Análise de Fst para marcador Citb. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

	<i>D. aurita</i>	Nordeste	<i>D.marsupialis</i>	<i>D.albiventris</i>
<i>D. aurita</i>	-			
Nordeste	0,90968**	-		
<i>D. marsupialis</i>	0,71676**	0,77236**	-	
<i>D. albiventris</i>	0,82611**	0,79021**	0,62685**	-

Tabela 3.3. Análise de Fst para marcador β -Fib. ** p<0,01, *p<0,05

	<i>D. aurita</i>	Nordeste	<i>D.marsupialis</i>	<i>D.albiventris</i>
<i>D. aurita</i>	-			
Nordeste	0,47667**	-		
<i>D. marsupialis</i>	0,04343	0,47792*	-	
<i>D. albiventris</i>	0,81071**	0,90545**	0,86581**	-

Tabela 3.4. Análise de Fst para marcador G6Pd. ** p<0,01, *p<0,05

	<i>D. aurita</i>	Nordeste	<i>D.marsupialis</i>	<i>D.albiventris</i>
<i>D. aurita</i>	-			
Nordeste	0,77259**	-		
<i>D. marsupialis</i>	0,68274	0,00000	-	
<i>D. albiventris</i>	0,94905**	0,98545**	0,93875	-

Tempo de Divergência e taxa de migração

O programa IM foi utilizado para calcular a taxa de migração e o tempo de divergência entre as populações do Nordeste e de *D. aurita*. Este programa é baseado na teoria do coalescente (Kingman, 1982). Portanto, diferentemente da análise de Fst, o modelo de isolamento com migração não sofre do problema de desbalanço amostral. Isto porque, de acordo com a teoria de coalescência, com cerca de 5 amostras de uma população as chances de capturar os eventos mais antigos de coalescências são grandes (Wakeley, 2008). Outra vantagem deste programa frente a outros estimadores de divergência/migração é que ele, através de um método

bayesiano, otimiza os dois parâmetros conjuntamente. Os resultados do programa IM estão resumidos na Tabela 3.5. Por ser uma análise bayesiana, os resultados são gerados como probabilidades posteriores dado um determinado *prior*. Sendo assim, é essencial tomar cuidado ao escolher estes valores de distribuição inicial. A Figura 3.3 mostra os resultados da distribuição dos valores de m_1 e m_2 , t , e θ_1 , θ_2 e θ_a . Os valores de ESS (*effective sample size*) que medem a eficiência da cadeia em explorar o espaço amostral foram bem elevados para as estimativas de m_1, m_2 , θ_1, θ_2 (acima de 300). Os valores foram razoáveis (acima de 200) para θ_a e para as estimativas de t , os mesmos não foram eficientes (abaixo de 200). O programa não conseguiu definir uma estimativa de tempo de divergência e nem de tamanho efetivos ancestral, como mostra a distribuição das probabilidades posteriores de suas estimativas (Figura 3.3).

Com exceção do parâmetro t e θ_a , todos os outros foram estimados com sucesso, e a distribuição de suas probabilidades posteriores convergiram para as três corridas realizadas. Para conversão das estimativas em valores demográficos, foi utilizada a estimativa média de todos os parâmetros. Utilizando a equação (1) foi calculado o valor estimado para $N_{e1}=175588.83$ (*D. aurita*), e o valor estimado para $N_{e2}=6255.621$ (Nordeste) indivíduos. Usando a equação (2) foram calculadas as taxas de migração. Os valores obtidos para a taxa de migração m_1 : 2.43×10^{-8} e para a taxa m_2 : 3.5×10^{-6} . Utilizando a equação (3) foi calculado o número de migrantes por geração, sendo o número de migrantes que entram na população 1 (sudeste da distribuição) por geração foi de 8.47×10^{-8} , e o número que entra na população Nordeste foi 4.3×10^{-7} migrantes por geração.

Tabela 3.5. Valores estimados para os parâmetros pelo programa IM, Θ_1 = valor de theta para população 1, Θ_2 = valor de theta para população 2, t= tempo de divergência, m1= taxa de migração por ano por gene para população 1, m2= taxa de migração por ano por gene para população 2. Ne= tamanho efetivo populacional da população 1 (Ne1- *D. aurita*), 2(Ne2- Nordeste) e ancestral (Nea).

	Θ_1	Θ_2	Θ_a	t	m1	m2
	3,56	0,1139	1,1393	1237175	0,005	0,765
	3,46	0,1392	2,1013	3993725	0,005	0,685
	3,36	0,1139	2,7595	1396679	0,005	0,755
Médias	3,46	0,122	-	-	0,005	0,735
	Ne 1	Ne2	Nea			
	182491,6	5824,199	14107			
	172137,4	5824,199	58241,99			
	177314,5	7118,465	107424,1			
Médias	175588,8	6255,621	-

Figura 3.3. Distribuição das probabilidades posteriores estimadas para os diferentes parâmetros, sendo que cada corrida está representada por um símbolo diferente no gráfico. Os valores da abscissa representam milhões de indivíduos para Ne1 Ne2 e Nea; tempo em milhões de anos para o gráfico de tempo de divergência e os valores máximos para cada estimativa (*prior*), nos gráficos de taxa de migração. Os valores do eixo y são a propabilidades posteriores.

Árvore filogenética e tempo de divergência

A árvore de máxima probabilidade posterior reconstruída pelo método baesiano está apresentada na Figura 3.4. O programa Beast permite acessar não só o relacionamento filogenético entre os diferentes clados, como também dá uma estimativa do tempo de divergência. Nesta árvore estão apresentados os tempos de divergência entre os diferentes grupos, os intervalos de confiança relativos a estas divergências e a probabilidade posterior dos nós. No Anexo 5 podem ser vistas as distribuições das probabilidades posteriores para a verossimilhança da árvore, os tempos de divergência usados para calibração e do modelo usado para construir a árvore (coalescente de tamanho constante).

Para facilitar a visualização, a Tabela 3.6 apresenta os tempos de divergência encontrados entre os pares de populações (apenas para *D. aurita*, *D. marsupialis* e Nordeste), e o tempo de coalescência de cada população para o gene cit-b. As divergências dentro deste grupo são bem recentes, datando do último milhão de ano, sendo que a divergência entre *D. aurita*, *D. marsupialis* e Nordeste ocorreu há cerca de 600.000-800.000 anos, não sendo muito claro qual o relacionamento entre estes três grupos. A coalescência dentro de *D. aurita* também é anterior à separação deste grupo com os demais. É marcante, no entanto, que o grupo Nordeste tenha uma coalescência das linhagens tão recente (por volta de 60.000 anos). A Figura 3.5 mostra os pontos de divergência e coalescência entre os grupos em relação aos últimos períodos glaciais.

Figura 3.4. Árvore filogenética estimada pelo programa Beast: os valores nos nós correspondem à probabilidade posterior e a barra de escala corresponde ao tempo em milhões de anos. As barras azuis representam o intervalo de confiança de 95% destas estimativas de tempo para cada nó. Os ramos foram colapsados dentro de cada espécie e nas amostras do Nordeste. Desta forma o comprimento do triângulo (na horizontal) demonstra o tempo de divergência entre as amostras que foram colapsadas.

Tabela 3.6. Tempos de divergência entre os diferentes grupos de gambás-de-orelhas-pretas, sendo na diagonal a coalescência dentro do grupo, entre [] estão os intervalos de confiança de 95%. Estes tempos e divergência foram estimados a partir da árvore bayesiana, produzida no programa Beast apresentada na Figura 3.4.

	<i>D. aurita</i>	<i>D. marsupialis</i>	Nordeste
<i>D. aurita</i>	790.000 [187.000-996.200]		
<i>D. marsupialis</i>	640.000	480.000 [346.200-1.643.500]	
Nordeste	750.000 [551.700-2.437.200]	750.000 [551.700-2.437.200]	60.000[28.800-297.500]

Figura 3.5. Duração dos últimos períodos glaciais e períodos interglaciais. A escala corresponde a milhões de anos e as setas são os tempos de coalescência, sendo a seta verde- tempo de coalescência dentro do Nordeste, seta azul em *D. aurita* e vermelha em *D. marsupialis*. As setas pretas correspondem ao tempo de divergência entre *D. aurita*, *D. marsupialis* e Nordeste encontrados pelo programa Beast. Escala das eras glaciais adaptada de Gibbard & Van Kolschoten, 2004.

Análise discriminante craniana

O resultado da análise discriminante feita está apresentado na Figura 3.6. Como podemos ver os três grupos apresentam-se diferenciados, mas uma vez que só foram utilizados 3 crânios do grupo Nordeste, a função discriminante não pode ser calculada com eficiência. Ao reclassificarmos as observações entre os três grupos (Tabela 3.7), observamos que 94% dos crânios são classificados dentro do grupo correspondente. Este valor é bem similar tanto em *D. aurita* (94%), quanto *D. marsupialis* (93%). Porém, no grupo Nordeste 100% dos crânios foram alocados no grupo correto. Estes valores, no entanto, caem consideravelmente quando a reclassificação é feita utilizando *Jackknife*, diminuindo para 93% em *D. aurita*, 87% em *D. marsupialis* e nenhum crânio alocado corretamente no grupo Nordeste. Estes resultados não são totalmente inesperados, uma vez que o grupo Nordeste não foi tão bem amostrado quanto os outros dois.

Tabela 3.7. Número e porcentagem de vezes em que cada animal foi corretamente realocado em seu grupo.

	<i>D. aurita</i>	<i>D. marsupialis</i>	Nordeste	%correto
<i>D. aurita</i>	250	15	1	94
<i>D. marsupialis</i>	4	62	1	93
Nordeste	0	0	3	100
Total	254	77	5	94

Matriz de reclassificação com <i>Jackknife</i>				
	<i>D. aurita</i>	<i>D. marsupialis</i>	Nordeste	%correto
<i>D. aurita</i>	247	16	3	93
<i>D. marsupialis</i>	5	58	4	87
Nordeste	1	2	0	0
Total	253	76	7	91

Figura 3.6. Gráfico mostrando o resultado da análise discriminante. As duas funções que resumem melhor as diferenças entre grupos estão apresentadas em cada eixo (fator 1 e fator 2). Em vermelho temos *D. marsupialis*, em azul *D. aurita* e em verde o grupo Nordeste. As elipses representam o espaço que contém 95% da variação dentro dos grupos.

Diferenciação entre os grupos

Com estas análises, fica evidente que os gambás-de-orelhas-pretas formam um grupo monofilético, como podemos ver na árvore filogenética gerada (Fig. 3.4). Torna-se claro, também, tanto por diferenças moleculares quanto morfológicas a existência de três diferentes agrupamentos destes animais, dois reconhecidos pela sistemática atual, as espécies *D. aurita* e *D. marsupialis*, e um composto pelos animais coletados no nordeste da floresta Atlântica, ao norte do Rio São Francisco.

Embora este padrão seja bem evidente tanto na rede haplotípica do marcador citb, quanto na árvore e na análise discriminante dos crânios, isto não é recuperado pelos marcadores nucleares. Este padrão é de certa forma esperado, uma vez que o genoma mitocondrial possui uma taxa de mutação mais alta que o nuclear (Hare *et al.*, 2001). Além disso, o tamanho efetivo do marcador mitocondrial na população é quatro vezes menor que o do marcador autossômico e 0,75 menor que o marcador no cromossomo X. O tamanho efetivo afeta a taxa de coalescência das linhagens, fazendo com que marcadores com um menor tamanho efetivo na população tenham uma taxa de coalescência das linhagens mais rápida (Wakeley, 2008). Portanto, em espécies que tenham divergido recentemente é comum existir compartilhamento de haplótipos devido a esta ancestralidade comum, principalmente para marcadores nucleares (Knowles, 2004). Vale ressaltar, no entanto, que compartilhamento de haplótipos entre diferentes populações também pode ocorrer por fluxo gênico entre estas. Diferenciar qual destes fenômenos (fluxo gênico ou compartilhamento por ancestralidade) é o responsável pelo padrão encontrado não é

uma tarefa trivial, sendo que análises como F_{st} e rede de haplótipos não são capazes de separar os dois fenômenos.

As análises de F_{st} apresentadas aqui mostram que há uma elevada estruturação genética entre os indivíduos do nordeste, *D. aurita* e *D. marsupialis*. Como podemos notar, a espécie *D. albiventris* apresenta níveis bem altos de F_{st} em relação a todas as outras populações. Isto é esperado uma vez que esta é uma espécie morfológicamente distinta, além de habitar áreas abertas, ao contrário do grupo de gambás-de-orelhas-pretas (Cerqueira, 1985). Nas comparações entre *D. marsupialis* e *D. aurita*, os valores de F_{st} também se mostraram altos, sugerindo que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre estes indivíduos. O padrão mais interessante, no entanto, aparece quando comparamos a população do Nordeste. Esta população nas comparações feitas com *D. aurita* apresenta valores de F_{st} maiores do que os valores encontrados na comparação entre *D. aurita* e *D. marsupialis*. Já nas comparações com *D. marsupialis*, ela apresenta valores mais baixos do que com *D. aurita*. Isto pode indicar que esta população seja mais relacionada à espécie *D. marsupialis* do que a *D. aurita*. Entretanto, é fundamental atentarmos para o desbalanço na amostragem entre as diferentes populações, pois a análise de F_{st} é susceptível a diferenças na amostragem. Uma vez que em nossas análises a diferença no número amostral entre um táxon e outro é substancial (indo de 1 até mais de 100 dependendo do táxon e do marcador), não podemos nos basear apenas nos resultados de F_{st} para concluir que as populações não possuem fluxo gênico atual ou que divergiram há um longo tempo. Outro fator que afeta este tipo de teste é que este possui muitas premissas biologicamente não realistas, as quais populações naturais muitas vezes violam, premissas estas derivadas do modelo de ilha infinitas. Podemos usar como exemplo a

premissa de que a taxa de migração não é afetada pela distância entre as populações, e que estas possuam o mesmo tamanho (Niegel, 2002). Sendo assim, estimativas de fluxo gênico oriundas deste tipo de teste muitas vezes informam pouco sobre o real fluxo gênico nesta espécie (Whitlock & McCauley, 1999). Além destes problemas, este teste não é capaz de diferenciar qual evento biológico está por trás desta diferenciação: divergência antiga com fluxo gênico, ou divergência recente sem fluxo entre as populações.

Dessa forma, para conseguirmos separar qual fenômeno é o responsável por esta alta diferenciação entre grupos, foi realizada a análise de isolamento com migração no programa IM. Esta análise mostrou que existe pouca ou nenhuma migração entre a população do Nordeste e *D. aurita*, em ambas as direções. Infelizmente, este teste não apresentou convergência para as estimativas de tempo de divergência. Provavelmente este padrão ocorreu pela falta de divergência dentro da população Nordeste, o que faz com que na época de coalescência entre as duas populações existiam poucas linhagens para coalescer.

Conforme o esperado, esta análise apresentou ainda valores superiores de tamanho efetivo na população de *D. aurita* do que da população do Nordeste (cerca de duas ordens de grandeza maior). A própria distribuição geográfica dos grupos e a composição em termos de haplótipos já nos dá indicação destas diferenças no tamanho populacional. Uma vez que a população Nordeste ocupa uma pequena região no Nordeste brasileiro, enquanto de acordo com estas análises, todos gambás-de-orelhas-pretas encontrados abaixo do rio São Francisco formam uma mesma população.

Demografia dos grupos

As análises descritivas de diversidade genética mostram de maneira clara a diferença entre os marcadores utilizados. Devido à menor taxa de mutação e maior tamanho efetivo na população em todas as estatísticas descritivas, os marcadores nucleares obtiveram índices até uma ordem de grandeza menor que o marcador mitocondrial (diversidade nucleotídica, número de haplótipos, número de substituições, diferenças par a par). É notável a falta de diversidade dentro do grupo Nordeste. Ao analisarmos esta falta de diversidade com o tempo de coalescência estimado bastante recente (Tabela 3.6), torna-se claro que esta população está sofrendo, ou sofreu uma drástica redução em seu tamanho populacional. Em *D. marsupialis*, que só foi analisado para o marcador cit-b, a diversidade nucleotídica é cerca de uma ordem de grandeza superior que em *D. aurita*, mesmo tendo sido analisados apenas 29 indivíduos, contra 79 de *D. aurita*. Uma vez que as amostras utilizadas de *D. marsupialis* advêm de lugares tão distantes como o México e a Amazônia, é provável que exista estruturação dentro desta espécie e devido a escassez de amostras não conseguimos capturá-la neste trabalho, assim como ocorre com diversas espécies amplamente distribuídas na Amazônia, como por exemplo pássaros da espécie *Xiphorhynchus spixii* (Aleixo, 2004), lagartos do gênero *Mabuya* (Miralles & Carranza, 2010) e algumas espécies de pequenos mamíferos (Patton *et al.*, 2000; Silva & Patton, 1998; Costa, 2003). A rede de haplótipos e a árvore filogenética também mostram esta alta diferenciação entre os diferentes haplótipos.

Tempo de divergência e biogeografia

Como podemos observar na árvore filogenética apresentada, a diversificação do gênero *Didelphis* é bem recente, ocorrendo durante o Pleistoceno inferior (2.21Maa). Resultados semelhantes foram encontrados por outros estudos (Steiner *et al.*, 2005, Patton *et al.*, 2003). *D. virginiana* é a espécie mais basal, tendo se separado há 2.21 Maa, sendo sua divergência após o surgimento do istmo do Panamá, cujo fechamento ocorreu há 3Maa (Knowlton & Weigt, 1998; Marko, 2002; Coates *et al.*, 1992). Em vários grupos de mamíferos o istmo do Panamá é usado como ponto de calibração de relógio molecular. Os dados apresentados aqui demonstram que a correta escolha de um ponto de calibração e utilização de relógios moleculares relaxados são críticos para a acurácia de uma análise de relógio molecular. Isto porque, se eu tivesse usado um relógio estrito e o fechamento do istmo do Panamá como ponto de calibração e divergência entre *D. virginiana* e os outros gambás, todos os tempos de divergência seriam super-estimados e desta forma não corresponderiam à história evolutiva do grupo.

A divergência entre as espécies de gambás-de-orelhas-brancas e as de gambás-de-orelhas-pretas obtida ocorreu há 1.46 Maa, no período Pleistoceno. Este resultado é diferente de outro estudo realizado por Steiner *et al.* (2005), onde a divergência entre *D. albiventris* e *D. marsupialis* foi datada em 4.6 ± 0.5 milhões de anos. Steiner *et al.* (2005) também construíram uma árvore bayesiana, mas utilizaram como ponto de calibração o surgimento do gênero *Didelphis* (o mesmo utilizado aqui), colocando como limite inferior 4 milhões de anos (baseado em Simpson, 1972,1974). No entanto, os únicos táxons de *Didelphis* utilizados foram *D. albiventris* e *D. marsupialis*, que filogeneticamente não são tão distantes, e ao forçá-los a uma

divergência há 4 milhões de anos, pode ter levado a uma superestimativa da divergência entre as espécies do gênero. É importante ressaltar que o objetivo deste estudo (Steiner *et al.*, 2005) não era produzir uma filogenia de *Didelphis* e sim uma filogenia de todos Didelphimorphia mais focado na divergência entre gêneros, por isso a falta de amostragem de espécies dentro do gênero *Didelphis*.

Os gambás-de-orelhas-pretas formam um grupo monofilético. Porém, o relacionamento entre os três grupos (*D. aurita*, *D. marsupialis* e Nordeste) não pode ser resolvido com a análise apresentada, uma vez que o suporte do nó mostrando a população do Nordeste como grupo externo foi baixo (0.38). Portanto, a divergência entre estes três grupos será tratada como uma politomia. As duas espécies reconhecidas *D. aurita* e *D. marsupialis* são indistinguíveis por caracteres qualitativos, sendo a separação entre as espécies discutida na literatura (Cabrera, 1957; Hershkovitz, 1969). Atualmente, são consideradas espécies distintas baseado em caracteres morfométricos (Cerqueira & Lemos, 2000). A análise discriminante feita com os crânios dá suporte à visão de espécies distintas. Os dados moleculares aqui apresentados demonstram que são grupos monofiléticos, diferenciados e com suporte relativamente alto (0.98 para *D. aurita* e 0.65 para *D. marsupialis*, valores de probabilidade posterior). Da mesma forma o grupo Nordeste, que não é uma espécie reconhecida, possui um elevado suporte (1.0) nestas análises moleculares e aparece como um grupo distinto também na análise de morfometria craniana. A distinção de *D. aurita* e *D. marsupialis* através de dados de sequências de DNA já havia sido registrada por Patton & Costa (2003).

É importante chamar atenção para o fato de que nem o estudo realizado com dados moleculares de Patton & Costa (2003) ou o estudo morfológico de Cerqueira &

Lemos (2000) possuíam amostras do Nordeste. No presente estudo este grupo aparece como altamente diferenciado, dando indícios de que provavelmente é uma nova espécie ainda não descrita.

Os padrões biogeográficos da porção norte da Floresta Atlântica são pouco conhecidos, sendo que poucos estudos analisaram o relacionamento de sua fauna com o restante da floresta ou os processos evolutivos que deram origem a diversidade nesta região (eg. Carnaval & Bates, 2007, Cabanne et al., 2008). Intuitivamente, pode-se pensar que a fauna da porção norte da floresta seria mais relacionada com a porção sul, uma vez que atualmente elas formam um único bioma, embora bastante fragmentado devido ao desmatamento. O que encontramos neste estudo foi surpreendente, uma vez que o gambá encontrado nesta região é tão distinto do encontrado na porção sul da floresta quanto da espécie encontrada na Amazônia. Costa (2003) estudou o relacionamento entre vários grupos de mamíferos distribuídos pela Floresta Atlântica, Amazônica e Cerrado a fim de estabelecer um relacionamento biogeográfico para estas duas áreas. O que ela encontrou foi na maior parte das vezes a Mata Atlântica como uma área biogeográfica “monofilética” (*Oecomys*, *Marmosa*, *Metachirus* e *Philander*), e em três casos como “parafilética” (*Rhipidhomys*, *Marmosops* e *Caluromys*). Para os gêneros *Caluromys* e *Rhipidomys*, os grupos da Floresta Atlântica foram separados em dois clados distintos, um relacionado ao cerrado e outro a Floresta Amazônica. E em *Marmosops* um clado formado só pela Floresta Atlântica e outro clado desta floresta relacionado à Amazônia. O que encontramos neste estudo é diferente de qualquer um destes casos, uma vez que a população do Nordeste forma um grupo distinto e externo ao clado Amazônia/Floresta Atlântica.

Em relação ao tempo de separação entre as linhagens, como podemos observar na Tabela 3.6, os intervalos de confiança são amplos. Isto acontece por duas razões: problemas metodológicos, uma vez que foram utilizadas nesta árvore apenas dados de um marcador, mas é também reflexo de um fenômeno biológico real. Este problema pode acontecer, pois como usamos um método de coalescência, a incerteza aliada ao tempo de coalescência dos haplótipos é muito grande. Esta incerteza aumenta quanto mais basal o nó simplesmente por existirem menos amostras para coalescer (sendo no final apenas duas amostras). Desta forma, não importa o número de amostras, os eventos de coalescência mais antigos sempre terão maior intervalo de confiança, sendo apenas reflexo de um evento estocástico (Knowles, 2004; Wakeley, 2008). A única forma de diminuir estes intervalos de confiança seria adicionando mais loci à amostra (Wakeley, 2008). Porém, como provavelmente a população do Nordeste sofreu um evento de gargalo genético recentemente, há pouca diversidade genética e o tempo de coalescência é recente o que faz com que no período de coalescência com os outros grupos só exista uma linhagem para coalescer. Desta forma, aumentar o número de loci pode não ajudar a resolver o relacionamento entre as três populações. Mesmo com estes grandes intervalos de confiança, temos a separação entre as três linhagens datando do período Pleistoceno (entre 50.000 anos e 2.5 Maa), sendo a data com a maior probabilidade posterior à cerca de 700 mil anos.

Atualmente, a Floresta Atlântica e a Amazônica estão separadas por um corredor de vegetação seca (Rizzini, 1979). Na literatura é sugerido que este corredor é um importante limitador ao fluxo de genes entre as espécies destas florestas (Costa, 2003). Tal sugestão é concordante com os dados aqui apresentados.

Entretanto, a paisagem da América do Sul mudou diversas vezes ao longo dos períodos Terciário e Quaternário. Estas mudanças ocorreram principalmente devido a alterações na irradiação solar, que por sua vez é afetada pelos ciclos de Milankovitch (Cruz *et al.*, 2005). Estes ciclos são os responsáveis pelos eventos de glaciações cíclicas que afetam a Terra. Vários autores argumentaram que estas mudanças podem ter influenciado a evolução da biota e o surgimento de novas espécies (Vanzolini & Williams, 1970; Haffer, 1969). Esta hipótese é conhecida como “Hipótese de Refúgios” e prediz que durante os períodos glaciais as espécies florestais ficavam isoladas em diferentes fragmentos de mata (refúgios) e se diferenciavam. Quando terminava o período glacial, as florestas se expandiam e as espécies voltavam a se encontrar. Neste momento, elas já haveriam formado espécies diferentes, sendo que o oposto ocorria com espécies de savanas. Porém, embora sejam amplamente documentadas em todas as partes do globo mudanças na temperatura durante os períodos glaciais, o impacto destas mudanças nas diferentes formações florestais da América do Sul ainda é discutido (Ledru *et al.*, 2009; Behling, 1998). Ainda mais controverso é o papel destes refúgios na diferenciação das espécies (Lessa *et al.*, 2003; Moritz *et al.*, 2000; Hewitt, 2004).

Existem evidências que apontam que, em diversos momentos do passado, áreas atualmente ocupadas por regiões de Cerrado ou até mesmo de Caatinga foram cobertas por formações florestais com potencial para conectar as florestas Atlântica e Amazônica (Bigarella *et al.*, 1975; Ledru, 1993; Ledru *et al.*, 1996; Ledru *et al.*, 2009; Prado & Gibbs, 1993). Na região nordeste, há indícios de que durante as eras glaciais esta região possuiu um clima mais frio e mais úmido, o que teria possibilitado a ocorrência de floresta nesta região. Estes estudos são baseados em evidências

derivadas dos mais diferentes tipos de dados: tais como a distribuição de mamíferos (Vivo, 1997), características de fitofisionomia (Rizzini, 1979), palinológicas (Ledru *et al.*, 2009) e de espeleotemas (Cruz *et al.*, 2005).

A hipótese levantada para a diversificação dos gambás-de-orelhas-pretas proposta aqui tem grande relação com as mudanças nas formações florestais que ocorreram ao longo do período Quaternário na América do Sul. É provável que a espécie ancestral tenha tido uma ampla distribuição por todas as formações florestais em uma época em que estas ainda eram ligadas e amplamente distribuídas (não havia presença de Cerrado ou Caatinga). Em um primeiro momento durante um período interglacial (Figura 3.5), o nordeste brasileiro ficou mais seco e houve estabelecimento da Caatinga, o que levou a formação de refúgios no nordeste brasileiro. A linhagem de gambá do Nordeste se tornou isolada da outra linhagem pela presença da Caatinga, divergindo assim da espécie ancestral que daria origem a *D. aurita* e *D. marsupialis*. Em um segundo momento, em um período glacial, com a presença de climas mais secos houve a fragmentação da grande formação florestal existente, formando a Floresta Atlântica e Amazônica, o que levou à divergência entre *D. aurita* e *D. marsupialis*. Note que a ordem dos eventos aqui apresentados pode não corresponder à dos eventos históricos. Como encontrei praticamente uma politomia entre os grupos a divergência entre estes pode ter ocorrido tanto da forma descrita, quanto em qualquer outra sequência de eventos. Porém, os fatos aqui apresentados fornecem um cenário em que a divergência entre os grupos foi praticamente concomitante (em termos de tempo de divergência), mostrando que a dinâmica de mudanças na paisagem sul-americana no período Quaternário foi intensa, promovendo a divergência dos gambás-de-orelhas-pretas. Atualmente a espécie *D. marsupialis* encontra-se separada das

outras duas populações pela diagonal seca formada pelo Cerrado e Caatinga. As outras duas populações devem ter este fluxo gênico tão restrito porque, embora os gambás sejam animais grandes e vágéis com ampla área de vida (Cunha & Vieira, 2005; Sunkist *et al.*, 1987), o rio São Francisco deve ser uma importante barreira ao fluxo gênico atual entre as populações do Nordeste e da distribuição sul de *D. aurita*.

Os dados apresentados aqui reiteram que *D. aurita* e *D. marsupialis* são duas espécies distintas tanto por morfometria, conforme já havia sido descrita por Cerqueira & Lemos (2000), quanto molecularmente como descrito por Patton & Costa (2003). Além disso, mostramos que há uma terceira linhagem de gambá-de-orelhas-pretas existente na distribuição Nordeste da Mata Atlântica. Esta população é diferenciada tanto morfológica quanto molecularmente, sendo que a relação de parentesco desta com as outras duas espécies permanece obscura. Foi demonstrado também que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre estes grupos. O fator limitante ao fluxo gênico atualmente deve ser tanto a existência da diagonal seca separando a Amazônia da Floresta Atlântica, quanto o Rio São Francisco separando a população Nordeste de *D. aurita*. A divergência entre estas linhagens ocorreu muito próxima, datando de cerca de 600.000- 800.000 anos durante o período Pleistoceno. Uma vez que estas são espécies florestais, é provável que a dinâmica climática do Quaternário tenha influenciado nesta divergência.

Referências Bibliográficas

- Ab'Saber AN (1974) O domínio morfoclimático semi-árido das caatingas brasileiras. *Geomorfologia* 43: 1-39.
- Aleixo A (2004) Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58(6): 1303-17.
- Andrade-Lima D (1964) Contribuição à dinâmica da flora do Brasil. *Arquivos do instituto Ciências da Terra* 2: 15–20.
- Auler AS, Wang X, Edwards RL, Cheng H, Cristalli PS, SmartPL(2004) Palaeoenvironments in semi-arid northeastern Brazil inferred from high precision mass spectrometric speleothem and travertine ages and the dynamics of South American rainforests. *Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers The Virtual Scientific Journal* 2(2): 2.
- Behling H, Arz HW, Patzold J, Wefer G (2000) Late Quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quaternary Science Reviews* 19(10): 981-994.
- Behling H (1998) Late Quaternary vegetational and climate changes in Brazil. *Rev. Paleobot. Palyn.* 99: 143-156.
- Bigarella JJ, Andrade-Lima D, Riehs PJ (1975) Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 47: 411-464.
- Burnham RJ, Johnson KR (2004) South American paleobotany and the origin of Neotropical forests. *Philosophical trasactions of the royal society of London. B* 359: 1595-1610.
- Cabanne, GS, Horta, FM, Sari, EHR, Santos, FR, Miyaki, CY. (2008). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 760–773.
- Cabrera A (1957) Catalogo de los mamíferos de America del Sur. *Rev. Mus. Arg. Cienc.Nat. Bs. As. (Zool.)*, 4 : 1-732.
- Carnaval, ACOQ and Bates JM. (2007). Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution* 61: 2942-2957
- Cerqueira, R. 1985. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). *Journal of Biogeography* 12: 135-145.
- CerqueiraR, Lemos B (2000) Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia* 64: 319–327.
- Coates A, Jackson J, Collins L, Cronin T, Dowsett H, Bybell L, Jung P, Obando J (1992) Closure of the Isthmus of Panama: the near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of American Bulletin* 104: 814-828.

- Cole MM (1960) Cerrado , Caatinga and Pantanal: The Distribution and Origin of the Savanna Vegetation of Brazil. *The Geographical Journal* 126(2): 168-179.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71-86.
- Cunha AA, Vieira MV (2005) Age, season, and vertical use of the Atlantic rainforest by the common opossum, *Didelphis aurita* Wied 1826. *Acta Theriologica* 50: 551-560.
- Cruz FW, Burns SJ, Karmann I, Sharp WD, Vuille M, Cardoso AO, Ferrari JA, Dias PLS, Viana O (2005) Insolation-driven changes in atmospheric circulation over the past 116,000 years in subtropical Brazil. *Nature* 434: 63–66.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4(5): e88.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W (2002) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161: 1307-1320.
- Excoffier L G, Laval, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Gibbard, P. & van Kolfschoten, T. (2004) The Pleistocene and Holocene Epochs. Chapter 22 em Gradstein, F. M., Ogg, James G., and Smith, A. Gilbert (eds.), *A Geologic Time Scale 2004* Cambridge University Press, Cambridge.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Hare MP (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16(12): 700-706.
- Hershkovitz P (1969) The evolution of mammals in southern continents. VI. The recent mammals of the neotropical region : a zoogeographic and ecological review. *Quarterly Review. Biology*, 44: 1-70.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* . 359: 183-195.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747-760.
- Hey J, Nielsen R (2007) Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS* 104: 2785–2790.
- Julien-Lafferire D, Atramentowicz M (1990) Feeding and reproduction of three didelphid marsupials in two neotropical forests (French Guiana). *Biotropica* 22: 404-415.

- Kajin MR, Cerqueira MV, Vieira , Gentile R (2008) Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. *Revista Brasileira de Zoologia* 25: 206-213.
- Kingman JFC (1982) The coalescent. *Stochastic Processes and Their Applications* 13: 235-248.
- Knowles LL (2004) The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1-10.
- Knowlton N, Weigt L (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 2257-2263.
- Ledru MP (1993) Late Quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90-98.
- Ledru MP, Soares Braga PI, Soubie ´s F, Fournier M, Martin L, Suguio K, Turcq B (1996) The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 123: 239-257.
- Ledru MP, Mourguiart P, Riccomini C (2009) Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleocology* 271: 140-152.
- Leite Y, Costa L, Stallings J (1996) Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. *Journal of Tropical Ecology* 12: 435-440.
- Lessa EP, Cook JA, Patton JL (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 10331-10334.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Loretto D, Vieira MV (2005) The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). *Journal of Mammalogy* 86: 287-293.
- Marko P (2002) Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the isthmus of panama. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2005-2021.
- Miralles A, Carranza S (2010) Systematics and biogeography of the Neotropical genus *Mabuya*, with special emphasis on the Amazonian skink *Mabuya nigropunctata* Reptilia, Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 857-869.
- Moojen J (1948) Speciation in the Brazilian spiny rats (Genus *Proechimys*, Family Echimyidae). University of Kansas Publications, Museum of Natural History 1: 301-406.
- Moritz C, Patton JL, Schneider C J, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *A. Rev. Ecol. Syst.* 31: 533-563.
- Niegel JE (2002) Is *Fst* obsolete? *Conservation Genetics* 3: 167-173.

- Oliveira-Filho A, Ratter J (1995) A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52(2): 141-194.
- Patton JL, Da Silva MNF, Malcolm JR (2000) Mammals of the Rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 244: 1-306.
- Patton JL, Costa LP, Jones, Menna, et al. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials. Pages: 63-81 Published: 2003
- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902-927.
- Prim RC (1957) Shortest connection networks and some generalizations. *Mathematics* 36: 1389-1401.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Raven PH, Axelrod DI (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 539-673.
- Rizzini CT (1979) Tratado de fitogeografia do Brasil. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Santori R, Moraes DA, Cerqueira R (1995) Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (marsupialia, didelphoidea) in southeastern Brazil. *Mammalia* 59: 511-516.
- Sebastião, H. (2010). Evolução Morfológica em marsupiais (Mammalia, Didelphimorphia) do Novo Mundo. Tese apresentada para o programa de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo, IB-USP.
- Silva MNF, Patton JL (1998) Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7(4): 475-486.
- Simpson GG (1972) Didelphidae from the Chapadmalal formation in the Museo Municipal de Ciencias Naturales of Mar del Plata. *Mus. Munic. Cienc. Nat. Mar del Plata* 2: 1-40.
- Simpson GG (1974) Notes on Didelphidae (Mammalia, Marsupialia) from the Huayquerian (Pliocene) of Argentina. *American Museum Novities* 2559: 1-15.
- Steiner C, Tilak M, Douzery EJP, Catzeflis F (2005) New DNA data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene diversification of living South America opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 363-379.
- Sunquist ME, Austad SN, Sunquist F (1987) Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68: 173-176.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Vanzolini PE, Williams EE (1970) South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia (São Paulo)* 19: 1-298.

- Vivo MD (1997) Mammalian evidence of historical ecological change in the castinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. *Journal of Comparative Biology*, 2(1): 65-73.
- Wakeley J (2008) Coalescent theory: an Introduction. New York: Roberts and Company Publishers.
- Wang XF, Auler AS, Edwards RL, Cheng H, Cristalli PS, Smart PL, Richards DA, Shen CC (2004) Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature* 432: 740–743.
- Whitlock MC, McCauley D (1990) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST}/(4Nm+1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323–353.

Capítulo 4

*Estudo de padrões de variação
genética e morfológica
em Didelphis aurita:
testando a Hipótese de
Refúgios na Mata Atlântica*

A Floresta Atlântica é a segunda maior floresta da região neotropical, sendo uma das regiões mais diversas do mundo. Várias hipóteses de diversificação já foram propostas para este bioma a fim de investigar as causas desta mega diversidade. A hipótese mais discutida é, sem dúvida, a hipótese de Refúgios, que prediz que a dinâmica climática do Quaternário foi importante para o surgimento da diversidade dentro desta floresta. Pensando nisso, estudou-se a espécie *Didelphis aurita*, um marsupial endêmico e amplamente distribuído nesta floresta, a fim de testar esta hipótese. Usou-se dados de variação genética provindos de três marcadores moleculares independentes, e dados de variação morfológica do crânio deste mamífero. Os resultados suportam várias das previsões esperadas para esta hipótese como: baixa diversidade entre os haplótipos, falta de estruturação tanto genética quanto morfológica e expansão demográfica recente. Entretanto, o período estimado para esta expansão demográfica não é condizente com a hipótese, uma vez que o tempo estimado foi de 50 mil anos atrás e, portanto, durante o período glacial e não no começo do período inter-glacial (12 mil anos) como seria esperado. Além disso, não houve uma maior diversidade genética nas áreas estáveis ao longo das eras glaciais como seria esperado. Desta forma, embora haja indícios de que a dinâmica climática do Quaternário tenha sido importante para a diversidade desta espécie, é necessário avaliar se esta expansão demográfica realmente deve-se aos refúgios Pleistocênicos e, portanto, avaliar a real importância desta hipótese na história desta espécie. Além disso, dados de simulações mostraram que para uma população nos moldes de *D. aurita*, caso esta população fosse fragmentada no último glacial em dois refúgios distintos, as estatísticas descritivas geralmente usadas para este tipo de teste não seriam eficientes em detectar este evento de fragmentação. Inclusive os testes de F_s de F_u e D de Tajima não se mostraram eficientes na detecção de um evento de expansão subsequente a fragmentação. Isto mostra que é necessário cautela com testes desta hipótese baseadas em premissas simplistas que não abarcam todos os eventos que podem ter afetado a história das diferentes populações.

The Atlantic forest is the second largest rainforest in the neotropical region, being one of the most biodiverse regions in the world. A lot of diversification hypothesis have already been proposed trying to explain the origin of this forest biodiversity. The Refugee hypothesis is the most discussed in the literature. This hypothesis says that the Quaternary climatic changes have played a key role in the diversification of this forest biota. In order to test this hypothesis, the endemic and widely spread species *Didelphis aurita* has been studied. Data derived from three molecular markers, and cranial morphometrics measures have been used. The results support a lot of the premises expected under this hypothesis: low diversity between the haplotypes, lack of geographic structure in molecular and morphometrics datasets and evidence of a recent demographic expansion. However, the estimated period for this expansion event is not congruent with the expected under this hypothesis, once the time estimated was 50.000 years ago, much older than the end of the glaciation period. Besides that, a higher genetic diversity has not been found in the areas that remained stable during the glaciations period, as it would be expected. In this way, although there are evidences supporting the Refugee Hypothesis, it is necessary to evaluate if the demographic expansion event estimated is due to Quaternary climatic dynamics and, in this way, it is necessary to evaluate the real importance of this hypothesis in the history of this species. Moreover, simulated generated data have showed for a population similar to *D. aurita*, that past events of fragmentation (during the glaciations) are not evident when analysed with descriptive statistics and neutrality tests. Therefore, these common used methods seem not efficient in detection of past events of fragmentation. Furthermore, the neutrality tests used were not able to detect the demographic expansion event subsequent to the fragmentation. This shows that caution is needed when testing the Refugee Hypothesis based on simplistic assumptions that do not cover all events that may have affected the history of different populations.

A Floresta Atlântica é uma floresta tropical caracterizada por uma forte sazonalidade, grandes gradientes ambientais devido à complexidade topográfica e chuvas orográficas dirigidas por ventos advindos do oceano Atlântico (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1993). Este bioma extremamente diverso abarca múltiplos tipos vegetacionais, incluindo formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas (Fundação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1993).

Sua distribuição original ocupava toda a costa brasileira, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, se estendendo por centenas de quilômetros continente adentro (Dinerstein *et al.*, 1995, Ribeiro *et al.*, 2009). Hoje em dia, devido ao desmatamento, ela está restrita a pequenos fragmentos esparsos, sendo uma das áreas mais ameaçadas do mundo e considerada uma área prioritária para conservação (*hotspot*) (Myers *et al.*, 2000, Lawrence, 2009). Esta floresta impressiona não apenas por sua enorme biodiversidade, mas também por sua alta taxa de endemismo, com 2,7% das cerca de 300.000 espécies de plantas catalogadas em todo mundo sendo endêmicas desta área. Com relação aos vertebrados, abriga 1.361 espécies das 27.298 existentes no mundo, sendo que 2,1% são exclusivas desta floresta (Myers *et al.*, 2000). Dentre os vertebrados que ocorrem neste bioma, 90% dos anfíbios, 30% dos répteis, 29,1% das aves e 27,9% dos mamíferos são endêmicos (Myers, *et al.*, 2000).

Desde a época de Darwin e Wallace tenta-se propor mecanismos que expliquem os padrões de distribuição e biodiversidade que se encontram nos trópicos. Muitas hipóteses já foram propostas, a maior parte (embora não todas) de acordo com a escola biogeográfica clássica, baseadas em eventos de separação alopátrica entre as

espécies. Especificamente para a Mata Atlântica, diversas hipóteses foram propostas, como por exemplo Hipótese de Vicariância Geotectônica e Hipótese de Rios. A hipótese mais discutida é sem dúvida a Hipótese de Refúgios, proposta para a Amazônia por Haffer (1969) ao estudar padrões de distribuição de aves, e para Mata Atlântica por Vanzolini e Williams (1970) estudando lagartos do gênero *Anolis*. Esta hipótese se fundamenta nas mudanças climáticas cíclicas ocorridas durante o período Terciário e Pleistoceno, nos quais períodos glaciais e interglaciais se intercalaram. Durante os períodos glaciais, as florestas se retraíam formando refúgios e as savanas se expandiam, enquanto nos períodos interglaciais o inverso ocorria. Acredita-se que estes ciclos de fragmentação das florestas em refúgios, e subsequente expansão, foram responsáveis pelo isolamento de diversas espécies, que passavam a evoluir separadamente e ao se reencontrarem já estariam isoladas reprodutivamente, dando origem a novas espécies (Marroig & Cerqueira, 1997; Haffer, 1993).

Dados sobre mudanças de vegetação devido aos períodos glaciais na Mata Atlântica são escassos. Behling (1998) e Behling *et al.* (2007) estudando depósitos palinológicos do Quaternário viram que vastas áreas do sul e sudeste do Brasil, hoje cobertas por formações florestais, durante o último máximo glacial foram substituídas por gramíneas, refletindo um período mais frio e seco, o que está de acordo com a Hipótese de Refúgios. Em outro estudo, Oliveira *et al.* (2008), encontrou evidências geomorfológicas e palinológicas de que pelo menos no vale do Rio Negro, no município de Campo Alegre (SC), a região permaneceu úmida, mesmo que o clima tenha ficado mais frio, o que está de acordo com o encontrado por Pessenda *et al.* (2009) para uma região da Serra do Mar no estado de São Paulo. Já Ledru *et al.* (2009) encontrou evidência para uma retração da floresta durante o último período glacial (de 116.000

anos até 12.000 anos) mas, dentro deste período, há inúmeros episódios de flutuações na composição florestal. Adicionalmente, há 2 estágios bem documentados de retração da floresta (durante 40.000 e 30.000 anos e durante 23.000 e 12.000 - período conhecido como último máximo glacial). Nestes períodos, o número de espécies de árvores diminuiu consideravelmente nos registros de pólen e houve um aumento abrupto de gramíneas (Poaceae), sendo todas as árvores documentadas neste período de plantas pioneiras como Melastomataceae (Ledru *et al.*, 2009). Vale ressaltar que este autor utilizou apenas um sítio fossilífero na região sudeste da distribuição da floresta (São Paulo).

Além destes dados geomorfológicos e palinológicos, Carnaval & Moritz (2008) realizaram uma modelagem da própria floresta no último máximo glacial (20 mil anos atrás) e no ótimo climático (6 mil anos atrás) a fim de avaliar a ocorrência da floresta neste períodos. Eles encontraram uma redução da floresta no último máximo glacial e áreas de Refúgios nos estados da Bahia e Espírito Santo, além de outro Refúgio menor no estado de Pernambuco e para algumas das simulações (entre os diferentes algoritmos usados) um refúgio em São Paulo.

A proposta deste capítulo é testar a Hipótese de Refúgios para a Mata Atlântica, buscando compreender qual a importância das mudanças climáticas do Pleistoceno na diversificação desta floresta. Para isto foi utilizado como modelo o gambá *Didelphis aurita*.

D. aurita é um marsupial didelfídeo apropriado para este estudo, uma vez que ele é endêmico, possui uma distribuição ampla por toda a Mata Atlântica, se dispersa razoavelmente (Pires *et al.*, 2002), possui nicho generalista e é abundante (Astúa de Moraes, 2004; Astúa de Moraes *et al.*, 2003). Desta forma, nossa expectativa é que

eventos históricos de separação entre populações tenham deixado uma assinatura na distribuição da variação genética. Uma vez que, dado a própria biologia dos gambás não esperaríamos adaptação local e baixo fluxo gênico contemporâneo entre suas populações.

Foram escolhidas duas abordagens para este teste: análises de variação genética, utilizando três marcadores moleculares com padrões de herança distintos; e análises de diversidade morfológicas dos crânios destes animais. Os dois tipos de dados foram escolhidos por darem pistas sobre diferentes aspectos da história evolutiva e ecológica da espécie.

Tradicionalmente na literatura um teste formal da Hipótese de Refúgios se baseia em algumas previsões esperadas, caso estes tenham tido um impacto na história da população em questão. Estas previsões são (Aleixo, 2004):

- (1) Variabilidade genética baixa;
- (2) Baixa divergência entre as linhagens;
- (3) Baixa estruturação geográfica;
- (4) Sinais de uma expansão demográfica recente.

Vale ressaltar que estas premissas são válidas apenas para um refúgio. Caso a população tenha ficado isolada em mais de um refúgio, parte destas premissas não são válidas, uma vez que espera-se que haja um aumento na variabilidade genética entre as populações e consequentemente na estruturação geográfica.

Estudos filogeográficos já foram realizados testando especificamente esta hipótese na Mata Atlântica com resultados que tanto suportam a hipótese (e.g.

Cabanne *et al.*, 2007; Leite, 2003), quanto resultados contrários (e.g. Francisco *et al.*, 2007; Tchaika *et al.*, 2007), em geral baseados nestas premissas. Em especial, Carnaval *et al.*, (2009) testaram esta hipótese para três espécies de pererecas endêmicas e encontraram uma maior diversidade molecular para as três espécies nas áreas onde supõe-se que tenham existido os refúgios, e uma assinatura de expansão demográfica nas áreas onde acredita-se que a floresta retraiu. Os autores propuseram neste trabalho, que este padrão deveria ocorrer em ampla variedade de táxons desta floresta.

Desta forma, além de testar as quatro predições citadas acima, buscou-se avaliar se para *D. aurita* as áreas postuladas como mantendo florestas em refúgios (Carnaval *et al.* 2009) desde o último máximo glacial possuíam uma maior diversidade em relação às outras áreas. Também, foi avaliado se na porção na qual estima-se que a floresta sofreu retração, há uma assinatura de expansão demográfica.

Além disso, buscou-se analisar os efeitos na diversidade genética que ocorreria caso a população sobrevivente fosse descendente de dois refúgios. A ideia por trás deste teste é que simulações como a realizada por Carnaval & Moritz (2008), não levaram em conta o elevado gradiente altitudinal da Mata Atlântica, e portanto, o número de refúgios foi subestimado. Desta forma, é provável que durante os períodos glaciais mais de um refúgio tenha existido, e não há dados na literatura que analisem como a diversidade genética de uma população se comportaria tendo sido estruturada no passado e se fundido atualmente.

Amostras

Como visto no capítulo anterior, o que antes se acreditava ser a mesma espécie (*D. aurita*) distribuída por toda Mata Atlântica provavelmente são duas espécies distintas. Desta forma, neste capítulo só iremos utilizar as amostras de *D. aurita* distribuição sul e sudeste (isto é excluindo-se as amostras do grupo Nordeste- Capítulo 3).

Foram sequenciados os genes citocromo b, G6PD e β -fib. Ao total tem-se 79 amostras de citb, 127 de G6PD e 134 de β -fib. Os protocolos de extração de tecido, amplificação, purificação e sequenciamento encontram-se apresentados no Capítulo 2. Os locais de coleta e coordenadas geográficas estão no Anexo 1.

Além disso, foram utilizados 250 crânios medidos de acordo com a metodologia apresentada no Capítulo 2 e apresentados no Anexo 4.

Distribuição da variação genética

Para verificarmos se existe alguma estruturação geográfica, foi construída uma árvore filogenética através do método bayesiano para as amostras de cit-b. Em especial, buscou-se analisar se as áreas preditas mais estáveis ao longo das últimas eras glaciais (sensu Carnaval *et al.*, 2009) possuíam ou não maior variação. Esta árvore foi obtida através do programa Beast versão 1.6 (Drummond & Rambaut., 2007; Drummond *et al.*, 2002), utilizando um relógio molecular estrito, com taxa de 1,75% por milhão de ano, conforme estimado para *Didelphis* (capítulo 3). Note que o intuito

desta árvore não foi estimar tempo de divergência entre as amostras, mas apenas verificar o padrão geográfico de distribuição da variação. Foram realizadas 300 milhões de cadeias de Markov- MonteCarlo, sendo o arquivo de log analisado no software Tracer versão 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), para verificação da eficiência da cadeia em explorar o espaço amostral e a autocorrelação entre os elos da cadeia (valores de ESS). A distribuição posterior de árvores foi sumarizada no programa Treeanotator versão 1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007), excluindo-se as árvores geradas no período de *burn-in* e visualizadas no Figtree versão 1.3.1. Foram utilizadas apenas corridas nas quais os valores de ESS para todos os parâmetros analisados fossem superiores a 400 e com as propabilidades posteriores bem amostradas (Drummond et al., 2007). Esta árvore foi contruída apenas para o marcador cit-b por ser o único a apresentar níveis de variação altos.

Análises de Diversidade Genética

Para cada marcador, análises descritivas da diversidade genética foram feitas para a população de *D. aurita*. Tais análises incluem número de haplótipos, número de substituições (transições, transversões e indels), diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica, número médio de diferenças par a par. As análises foram conduzidas nos programas Dnasp versão 5.10 (Librado & Rozas, 2009) e Arlequin versão 3.1.1.1 (Excoffier *et al*, 2005).

Dois testes de neutralidade foram conduzidos. O teste D de Tajima (1989) que utiliza dois estimadores de θ ($4N\mu$) diferentes, o primeiro calculado a partir do número de diferenças par a par e o segundo a partir do número de sítios segregantes, subtraindo os dois e dividindo pelo desvio padrão destes. Espera-se que numa

população evoluindo em neutralidade estes dois estimadores não desviem significativamente de zero (Excoffier *et al*, 2005). O segundo teste é o F_s de Fu (1997) que avalia a probabilidade de se observar numa amostra neutra aleatória o número de haplótipos observados, dado o número de diferenças par a par observadas (Excoffier *et al*, 2005).

Estes dois testes usam, portanto, diferentes parâmetros extraídos dos dados para se computar o valor de Θ a fim de testar se as amostras provêm de uma população evoluindo de acordo com o modelo neutro (ausência de seleção natural ou estruturação populacional e tamanho constante ao longo do tempo). Desse modo, são essenciais para testar o modelo de refúgios, uma vez que espera-se que as populações tenham passado por um evento de expansão demográfica depois do último máximo glacial (Aleixo, 2004).

Comparação da diversidade genética encontrada

Carnaval *et al.*, 2009 mostraram determinadas áreas de refúgios durante o último máximo glacial na Mata Atlântica brasileira. Estas áreas foram produzidas através de uma modelagem de nicho ecológico da própria floresta, e as áreas que permaneceram estáveis desde o último máximo glacial seriam uma grande parte da Bahia e Espírito Santo e uma área menor em Pernambuco. Utilizando três espécies de sapos, foi demonstrado que as linhagens existentes nestes locais eram além de mais diversas, mais antigas (Carnaval *et al.*, 2009), corroborando a existência de áreas mais estáveis nestas regiões. Apenas através de uma inspeção visual (Figura 4.4) vemos que os dados aqui apresentados não suportam totalmente esta hipótese, principalmente porque para o cit-b (marcador mais diverso), a maior parte da diversidade encontra-se

no Rio de Janeiro. Porém, a maior parte da amostragem do presente trabalho advém das regiões ditas instáveis (principalmente Rio de Janeiro), e poucas amostras das regiões estáveis (Bahia e Espírito Santo). Desta forma, pensou-se realizar uma simulação a fim de verificar se a quantidade de variabilidade genética encontrada nas áreas hipotetizadas como estáveis e instáveis são equivalentes ou se uma destas duas áreas possui uma maior diversidade genética. Em outras palavras, procuramos ver se a baixa diversidade genética encontrada nos estados da Bahia e Espírito Santo pode ser explicada pela pouca amostragem ou se é um fenômeno biológico real.

Para realizar as simulações foi utilizado o programa Simcoal 2.1.2 (Laval & Excoffier, 2004), que gera diferentes sequências e genealogias baseado nas premissas do coalescente de Kingman (1982). Para o programa, é necessário fornecer os seguintes parâmetros: tamanho efetivo da população, número de amostras, quantidade de loci, número de pares de base por locus e taxa de recombinação e mutação.

Estas simulações foram realizadas utilizando apenas o gene mitocondrial cit-b. Primeiramente foram separadas as amostras provenientes dos estados da Bahia e Espírito Santo do restante. Em seguida, foi calculado o número de polimorfismos e o valor de θ_s para esta população das áreas instáveis. Substituindo o valor encontrado de θ_s , na equação $\theta = 2Ne\mu$, temos uma estimativa do tamanho populacional. Assumindo-se que a taxa de mutação é de 1,75% /locus/milhão de ano, e $\theta_s = 0,00639$ por sítio, temos o tamanho populacional em 185714 indivíduos. O arquivo de entrada das simulações pode ser visto no Anexo 6.

Foram realizadas duas simulações distintas. Uma simulação foi realizada apenas para verificar se os parâmetros simulados realmente estão de acordo com a população usada como modelo, isto é, se espelham a população das áreas instáveis. Outra simulação foi realizada para verificar se a mesma população (tamanho efetivo igual, taxa de mutação etc.), porém, com o tamanho amostral diferente (equivalente das áreas estáveis) produziria os valores de diversidade encontrados para as áreas estáveis. Ambas as simulações assumiram uma população evoluindo em neutralidade.

Para cada cenário, foram realizadas 5000 simulações que posteriormente foram analisadas com relação ao número de haplótipos e número de substituições pelo programa Arlequin versão 3.1.1.1 (Excoffier *et al*, 2005). Para melhor visualização dos valores de cada análise os valores foram plotados num histograma de frequência gerado pelo programa Systat 11.

Extended bayesian skyline plot

A análise de *extended bayesian skyline plot* (EBS) permite acessar a história demográfica de determinada população ao longo do tempo. Esta análise utiliza um panorama coalescente (Kingman, 1982) e um método bayesiano para explorar o espaço amostral dos parâmetros, tais como, tamanho populacional efetivo e tempo de coalescência (Heled & Drummond, 2008). Esta análise, por permitir o uso de múltiplos loci, é mais eficiente que análises que estimam mudanças no tamanho efetivo usando apenas um locus, como a análise de *bayesian skyline plot* (Drummond *et al.*, 2005). Apenas uma população pode ser analisada a cada vez e, portanto, foram utilizados apenas os indivíduos de *D. aurita*.

O EBS é implementado no Beast versão 1.6 (Drummond & Rambaut., 2007; Drummond *et al.*, 2002). Todas as sequências disponíveis de todos os marcadores foram utilizadas (79 cit-b, 127 G6PD e 134 de β -fib). As sequências que possuíam mais de três loci indefinidos foram excluídas das análises. O modelo mutacional usado foi HKY para os genes nucleares e HKY +G+I para o gene mitocondrial, conforme estimado pelo programa MEGA versão 5.0 (Tamura, *et al* 2007). A taxa de mutação usada foi a estimada utilizando a média de diferenças par a par e o tempo de divergência entre *D. aurita* e *D. albiventris* para o gene citb, conforme explicado no Capítulo 3: 1,75%/lôcus/por milhão de anos para cit-b, 0,5%/lôcus/milhão de anos para G6PD e 0,4%/lôcus/milhão de anos para β -fib. O número de cadeias de Markov-MonteCarlo usadas foi de 50 milhões e as primeiras 5 milhões foram descartadas como período de *Burn-in* (durante este período as chances das cadeias estarem correlacionadas é muito elevado). A correlação das cadeias e as distribuições das probabilidades posteriores foram analisadas no programa Tracer versão 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) e estão apresentadas no Anexo 5. Três diferentes corridas de EBS foram realizadas para verificar a convergência das estimativas.

Explorando a ocorrência de dois refúgios

Dado que eventos demográficos tais como separação de linhagens, fusão, diminuição/expansão populacional, deixam marcas na diversidade genética de uma população, torna-se possível criar modelos que incorporem diferentes eventos demográficos e por simulação obter sequências provenientes destas populações hipotéticas. Este tipo de abordagem é adequada para testar hipóteses biogeográficas (Knowles, 2001), tais como hipótese de refúgios.

As análises, tal como a *análise de extended bayesian skyline plot*, e as premissas de refúgios apresentadas exploram a história demográfica de apenas uma população. Portanto, ao testarmos a hipótese de refúgios desta forma estamos assumindo que a linhagem sobrevivente advém de uma única população, e assim de um único refúgio. Uma vez que é provável que tenham existido múltiplos refúgios durante o último período glacial no Pleistoceno, procurou-se nesta seção averiguar se a diversidade genética encontrada poderia ser proveniente de uma população sobrevivente de dois refúgios. Outro aspecto importante de um teste como este, é que na literatura testes de refúgios são baseados, em especial, na premissa de expansão populacional. Não sabemos no entanto, quais os efeitos na diversidade genética de uma população da fragmentação passada e se esta fragmentação poderia mascarar eventos de expansão demográfica.

As simulações foram feitas apenas para os dados mitocondriais uma vez que estes possuem um menor tamanho efetivo na população e maior taxa de mutação, e portanto, são mais sensíveis a desvios do modelo neutro de evolução (estruturação/contração/expansão populacional).

Para realizar as simulações foi utilizado o programa Simcoal 2.1.2 (Laval & Excoffier, 2004). É necessário fornecer para o programa os seguintes parâmetros: tamanho efetivo da população, número de amostras, quantidade de loci, número de pares de base por loco, taxa de recombinação e taxa de mutação. Em anexo se encontra o arquivo de entrada como usado nos diferentes cenários simulados (Anexo 6).

Em todos os cenários simulados foi usada uma taxa de mutação de 1.75%/milhão de ano/locus conforme estimado para os dados mitocondriais (Capítulo 3). As simulações foram feitas apenas para um lóco com 600 pb sem recombinação intra-lócus. Para calcular o tamanho efetivo populacional foi utilizado o valor de θ estimado pelo programa IM para a população de *D. aurita* o qual foi substituído na equação (1) do capítulo 3.

Os diferentes cenários testados assim como os parâmetros variáveis estão descritos abaixo (Figura 4.1):

Cenário 1: população evoluindo de maneira neutra ao longo do tempo. Este cenário foi simulado como um controle e também para averiguar se os valores discrepantes encontrados para os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu poderiam ser explicados em uma população evoluindo em neutralidade.

Cenário 2: uma população única que há 110 mil anos (no começo do último período glacial) se divide em duas, permanecendo assim até o fim do período glacial, há 15 mil anos (fim da época glacial), período onde elas voltam a se unir.

Cenário 3: idem cenário dois mas com as duas populações com um nível intermediário de fluxo gênico (taxa de migração de 0,05). Note que tanto no cenário dois quanto três as populações permanecem de tamanho constante, sendo cada sub-população exatamente a metade da população atual.

Cenário 4: Idem ao cenário três porém as duas populações, durante o período glacial possuem tamanho correspondente a $\frac{1}{4}$ da população no períodos interglaciais, desta forma será simulado uma expansão populacional depois do último glacial.

Para cada cenário, foram realizadas 5000 simulações que posteriormente foram analisadas com relação ao número de haplótipos, número de substituições, valores de D de Tajima e F_s de Fu e porcentagem das vezes em que a AMOVA (análise de variância molecular) foi significativa pelo programa Arlequin versão 3.1.1.1 (Excoffier *et al*, 2005). AMOVA é uma análise que estima a estruturação genética usando informações sobre a variação entre os haplótipos, assim como sua frequência em cada população. A partir destas informações uma matriz da variância dentro e entre as populações é computada, e a significância entre os valores estimados é calculada usando um teste não paramétrico de permutação (Excoffier *et al.*, 1992). Desta forma, podemos ter uma ideia se uma fragmentação no passado deixaria sinais no presente.

Figura 4.1. Diferentes cenários simulados.

Análises morfológicas

Foram medidos 246 crânios de *D. aurita*, sendo 143 machos e 103 fêmeas seguindo a metodologia descrita no capítulo 2. O objetivo destas análises foi verificar se existe algum agrupamento ou correlação da variação geográfica com a variação morfológica craniana dentro deste grupo.

Todos os crânios aqui analisados foram georeferenciados utilizando ou as coordenadas disponíveis no museu, ou através do “Gazeteer” disponível no sítio *National Geospatial - intelligence agency* da agência de inteligência norte-americana (<http://earth-info.nga.mil/gns/html/>). Foram utilizados nestes casos as coordenadas do centro da cidade do local de coleta de cada espécime (Anexo 4).

Uma vez que foi detectado dimorfismo sexual dentro de *D. aurita*, decidiu-se neste capítulo separar todas as análises entre machos e fêmeas. De forma contrária poderíamos simplesmente remover o efeito deste dimorfismo dos dados (de forma semelhante ao que faremos com as classes etárias), mas decidiu-se não realizar tal procedimento, pois machos e fêmeas possuem diferenças na capacidade de dispersão (Loretto & Vieria, 2005) e talvez isso poderia refletir em padrões diferentes de variação morfológica.

Primeiramente, os diferentes indivíduos medidos foram classificados em três classes etárias distintas (apenas indivíduos adultos, isto é com todos os molares plenamente eclodidos), a primeira com os indivíduos porém sem sinais de desgaste nos dentes, a segunda com os indivíduos apresentando poucos sinais de desgaste nos dentes e a última com indivíduos com sinais bem claros de desgaste. Uma análise de variância (ANOVA) foi conduzida para verificar as possíveis diferenças estatísticas entre as classes etárias (Tyndale-Biscoe & Mackenzie, 1976). Uma vez que as diferentes classes etárias apresentaram diferenças, principalmente em relação ao tamanho, o efeito classe etária foi removido de cada grupo (machos e fêmeas). Isso foi realizado calculando-se a média de cada medida em cada classe etária. Com estes valores subtraiu-se o valor da classe etária 7 e 5 em relação a classe etária 6. Posteriormente,

este valor foi adicionado em cada indivíduo das classes etárias 5 e 7, que foram então “transformados” em indivíduos de classe etária 6.

Feito isso, foi calculada a matriz de variância e covariância (V/CV) ponderada para sexo para a população com o maior número amostral (São Paulo, Cotia e São Bernardo). Desta matriz foram extraídos seus auto-vetores e retidos os quatro primeiros componentes principais. Os componentes principais são os vetores que explicam a maior parte da variação existente dentro de uma população para um determinado conjunto de variáveis. Os valores de cada espécime projetados nestes auto-vetores foram obtidos multiplicando cada medida de cada animal por seu respectivo coeficiente no componente principal, somando-se então todas as medidas de cada indivíduo, obtendo assim o escore de cada crânio nestes quatro componentes principais. Todas estas operações foram conduzidas no Systat 11).

Duas abordagens distintas foram utilizadas nas análises geográficas. Primeiramente, foi extraído o primeiro componente principal da correlação entre latitude e longitude (Latlong). Este componente principal foi correlacionado com os valores das projeções de cada crânio nos quatro primeiros componentes principais calculados. O mesmo procedimento foi realizado correlacionando os CPs com apenas a latitude e apenas a longitude. Desta forma pode-se ter uma ideia se há diferenciação nos dados devido à isolamento por distância. Além disso, testes de correlação foram feitos entre os quatro primeiros CPs e as variáveis climáticas de: altitude, precipitação média no mês mais chuvoso, precipitação média no mês mais seco, amplitude de variação da temperatura ao longo do ano, temperatura máxima no mês mais quente, temperatura média anual e temperatura mínima no mês mais frio. Os valores das

variáveis ambientais usadas foram extraídos da base de dados climáticos mundial – Bioclim (<http://www.worldclim.org>) com uma acurácia de 30 segundos.

Outra abordagem foi realizada pensando que a Floresta Atlântica possui um gradiente altitudinal bem elevado, com elevações que vão do nível do mar a cerca de 2700 metros de altitude. Muitos animais são influenciados por estes gradientes, sendo que alguns podem ter sua distribuição restrita ocorrendo só em áreas mais baixas, ou mais altas. Este aparenta não ser o caso para *D. aurita*, pois ele ocorre por todo o bioma. Porém, isto talvez seja um fator limitante ao fluxo gênico entre as diferentes populações. Pensando nisso, a amostra disponível de *D. aurita* foi dividida em dois grupos, um grupo com os animais que foram coletados em pontos mais elevados (acima de 500 metros) e outro da região costeira mais baixa (0 a 500m). As altitudes para cada ponto de coleta foram extraídas do programa DIVA-GIS versão 7.1.7.2 (disponível em <http://www.diva-gis.org/>) utilizando uma camada altitudinal disponível no próprio sítio do programa (<http://www.diva-gis.org/datadown>). O Anexo 4 apresenta, juntamente com os pontos de coleta e coordenadas geográficas, a altitude correspondente a cada ponto. A Figura 4.2 apresenta estes dois grupos em um mapa de altitude.

Estabelecidos estes grupos, uma maneira simples de verificarmos se existem quebras na distribuição geográfica é estabelecer um transecto ligando os diferentes pontos de coleta, atribuindo diferentes números a cada ponto e aumentando sucessivamente a distância entre eles (a ordem dos pontos pode ser visualizada no Anexo 4 e no Anexo 7 apresenta um mapa com os pontos usados). Feito isso, foi

realizada uma análise de variância entre o primeiro e segundo ponto⁵. Quando não se detectavam diferenças significativas entre estes dois pontos, eles eram agrupados e prosseguia a comparação com o terceiro ponto, e assim sucessivamente. Quando diferenças significativas eram encontradas, separava-se os grupos e prosseguia-se testando da mesma forma de acordo com o transecto estabelecido.

Além destas análises, foi realizada uma ANOVA para verificar se havia diferenças significativas nos diferentes CPs usando como fator os dois grupos altitudinais.

Figura 4.2. Amostras morfológicas usadas. Note que esta figura apresenta ambos os sexos. Os círculos azuis correspondem à distribuição acima de 500 metros, e os círculos rosas correspondem ao grupo costeiro cujas altitudes não ultrapassam os 400 metros.

⁵ Usando as projeções de cada animal para os 4 CPs e comparando-se as médias das populações.

Teste de Mantel

Uma vez que se possui dados provenientes de dados moleculares e morfológicos, é interessante analisarmos se existe correlação entre estes dados. Outra pergunta interessante é se a geografia está influenciando a diversidade genética e morfológica. Para isso realizamos um teste de correlação de matrizes: o teste de Mantel. Este teste correlaciona duas matrizes rearranjando as linhas e colunas da segunda matriz enquanto a primeira permanece inalterada (Cheverud, 1988). A cada novo rearranjo comparamos a primeira matriz com a segunda rearranjada, obtendo um valor de correlação. Estes rearranjos da matriz nos permitem calcular se a correlação entre as duas matrizes inalteradas é maior do que a esperada ao acaso.

Para obtermos as matrizes, dividimos a distribuição dos dados morfológicos e moleculares em 9 grupos. Estes grupos foram definidos de acordo com a proximidade das amostras, levando-se em consideração as características dos locais de coleta. Os grupos definidos estão apresentados na Figura 4.3.

As matrizes de distâncias morfológicas foram calculadas para machos e fêmeas separadamente, pois além de apresentarem dimorfismo sexual, os sexos apresentam diferenças na locomoção, com os machos se locomovendo em média mais do que as fêmeas (Loretto & Vieira, 2005). Para o cálculo destas distâncias, as médias de cada população para cada distância euclidiana medida foram calculadas. Em seguida, foram subtraídos as médias entre cada medida para cada par de populações. Posteriormente estes valores foram elevados ao quadrado e somados (somando-se os 35 valores correspondentes as diferenças entre as médias para cada par de população em cada caráter). Estes valores correspondem a magnitude das diferenças globais entre as duas

populações. Além destas duas matrizes, foi calculada uma matriz de ambos os sexos ponderada pelo tamanho amostral de cada sexo em cada população. Isto é, ao calcular as médias, ao invés de ser usada uma média aritmética simples, usou-se uma média ponderada pelo tamanho amostral de cada sexo.

A matriz de distância genética foi calculada através do número médio de diferenças par a par entre as duas populações. Duas matrizes distintas foram calculadas, uma realizando uma correção do número médio de diferenças entre as populações pelo número de diferenças dentro das populações, e outra sem esta correção.

A matriz geográfica foi calculada usando o valor em quilômetros entre o centro dos grupos. Este valor foi calculado utilizando o programa DIVA-GIS, através da ferramenta “medir distâncias”.

O teste de Mantel foi conduzido no programa NTSYS versão 2.0, e 999 permutações foram realizadas para cada comparação par a par de matrizes.

Figura 4.3. Populações definidas para o teste de Mantel. Os círculos rosas representam as localidades de amostras moleculares e os círculos azuis as localidades das amostras morfológicas. Cada região sombreada é um grupo definido, sendo os números dentro destas regiões a identificação dos grupos usados.

Distribuição da variação genética

A árvore de maior probabilidade posterior estimada pelo programa Beast está apresentada na Figura 4.4. Como podemos observar na árvore, a probabilidade posterior dos ramos é em sua maior parte baixa (abaixo de 50%). Esta árvore apresenta poucas substituições ou, em outras palavras, é uma árvore que denota divergência recente. Nenhum padrão geográfico claro pode ser observado. O evento de divergência mais antigo (maior divergência) possui em sua maioria amostras da Bahia e Espírito Santo. Porém, neste mesmo clado antigo há uma amostra do Rio de Janeiro. Inclusive, as amostras advindas do Rio de Janeiro são as mais amplamente distribuídas pela árvore.

Figura 4.4. Árvore bayesiana para o marcador citocromo b, com as amostras de *D. aurita*. Probabilidades posteriores superiores a 50% estão representadas por linhas mais grossas. A escala embaixo corresponde ao número de substituições. Cada círculo representa uma amostra e as diferentes cores se referem aos estados do local de coleta, conforme apresentado no mapa ao lado.

Análises de diversidade genética

As análises descritivas de diversidade genética encontram-se apresentadas na Tabela 4.1 e as Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 apresentam as substituições em cada haplótipo. Os marcadores nucleares apresentaram poucas diferenças para a par, refletindo este padrão no baixo número de haplótipos (Figura 4.6, 4.7). Uma vez que as taxas de mutação nestes marcadores são baixas e o tamanho efetivo é alto, este é um padrão esperado. Já o marcador cit-b mostrou-se altamente variável com um número de haplótipo bastante elevado (30) para *D. aurita*. Isto é espelhado pelo elevado número de substituições nesta população (Figura 4.5).

Tabela 4.1. Estatísticas descritivas da diversidade genética de *D. aurita*. N= número de indivíduos analisados, pb= número de pares de base seqüenciados, H= número de haplótipos, π = diversidade nucleotídica, par a par dif= número de diferenças par a par, S= número de substituições, Ts= número de transições, Tv= número de transversões e I= número de deleções.

	N	pb	H	π	Par a par dif	S	Ts	Tv	I
G6PD	127	1037	5	0.0008 $\pm$ 0.0006	0.8069 $\pm$ 0.5855	4	3	1	0
β -Fib	128	537	6	0.0031 $\pm$ 0.002	1.6914 $\pm$ 0.9970	4	1	3	0
Cit-b	79	600	30	0.0044 $\pm$ 0.0026	2.6199 $\pm$ 1.4156	23	16	7	0

Tabela 4.2. Testes de neutralidade realizados com seus respectivos valores de significância estatística (p). Os testes significativos estão em negrito.

	D de Tajima	Valor de p	Fs de Fu	Valor de p
β -Fib	0.176	0.6280	0.036	0.5140
G6PD	2.4627	0.9940	1.6886	0.8020
Cit-b	-1.328	0.0740	-24.047	0.0000

Cit-b	N																									
		1 1 1 1 2 2 3 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5																								
		1 1 3 5 6 7 0 2 2 8 1 9 7 3 6 6 7 8 0 0 3 8 9																								
		5 8 7 5 6 2 8 2 5 6 6 4 5 1 3 8 7 0 4 8 7 2 7																								
Hap_1	1	C	C	T	A	T	G	A	C	C	T	A	T	C	T	C	C	T	A	T	C	T	C	A		
Hap_2	1	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_3	2	.	T	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_4	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap_5	22	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_6	4	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_7	3	.	T	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_8	3	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	C	G	C	.	.	.	.	.	.
Hap_9	1	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap_10	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap_11	1	.	T	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	T	C	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_12	2	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.
Hap_13	3	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	C	.	C	.	.	T	.	.	.
Hap_14	6	.	T	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_15	1	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	T	.	.	.
Hap_16	1	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	T	.	.	.
Hap_17	3	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	T	.	.	.
Hap_18	1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap_19	6	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_20	1	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_21	1	.	T	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	T	C	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_22	1	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_23	1	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_24	1	.	T	A	.	.	A	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_25	2	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	G	C	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_26	2	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_27	1	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap_28	1	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	C	.	.
Hap_29	2	.	T	.	.	.	A	.	A	G	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	A	.	.	.	.	.
Hap_30	1	.	T	.	.	.	A	.	A	G	.	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.

Figura 4.5. Diferentes haplótipos encontrados para o marcador Cit- b.

G6PD	N				
		1			
		2	4	7	0
		6	4	6	1
		1	0	7	2
Hap_1	37	G	G	G	G
Hap_2	62	.	.	A	.
Hap_3	26	A	.	A	.
Hap_4	1	A	.	.	.
Hap_5	1	A	C	.	A

Figura 4.6. Diferentes haplótipos encontrados para o marcador G6PD.

B-fib	N					1	1	2	2	3	3	3	3	4	4	5
		6	8	8	9	4	4	1	9	0	0	1	1	4	7	0
		9	0	1	8	3	4	7	0	1	6	1	7	6	2	3
Hap_1	23	T	C	A	T	A	G	A	T	-	A	A	A	A	G	G
Hap_2	59	.	.	.	C	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.
Hap_3	30	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	T	.	.	.	.
Hap_4	18	.	.	.	C	.	.	.	.	-	C	T	.	.	.	.
Hap_5	6	.	.	.	C	.	.	.	.	-	C	T	C	.	.	.
Hap_6	10	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	T	C	.	.	.
Hap_7	34	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	.	.	.

Figura 4.7. Diferentes haplótipos encontrados para o marcador β - Fib.

Os testes de neutralidade calculados (Tabela 4.2) mostram que os diferentes marcadores aparentemente não desviam do modelo neutro de evolução (tamanho constante ao longo do tempo, falta de estruturação e ausência de seleção), com exceção do teste calculado para o gene cit- b. Para este marcador existe uma forte evidência de expansão populacional para o teste F_s de F_u (valor -24.0478 $p < 0.01$) e um valor marginalmente significativo para o teste D de Tajima (valor de -1.3287 e valor de $p = 0.07$).

Comparação da diversidade genética encontrada

As simulações feitas para avaliar se a quantidade de diversidade observada nos estados da Bahia e Espírito Santo é compatível com a mesma população que gerou a diversidade do restante da distribuição estão apresentadas na Tabela 4.3. Como pode-se ver na Tabela 4.3 a população simulada corresponde à população real usada como modelo, uma vez que todos os valores empíricos estão dentro do intervalo de 95% da distribuição e, conforme o esperado, próximos da média. A população dos estados da Bahia e Espírito Santo poderiam corresponder à mesma população simulada (restante

da distribuição), uma vez que todos os parâmetros simulados de diversidade estão dentro do intervalo de confiança das simulações.

A Figura 4.8 apresenta a distribuição dos parâmetros θ_s , número de haplótipos e polimorfismos simulados para a população da Bahia e Espírito Santo.

Tabela 4.3. Valores empíricos encontrados nos dois grupos (Espírito Santo/Bahia e restante da distribuição) e valores simulados para cada população. θ_s corresponde ao valor de θ derivado do número de substituições, H é o número de haplótipos e S, número de substituições. Para os valores simulados temos a média, o valor mínimo e máximo encontrado, desvio-padrão da distribuição e intervalo de confiança (95%) da distribuição.

Restante distribuição	θ (s)	H	S	Espírito Santo Bahia	$\theta(s)$	H	S
empírico	3.83	25.00	18.00	empírico	2.96	8.00	10.00
Simulado				Simulado			
Média	4.37	12.50	20.54	Média	4.37	7.402	14.78
Minímo	1.06	4.00	5.00	Minímo	0.00	2.00	0.00
máximo	12.35	24.00	58.00	máximo	15.38	14.00	52.00
Desvio padrão	1.50	2.76	7.05	Desvio padrão	1.95	1.814	6.61
95%-superior	1.91	18.00	37.00	95%-superior	8.87	11.00	27.00
95%- inferior	7.88	7.00	9.00	95%- inferior	1.48	4.00	6.00

Figura 4.8. Histograma dos índices de diversidade simulados para a população da Bahia e Espírito Santo. Respectivamente temos o θ_s , número de haplótipos e número de polimorfismos. A parte da distribuição dentro dos 95% de intervalo de confiança está representada pelas barras brancas. Os valores empíricos encontrados estão assinalados por setas em cada gráfico.

Extended bayesian skyline plot

O resultado da análise de *extended bayesian skyline plot* pode ser visualizada na Figura 4.9. Esta análise indica que houve uma expansão populacional bastante recente a cerca de 50 mil anos em *D. aurita*. A longa cauda estável do tamanho da população além deste período é artefato da análise, uma vez que provavelmente a partir deste ponto não existiam mais amostras para coalescer. O tamanho efetivo apresentado é extremamente elevado (média 1.7 milhões atualmente) e os intervalos de confianças são amplos. Atualmente, o tamanho efetivo seria de 250 mil indivíduos no limite inferior e 3.4 milhões no limite superior. O Anexo 5 apresenta as distribuições das probabilidades posteriores para a verossimilhança da análise e para a probabilidade de mudanças demográficas terem acontecido. O tamanho da população mudou de cerca de 840 mil (há 50 mil anos- intervalos de confiança superior de 1.1 milhões e inferior igual 115 mil indivíduos) para 1.7 milhões atualmente. Assumindo-se um tempo de geração de 1 ano (Kajin *et al.*, 2008), podemos substituir estes valores na fórmula de crescimento exponencial da população (Laval & Excoffier, 2004) $N(t) = N_0 e^{rt}$ e obteremos uma taxa de crescimento exponencial da população com valor igual a: -

Figura 4.9. Gráfico apresentando mudanças no tamanho efetivo populacional para *D. aurita*. Na abcissa temos o tempo em milhões de anos e no eixo y o número efetivo populacional em milhões de indivíduos. O primeiro gráfico apresenta o tamanho

efetivo até cerca de 700 mil anos e o segundo a partir de 200 mil anos. A linha central representa a média e as laterais os 95% de intervalo de confiança.

Explorando a existência de dois refúgios

A Tabela 4.4 apresenta os resultados para os diferentes cenários simulados. A Figura 4.10 apresenta as distribuições de diferentes parâmetros para cada cenário. Conforme o esperado, o Cenário 1 apresentou a distribuição dos valores dos testes de neutralidade com a média em torno de zero. Para o teste D de Tajima foi rejeitada a hipótese nula (evolução neutra) em 244 vezes (das 5000), isso representa 4.3% das vezes, o que é condizente com a estringência do teste de 5%. Para o teste Fs de Fu, no cenário neutro, a hipótese nula foi rejeitada em 475 vezes o que representa 9.7% das vezes, um nível muito superior ao esperado pela estringência do teste de 5%. Portanto, o número de erros do tipo I (rejeitar a hipótese nula mesmo ela sendo verdadeira) para o teste Fs de Fu foi muito maior do que o esperado.

Os outros 3 cenários (cenário 2, 3 e 4) simulam uma população que era fragmentada e se uniu depois do último máximo glacial (15.000 anos). A diferença entre estes cenários é que nos cenários 2 e 3 a população não mudou de tamanho e no cenário 4 ela dobrou de tamanho (após 15.000 anos). Como estamos simulando populações que eram estruturadas, é importante verificar se isto não está deixando uma assinatura no presente. Desta forma, a frequência em que a análise de AMOVA foi significativa, nos dá informação em qual frequência esta estruturação passado é visível no presente (Tabela 4.4). A frequência de valores significativos para esta análise de estruturação foi baixa, sendo que para o cenário 2 em 275 vezes, ou seja em 5.5%, foi significativa. Para o cenário

3 um resultado significativo foi encontrado em 271 vezes, o que corresponde a 5.42% e para o cenário 4 em 254 vezes (5.08%). Além disso, em populações estruturadas o teste D de Tajima aparece como positivo e significativo. Pensando nisso, o número de vezes que este teste apareceu positivo e significativo foi contabilizado. Porém em nenhum caso, nos três cenários, apareceu tal valor de D de Tajima significativo.

Estes cenários, em relação aos testes de neutralidade apresentaram-se muito similares ao cenário neutro, e entre si. A distribuição para os valores de D de Tajima é praticamente coincidente em todos os cenários, e em torno de zero (Figura 4.10). Para o F_s de F_u as distribuições são bem semelhantes, embora no cenário 4 (no qual uma expansão foi simulada) o desvio em relação a média é menor. O número de vezes em que este teste foi significativo foi semelhante para todos os cenários. Em relação ao número de polimorfismos e haplótipos, os cenários 2 e 3 apresentaram valores muito semelhantes e relativamente maiores que os valores do cenário 4 e menores que o cenário neutro.

Ao compararmos os dados obtidos para *D. aurita* com estas simulações observamos que o número de haplótipo encontrados (30) é alto para qualquer um destes cenários (incluindo o neutro). Em relação ao número de polimorfismos (23), este valor está contido dentro do intervalo de confiança do cenário neutro, 2 e 3, excluindo-se apenas o cenário 4. O valor de D de Tajima encontrado está contido dentro dos intervalos de confiança de todos os cenários, já o valor encontrado de F_s de F_u não está presente em nenhum intervalo de confiança dos cenários.

Tabela 4.4. Valores médios e respectivos intervalos de confiança obtidos para o número de polimorfismos, número de haplótipos, valor de F_s de F_u e D de Tajima. Além da porcentagem das vezes em que o valor de AMOVA, F_s de F_u e D de Tajima foram significativos. Valores relativos a 5000 simulações.

	Observado	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	Cenário 4
haplótipos	30				
Média		13.9	8.7	8.7	5.4
95% IC superior		20.0	14.0	14.0	10.0
95% IC inferior		8.0	4.0	4.0	2.0
Desvio-padrão		3.0	2.4	2.4	1.9
Polimorfismos	23				
Média		22.5	11.3	11.4	5.6
95% IC superior		40.0	21.0	21.0	12.0
95% IC inferior		11.0	4.0	4.0	1.0
Desvio-padrão		7.4	4.4	4.4	2.8
F_s de F_u	-24.04 $p < 0.001$				
Média		-0.3	-0.2	-0.07	-0.05
95% IC superior		6.9	6.1	6.3	4.9
95% IC inferior		-6.8	-5.5	-5.3	-4.2
Desvio-padrão		3.3	2.8	2.8	2.2
% significativos		9.7	9.6	8.6	10.3
D de Tajima	-1.32 $p = 0.07$				
Média		-0.06	-0.06	-0.01	-0.03
95% IC superior		1.9	1.9	2.0	2.0
95% IC inferior		-1.6	-1.6	-1.6	-1.6
Desvio-padrão		0.9	0.9	0.9	0.9
% significativos		4.3	5.7	5.0	5.7
AMOVA					
% significativos			5.5	5.4	5.0

Figura 4.10. Distribuição dos valores simulados para os testes de neutralidade F_s de F_u e D de Tajima, número de polimorfismos e de haplótipos

Análises morfológicas

Os quatro primeiros componentes principais e sua variância associada (autovalor) calculados podem ser visualizados na Tabela 4.5. Conjuntamente estes componentes principais correspondem a 78.5% da variação encontrada nos dados. Apenas o primeiro CP já é o responsável por explicar 60.9% da variação encontrada nos dados. O primeiro componente principal é tamanho, isso pois todos os coeficientes possuem a mesma direção (isto é, são todos positivamente correlacionados com o CP1). O segundo componente principal corresponde a interação entre componentes da região da face (em especial a sub-região nasal) que são negativamente correlacionadas com medidas da região do neurocrânio (em especial

da subregião da calota, mas com elementos da face também). Em outras palavras, o CP 2 representa um fator que quando medidas da região da face aumentam, diminuem-se as medidas da região do neurocrânio (sub-região da calota). O terceiro CP corresponde a interação entre medidas da região da face, sub-região oral e nasal, com uma medida da calota do neurocrânio que são negativamente correlacionadas com medidas do neurocrânio (calota e sub-região zigomática) e da face (também da sub-região zigomática). O quarto CP contrasta medidas da face (sub-regiões nasal e oral) com medidas também da face (sub-regiões nasal, zigomático) com medidas do neurocrânio (sub-região da calota). As medidas que mais contribuíram para cada componente principal estão em negrito na Tabela 4.5.

As correlações entre os 4 primeiros CPs, a latitude, a longitude, latlong, altitude e as variáveis climáticas podem ser vistos na Tabela 4.6. As correlações em nenhuma das comparações foram altas. Porém, é marcante o fato de que, no geral, as correlações são maiores para os machos que para as fêmeas, com exceção da correlação entre a média da precipitação no mês mais seco (cerca de 0.30 nas fêmeas), que é relativamente mais alta que nos machos (cerca de -0.17). Além disso, as correlações nos machos foram significativas para a maior parte das comparações, com exceção da precipitação no mês mais seco, e da amplitude térmica no ano. De maneira contrária as correlações nas fêmeas foram não significativas para todas as comparações com exceção da precipitação no mês mais seco. As maiores correlações são cerca de 0.20-0.30 e ocorrem entre as comparações de latitude, longitude, latlong, temperatura média, temperatura mínima e temperatura máxima com os machos.

Tabela 4.5. Lista dos auto-vetores de cada medida nos quatro primeiros componentes principais, calculados para a matriz ponderada por sexo da localidade de São Paulo. Também estão apresentados os auto-valores e a porcentagem de variação explicada por cada CP. A região e sub-região no crânio a que pertence cada medida também está apresentada.

Medida	região	sub-região	CP1	CP2	CP3	CP4
ISPM	face	oral	0.036	0.018	0.022	-0.006
ISNSL	face	nasal	0.205	0.207	-0.164	-0.035
ISPNS	face	oral, nasal	0.273	-0.310	0.150	-0.023
PMZS	face	oral	0.234	-0.069	-0.014	-0.194
PMZI	face	oral	0.185	-0.221	0.047	-0.143
PMMT	face	oral	0.305	0.115	-0.259	-0.263
NSLNA	face	nasal	0.311	-0.359	-0.049	-0.286
NSLZS	face	nasal	0.289	-0.072	-0.158	-0.276
NSLZI	face	nasal	0.207	-0.344	-0.223	0.116
NABR	neurocrânio	calota	0.152	-0.136	0.131	0.237
NAPNS	face	nasal	0.151	0.018	-0.202	0.234
BRPT	neurocrânio	calota	0.185	0.193	0.016	0.016
BRAPET	neurocrânio	calota	0.071	0.040	0.147	0.112
PTAPET	neurocrânio	calota	0.102	0.204	0.049	-0.085
PTBA	neurocrânio	calota	0.107	0.035	0.201	-0.032
PTEAM	neurocrânio	calota	0.145	0.240	0.085	-0.096
PTZYG0	neurocrânio	zigomático	0.049	0.055	0.276	0.058
PTTSP	neurocrânio	calota, zigomático	0.071	0.053	0.028	-0.012
ZSZI	face	oral, zigomático	0.078	-0.059	-0.006	0.007
ZIMT	face	oral	0.200	0.418	-0.068	0.097
ZIZYG0	face	zigomático	0.272	0.098	0.327	0.281
ZITSP	face	zigomático	0.173	-0.228	0.176	0.439
MTPNS	face	oral	0.211	0.160	0.074	0.099
PNSAPET	neurocrânio	base	0.130	-0.080	0.057	0.140
APETBA	neurocrânio	base	0.057	-0.089	0.026	0.114
APETTS	neurocrânio	base	0.075	0.078	0.004	-0.018
BAEAM	neurocrânio	base	0.101	0.025	-0.006	0.058
EAMZYG0	face	zigomático	0.145	0.130	0.005	-0.038
ZYGOTSP	neurocrânio	zigomático	0.136	0.128	-0.181	0.037
LDAS	neurocrânio	calota	0.068	0.113	0.492	-0.232
BRLD	neurocrânio	calota	0.212	0.171	-0.302	0.326
OPILD	neurocrânio	calota	0.116	0.105	0.256	-0.236
PTAS	neurocrânio	calota	0.094	-0.036	0.109	0.041
JPAS	neurocrânio	calota	0.010	-0.063	0.024	0.041
BAOPI	neurocrânio	base	0.003	0.004	-0.030	0.069
auto-valores			65.744	8.845	5.791	4.305
% da variação total explicada			60.999	8.207	5.373	3.994

Tabela 4.6. Correlações entre os 4 primeiros CPs, e o CP da latlong, latitude e longitude, altitude e as variáveis climáticas. Temp_media= temperatura anual média, T_max= temperatura máxima no mês mais quente, T_min= temperatura mínima no mês mais frio, Amp_temp= amplitude da temperatura ao longo do ano, Prec_chuv= precipitação média no mês mais chuvoso, Prec_seco= precipitação média no mês mais seco. *=p<0.05 e **=p<0.01.

	Fêmeas				Machos			
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4
CP_latlong	0.11	0.07	0.08	0.07	0.22**	0.22**	0.22**	0.21**
Latitude	0.19*	0.18	0.19*	0.17	0.20**	0.19**	0.20**	0.19**
Longitude	0.01	-0.04	-0.04	-0.04	0.22**	0.22**	0.22**	0.21**
Altitude	-0.09	-0.04	-0.05	-0.04	-0.31**	-0.30**	-0.30**	-0.30**
Temp_med	0.12	0.08	0.09	0.07	0.28**	0.27**	0.28**	0.27**
T_max	0.02	-0.01	-0.01	-0.01	0.25**	0.24**	0.24**	0.25**
T_min	0.14	0.09	0.1	0.09	0.24**	0.22**	0.24**	0.24**
Amp_temp	-0.16	-0.13	-0.13	-0.13	-0.14	-0.13	-0.13	-0.13
Prec_chuv	-0.02	-0.04	-0.05	-0.05	0.14*	0.14*	0.14*	0.13*
Prec_seco	0.31**	0.29**	0.30**	0.28**	-0.17	-0.17	-0.17	-0.17

As comparações entre os indivíduos de cada localidade (transecto) para os 4 componentes principais está apresentada na Figura 4.11. A lista de localidades e ordem de comparações estão apresentadas no Anexo 4. O Anexo 7 apresenta Figuras com as distribuição dos diferentes pontos do transecto. As médias para cada população em cada CP estão apresentadas nas Tabelas A7.1 do Anexo 7. Nesta Tabela estão também apresentados os desvios-padrões e o coeficiente de variação, isto é o valor do desvio-padrão dividido pela média multiplicado por cem para cada população.

As Tabelas 4.7 apresentam os valores das análises de variância entre cada par de população ao longo do transecto. Nas comparações dos grupos na costa, apenas duas quebras geográficas aparecem para os machos. A descontinuidade morfológica que aparece para os machos no grupo da costa é ocasionada por quatro localidades (Tinguá, Magé, Maricá e Casimiro de Abreu no estado do Rio de Janeiro). Neste grupo os valores do CPs são significativamente mais baixos (indicando pelo menos para o CP 1 que estes animais são menores) que no restante da distribuição. As duas outras

populações formadas pelo restante da distribuição não são significativamente diferentes uma da outra. Já para as fêmeas várias descontinuidades morfológicas aparecem (7 para o primeiro CP, 5 para o segundo e quatro para os CP 3 e 4, Tabela 4.7). No entanto, várias destas quebras são originadas por apenas um indivíduo, e desta forma não podemos afirmar que este indivíduo é representativo daquela localidade. Retirando-se todos as localidades com um indivíduo que apontaram descontinuidades morfológicas, o número de quebras geográficas passa a ser 4 quebras no CP 1 e 2, e 3 quebras nos outros dois CPs (Figura 4.11). Sendo a primeira quebra geográfica em Ubatuba (apenas para os dois primeiros CPs), e outras quebras em Caxias, Magé e Ilhéus respectivamente.

Para o interior, o padrão se inverte. Nas fêmeas ocorreu apenas uma descontinuidade morfológica (para todos os componentes principais) entre as localidades de São Roque e Cotia no estado de São Paulo. Já para os machos do grupo interior, 6 quebras geográficas apareceram. Porém, uma vez que as quebras ocorridas nas localidades de 11 (Campinas-SP) , 16 (São Bernardo do Campo-SP) e 17 (Salesópolis-SP) são representadas apenas por um indivíduo, não podemos afirmar que são representativos de diferenças nas localidades das quais eles foram amostrados. Desta forma, eles foram retirados das amostras e os gráficos da Figura 4.11 são apresentados excluindo estes animais. Mesmo assim, os quatro grupos formados pelos machos no grupo interior possuem apenas uma localidade que se desvia significativamente dos outros grupos (grupo 12 – Pirapora-SP) e esta é formada por apenas dois crânios. Todos os outros grupos não são significativamente diferentes um do outro.

As análises de variância feitas entre os grupos Costa e Interior mostram que existem diferenças morfológicas significativas para os 4 primeiros CPs nos machos (Figura 4.12)⁶, enquanto nas fêmeas nenhum CP apresentou diferenças⁷ (Figura 4.12).

Tabela 4.7. Análises de variância feita entre as diferentes localidades estabelecidas para a análise de transecto para os 4 CPs. Os valores correspondem a razão-F, que é uma estimativa feita a partir da fração calculada entre variância dentro e entre as amostras. As comparações significativas estão assinaladas com *, sendo $*=p<0.05$ e $**=p<0.01$. Porém, as comparações que foram significativas e correspondiam a apenas um indivíduo, não foram consideradas como quebras geográficas. As quebras geográficas consideradas estão apresentadas grifadas em cinza. Embaixo das comparações de cada grupo, temos a comparação dos grupos formados total, isto é com todos os indivíduos.

Machos				
Costa	CP1	CP2	CP3	CP4
4 x 5	3.44	2.83	3.07	3.44
4 x 3	0.98	0.94	0.88	0.98
3 x 2	5.12	5.21	5.18	5.11
1 x 2	3.62	3.62	3.82	3.62
1 x 6	0.4	0.49	0.41	0.40
1 x 7	1.77	1.58	1.73	1.77
1 x 8	0.19	0.21	0.22	0.19
1 x 9	0.41	0.49	0.50	0.41
1 x 10	0.84	0.80	0.85	0.84
1 x 11	5.54 *	5.52*	5.47*	8.88**
11 x 12	3.33	4.13	4.44	3.33
11 x 13	4.62	4.14	4.75	4.62
11 x 14	20.76**	23.68**	21.48**	20.76**
11 x 15	3.13	3.27	2.85	3.13
11 x 16	33.99**	34.81**	36.19**	33.99**
16 x 17	1.77	1.81	1.90	1.77
16 x 18	1.35	1.35	1.39	1.35
16 x 19	0.25	0.31	0.26	0.25
16 x 20	1.76	1.85	1.81	1.76
16 x 21	1.95	2.00	1.94	1.95
16 x 22	0.78	0.71	0.77	0.78
16 x 23	0.90	0.93	0.86	0.90
16 x 24	2.50	2.50	2.34	2.50
1 x 11	8.42 **	8.40**	8.37**	8.42**

⁶Valores de ANOVA iguais= 21.45, 20.35, 20.41 e 20.69 para os CP1,CP2,CP3 e CP4 respectivamente. Todos os valores de $p < 0.000$.

⁷Valores de ANOVA=2.27 sendo $p = 0.134$ para o CP1,CP2= 1.72 e $p=0.281$, CP3= 1.27 e $p= 0.261$, e CP4 = 1.13 e $p=0.288$.

1 x 16	0.37	0.36	0.46	0.37	
11 x 16	18.85**	19.03**	19.55**	18.85**	
Fêmeas					
Costa	CP1	CP2	CP3	CP4	
2 x 3	0.03	0.003	2 x3	0.01	0.04
1 x 2	0.19	0.04	1x 2	0.02	0.18
1 x 4	39.04**	39.04**	1x 4	55.78**	38.19**
1 x 5	4.03	2.49	1 x5	3.26	4.12
1 x 6	8.67*	5.96*	1 x 6	5.80	5.62
6 x 7	0.23	0.004	1 x 7	0.61	0.48
6 x 8	15.68*	5.29	1 x 8	1.45	1.03
6 x 9	32.16*	3.18	1 x 9	1.85	1.67
6 x 10	1.57	0.33	1 x 10	0.22	0.11
6 x 11	9.39**	8.91**	1 x 11	11.94**	10.65**
11 x 12	1.56	2.69	11 x 12	2.29	3.59
11 x 13	10.74*	11.48*	11 x 13	9.75*	8.93*
13 x 14	1.53	1.66	13 x 14	1.80	1.72
13 x 15	0.005	0.33	13 x 15	0.20	0.17
13 x 16	0.58	1.26	13 x 16	1.35	1.07
13 x 17	0.93	1.83	13 x 17	1.42	1.42
13 x 18	0.22	0.02	13 x 18	0.03	0.01
13 x 19	8.05*	7.53*	13 x 19	8.16*	7.02*
1 x 6	0.32	0.09			
1 x 11	48.63**	44.27**	1 x 11	18.99**	17.20**
1 x 13	1.30	1.21	1 x 13	2.64	2.75
1 x 19	2.35	2.31	1 x 19	2.61	1.62
6 x 11	14.07**	14.10**			
6 x 13	3.13	2.13			
6 x 19	0.81	1.31			
11 x 13	11.93**	12.65**	11 x 13	11.62**	11.01**
11 x 19	23.54**	26.35**	11 x 19	25.66**	23.82**
13 x 19	8.04*	7.53*	13 x 19	7.09**	7.02**
Machos					
Interior	CP1	CP2	CP3	CP4	
1 x 2	0.71	0.83	0.82	0.76	
1 x 3	0.01	0.03	0.01	0.02	
1 x 4	0.45	0.52	0.49	0.43	
1 x 5	1.49	1.39	1.36	1.47	
1 x 6	0.03	0.04	0.02	0.07	
1 x 7	1.06	1.21	1.21	1.26	
1 x 8	1.22	1.06	1.18	1.08	
1 x 9	0.01	0.02	0.02	0.01	
1 x 10	2.45	2.47	2.54	2.26	
1 x 11	8.05**	7.14**	7.89**	8.44**	
1 x 12	7.17*	6.95*	7.26**	7.09*	
12 x 13	72.9 **	93.74**	73.78**	102.76**	
13 x 14	1.16	1.30	1.25	1.35	
13 x 15	0.22	0.35	0.31	0.34	

13 x 16	6.31*	6.22**	6.26*	6.56*
13 x 17	6.84 **	6.91**	6.99*	6.97*
13 x 18	0.04	0.05	0.06	0.05
13 x 19	0.04	0.07	0.11	0.06
13 x 20	4.11*	4.37*	4.19*	4.59*
20 x 21	2.79	3.16	3.22	3.18
20 x 22	5.51	4.97	5.36	4.93
1 x 12	7.17**	6.95*	7.26*	7.09*
1 x 13	2.21	2.17	2.30	2.25
1 x 20	1.35	0.76	0.82	0.84
12 x 13	72.99**	93.74**	73.78**	102.76**
12 x 20	1.57	1.47	1.56	1.45
13 x 20	0.01	0.01	0.01	0.02
Fêmeas				
Interior	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
1 x 2	1.84	3.69	3.64	4.11
1 x 3	0.001	0.08	0.08	0.07
1 x 4	0.00	0.02	0.03	0.01
1 x 5	0.06	0.02	0.007	0.006
1 x 6	2.31	3.02	3.09	2.56
1 x 7	0.04	0.02	0.02	0.05
1 x 8	0.03	0.07	0.09	0.06
1 x 9	4.97*	5.21*	5.52*	5.22*
9 x 10	1.72	2.38	1.94	2.73
9 x 11	0.02	0.08	0.08	0.10
9 x 12	0.23	0.11	0.11	0.09
9 x 13	0.28	0.31	0.33	0.36
9 x 14	2.52	3.66	3.67	4.02
9 x 15	1.95	2.12	2.33	2.27
9 x 16	2.11	2.64	2.72	2.70
1 x 9	3.71	4.77*	5.32*	4.33*

Figura 4.11. Gráficos mostrando as diferenças nas médias entre os grupos que obtiveram valores significativamente diferentes, para os 4 CPs. A legenda das localidades pode ser vista no Anexo 4.

Machos

Fêmeas

Figura 4.12. Gráficos mostrando as análises de variância conduzidas entre os grupos da Costa e Interior, para os 4 CPs, para machos e fêmeas respectivamente.

Teste de Mantel

Foram realizadas 12 comparações entre as seguintes matrizes: distância genética não corrigida para número de polimorfismos intra-grupo, distância genética corrigida para diferenças dentro dos grupos, distância morfológica das fêmeas, distância morfológica dos machos, distâncias geográficas e distâncias morfológicas ponderadas para fêmeas e machos. Como foram definidos 9 diferentes agrupamentos, as matrizes tinham 9 linhas e 9 colunas para comparação.

Os resultados das comparações par a par destas matrizes podem ser visualizados na Tabela 4.8. Para todas as comparações os valores de correlação não foram diferentes dos esperados ao acaso (valor de $p > 0.05$), indicando que não há correlação entre a diversidade genética, morfológica e geográfica.

Tabela 4.8. Resultados dos testes de Mantel aplicados par a par sobre as matrizes. Abaixo da diagonal temos os valores do coeficiente de correlação r e acima da diagonal as probabilidades de cada teste.

	Geo	Morf_machos	Morf_fêmeas	Morf_total	Gencorr	Gen
Geo		0.30	0.23	0.30	0.42	0.46
Morf_machos	-0.149		0.41	-	0.45	0.49
Morf_fêmeas	0.129	-0.077		-	0.41	0.48
Morf_total	0.030	-	-		0.41	0.48
Gencorr	0.194	-0.097	-0.009	-0.114		-
Gen	-0.008	0.572	-0.148	0.299	-	

Existem dois conjuntos de dados distintos neste capítulo. Cada um reflete níveis de organização biológica diferentes. Análises de sequências de DNA estão em um nível hierárquico inferior, e da forma como estudadas aqui, nos dão pistas sobre a história evolutiva do grupo. Uma vez que foram escolhidos marcadores moleculares a princípio neutros, estes não sofreram ou sofrem ação de seleção natural. Desta forma tais marcadores contam a história da deriva genética, nos dando pistas sobre a história desta população, em especial sobre demografia ou estruturação geográfica (Wakeley, 2008). Por outro lado, análises morfológicas estão em um nível de organização mais alto, pois caracteres complexos possuem herança quantitativa, isto é de inúmeros genes. Portanto, ao estudar um caráter morfológico, estamos estudando a herança de centenas ou até mesmo milhares de genes interagindo. Além disso, a estrutura focal deste estudo, crânios, é de alta complexidade no desenvolvimento, incluindo 22 ossos que participam de diversas funções vitais, tais como proteção do cérebro e mastigação. Desta forma, tal estrutura deve refletir inúmeros processos biológicos relevantes (Cheverud, 1982, 1995) e, portanto, não podemos descartar que seleção natural tenha agido ou esteja agindo nas diferentes populações. Desta forma, o crânio reflete tanto a história do grupo quanto a ecologia, e pode apresentar variação devido a ambos os fatores. Dadas estas colocações, os dois tipos de dados presentes neste capítulo nos permitem explorar a história evolutiva e ecológica por trás da variação encontrada em *D. aurita*. Nesta discussão trataremos primeiramente dos dados moleculares e depois dos morfológicos, tentando uní-los em seguida para termos uma

ideia global dos fatores que tenham afetado a evolução desta espécie e o papel das eras glaciais na história deste animal.

Análises moleculares

Os dados de variação genética mostram que *D. aurita* é uma espécie com pouca divergência genética ao longo de toda sua distribuição. Esta divergência é recente e não há indícios de que haja estruturação geográfica nesta espécie. Este resultado, a primeira vista, é surpreendente uma vez que é uma espécie de ampla distribuição (Cerqueira, 1985) e, portanto, esperaríamos que existissem evidências de isolamento por distância ou, ao menos, diferentes clados em regiões da distribuição.

A árvore filogenética apresentada corrobora a divergência recente e pouco estruturada destas amostras. Além disso, os mapas de distribuição dos haplótipos apontam para uma ampla distribuição destes nos marcadores nucleares e distribuições mais restritas geograficamente para os haplótipos mitocondriais. Isto é esperado, pois marcadores mitocondriais têm um tamanho efetivo menor na população, além de uma maior taxa de mutação (Hare, 2001; Kingman, 1982; Wakeley, 2008).

Os testes de neutralidade foram não significativos para todas as populações e marcadores estudados, exceto para o cit-b em *D. aurita*. Neste grupo o teste F_s de Fu (Fu, 1997) apresentou-se altamente negativo e significativo e o D de Tajima (Tajima, 1985) mostrou-se negativo e marginalmente significativo. Isto sugere que este grupo passou por um evento de expansão demográfica recente (Excoffier, 2004; Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Marcadores mitocondriais, por terem um tamanho efetivo menor na população, possuem uma taxa de coalescência maior (Kingman, 1982;

Wakeley, 2003b). Isto faz com que eles consigam capturar eventos mais recentes em relação a marcadores nucleares. Sendo assim, uma mudança recente no tamanho das populações (aumento/diminuição) deixaria marcas mais fortes em marcadores com menor tamanho efetivo. Além disso, o teste F_s de F_u é mais sensível a eventos de expansão demográfica do que o D de Tajima (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), e isso pode explicar a diferença na significância entre os dois testes. O alto índice de haplótipos únicos é provavelmente o responsável pelo teste de neutralidade F_s de F_u ter um resultado significativo. Não podemos descartar, no entanto, que este marcador pode estar sobre ação de seleção natural, o que mimetizaria os efeitos de uma expansão demográfica (Rosenberg & Nordborg, 2002). Além disso, os resultados da simulação sob um cenário neutro indicam que o F_s de F_u tem uma taxa de rejeição da hipótese nula duas vezes maior do que seria esperado pela estringência do teste, conforme discutido abaixo.

Desta forma, temos várias evidências de que esta população passou por um evento de expansão demográfica: a baixa divergência entre os diferentes haplótipos, a falta de estruturação geográfica além do teste de neutralidade F_s de F_u . No entanto, devemos ter cuidado ao analisar estes resultados como independentes. A alta frequência de haplótipos únicos e pouco divergentes é na verdade o causador da significância do teste F_s de F_u , e não são, portanto, evidências independentes da expansão demográfica da população.

No entanto, a análise de *extended bayesian skyline plot* corrobora esta expansão demográfica, mostrando que esta população cresceu a partir de 50 mil anos atrás a uma elevada taxa de crescimento exponencial. Esta análise é feita para os três

marcadores. As estimativas de tamanho efetivo da população são bem maiores que as estimadas pelas análises descritivas de diversidade genética (tais como θ_s) e do programa IM (capítulo 3). Isto provavelmente ocorre devido ao fato de que tanto as estimativas baseadas em estatísticas descritivas quanto a estimativa do programa IM tem como pressuposto uma população evoluindo em neutralidade o que não é condizente com a população de *D. aurita*, conforme o apresentado. Embora os intervalos de confiança estimados para esta análise tenham sido elevados, isto se deve ao fato de se ter usado apenas três loci. Com um aumento no número de loci poderíamos ter uma maior confiança nas estimativas deste programa.

Carnaval & Moritz (2008) mostraram que as áreas de Bahia e Espírito Santo seriam áreas estáveis na Floresta Atlântica durante o último máximo glacial. Aliada a esta constatação, estes autores mostraram que para 3 espécies de sapos as divergências eram mais antigas nestes locais e havia maior diversidade (Carnaval, *et al.*, 2009). Em contraste, nas áreas onde não haveriam os refúgios, as populações tinham forte assinatura de expansão populacional. As simulações aqui apresentadas, que serviram para comparar a diversidade encontrada nestas áreas ditas estáveis e não estáveis, não mostram diferenças entre as áreas. Tais simulações indicam que ambas as populações possuem as mesmas característica genéticas. Além disso, a árvore apresentada aqui também é contrária às evidências apresentadas por tais autores. Isso porque, embora os animais presentes no Espírito Santo e Bahia estejam entre os que possuem as divergências mais basais da árvore e os mais amplamente distribuídos (mostrando que são linhagens bem diversificadas), as linhagens provenientes do estado de Rio de Janeiro são também amplamente ditribuídas na árvore e possuem haplótipo sbasais. Portanto, embora tais autores tenham

encontrado este padrão concordante, ele não parece ser a regra em especial ao lidarmos com espécies com menor restrição de hábitat, caso do gambá. É importante notar que a modelagem feita pelos autores, não levou em consideração estruturas importantes na determinação de padrões climáticos na Mata Atlântica, como por exemplo, o elevado gradiente altitudinal existente. Este gradiente altitudinal é responsável pela precipitação elevada (chuvas orográficas) na costa do Brasil. Desta forma, é muito improvável que apenas os refúgios encontrados por tais autores tenham existido ao longo do último glacial. Em primeiro lugar, pois, os topos das montanhas devem ter permanecido úmidos e quentes o suficiente para preservar áreas de florestas. Além disso, uma vez que a maior parte das chuvas na costa ao longo da Mata Atlântica é do tipo orográfica, sendo que hoje em dia chega a chover cerca de 2000 mm por ano longo da costa do Brasil (Atlas Climatológico do Brasil, 1969) e em alguns casos atingindo 7000 mm de chuva por ano, é improvável que a precipitação tenha diminuído a ponto de não permitir a existência de florestas na costa, em especial em regiões como a costa do norte do estado de São Paulo e Rio de Janeiro (região de Ubatuba até Angra dos Reis), pois estas regiões são as mais úmidas atualmente. Em face destes dados, é ingênuo assumir apenas dois refúgios ao longo de toda Mata Atlântica. Desta forma, o teste proposto por Carnaval et al. (2009) para averiguar o impacto de refúgios na Mata Atlântica pode não ser aplicável para grande parte dos grupos de animais. Outro fator importante, é que aqui testou-se os refúgios propostos por Carnaval & Moritz (2009), porém a existência destes ou de outros refúgios na Mata Atlântica está longe de ser consenso, sendo que diferentes autores propõem diferentes refúgios (eg. Brown, 1975; Kinzey, 1982; Müller, 1973 apud Kinzey, 1982; Cerqueira, 1982).

Os cenários simulados foram pensados procurando representar possíveis eventos que tenham acontecido na história de *D. aurita*. Em primeiro lugar, vemos que o cenário 1 (neutro) representa bem uma população evoluindo de acordo com o modelo neutro, conforme o esperado. Os valores de D de Tajima e F_s de Fu apresentam-se com dispersão em torno de zero. No entanto, chama a atenção o número de erros do tipo I no teste F_s de Fu, que foi superior ao esperado pela estringência do teste de 5%. Da mesma forma, para os outros cenários (2,3) nos quais não foi simulada uma expansão populacional o teste F_s de Fu apresentou-se significativo em cerca de 9 % das vezes. O teste F_s de Fu (Fu, 1997) é muito utilizado na literatura por ser mais sensível a desvios da neutralidade do que o D de Tajima (Tajima, 1989), conseguindo captar eventos de expansão demográfica, mesmo quando o D de Tajima não consegue (Ramos-Onsis & Rozas, 2002). Tendo em mente os resultados encontrados para estas simulações, parte destes “eventos de expansão” podem ser devidos a erros do tipo I e desse modo é necessário cautela ao interpretar este tipo de teste. Além disso, para o cenário 4 embora tenha sido simulado uma expansão bastante pronunciada depois do último glacial, os testes de neutralidade não foram capazes de captar este evento ficando a porcentagem de vezes em que eles rejeitaram a hipótese nula bem similar ao encontrado no cenário neutro. Dados simulados com os mesmos parâmetros (porém sem a estruturação passada) apresentaram sinais claros de expansão, podendo ser reconhecido em 45 % das vezes pelo teste F_s de Fu (dados não apresentados). Dado isso, fica evidente a ineficiência destes testes de neutralidade em detectar eventos de expansão quando na história da população ocorreu estruturação. Este tipo de teste é amplamente utilizado para testar a hipótese de Refúgios, mas os dados apresentados aqui, demonstram que a não ser que a

população descendente seja proveniente de um único refúgio, os sinais de expansão populacional podem não ser claros, e principalmente podem não ser captados por estes testes de neutralidade.

Para os outros três cenários, chama a atenção o fato de que a estruturação passada foi detectada em apenas cerca de 5% das vezes, o que não é diferente do esperado ao acaso. Desta forma, torna-se evidente que eventos de estruturação passada não deixariam marcas na diversidade genética em uma população nos moldes de *D. aurita*. Ao longo dos períodos glaciais é improvável que apenas um refúgio tenha existido na Mata Atlântica (Cerqueira, 1982), e as simulações aqui apresentadas nos dão evidências que um teste da hipótese de refúgios não é tão simples como o proposto.

Além de tudo, os diferentes cenários não puderam ser diferenciados olhando-se apenas para estatísticas descritivas e testes de neutralidade. Desta forma, ao analisarmos a diversidade genética de uma população é importante estar alerta ao uso destas estatísticas descritivas na interpretação de histórias evolutivas e biogeográficas, pois o poder destas de captar diferentes eventos parece limitado.

É importante ter em mente, que estas simulações são simplificações da história evolutiva e é provável que em populações naturais existam muitos outros eventos que dificultem ainda mais a detecção de possíveis efeitos de um único evento histórico como períodos glaciais. Outro fator importante é que estas simulações foram feitas pensando em *Didelphis aurita*, que é uma população, como vimos, com um tamanho efetivo grande, o que por si já dificulta a detecção de assinaturas demográficas e históricas. É provável que em espécies com tamanhos efetivos menores estes eventos

sejam mais pronunciados e que os diferentes cenários pensados aqui possam ser separados.

Análises morfológicas

Mudando de nível de organização, partimos para a análise da diversidade morfológica. Os resultados aqui apresentados mostram um padrão contrastante, pois para as fêmeas todas as comparações são não significativas, com exceção da comparação para a latitude (em apenas os CP1 e CP3) e a precipitação média no mês mais seco. Já para os machos todas as correlações são significativas, com exceção da comparação para amplitude térmica e precipitação média no mês mais seco. Porém, embora as correlações sejam significativas, em nenhum caso as correlações foram altas, tanto para as fêmeas quanto para os machos, sendo que as correlações mais fortes aparecem para as fêmeas na latitude (cerca de 0.2) e na média de precipitação no mês mais seco (cerca de 0.3) e para os machos ficam por volta de 0.2 e 0.3 nas correlações significativas.

Este padrão é interessante pois, Loretto & Vieira (2005) demonstraram que os machos se locomovem mais do que as fêmeas, e portanto, seria de esperar que as fêmeas possuísem correlações com a distribuição espacial maiores que os machos. No entanto, pelo menos para a variação morfológica do crânio destes mamíferos, este não é o padrão observado. Por outro lado, neste mesmo trabalho (Loretto & Vieira, 2005) os autores demonstraram que o movimento dos machos e das fêmeas é cíclico, sendo que o fator que determina um maior movimento dos machos é a época reprodutiva, e consequentemente a época chuvosa, já para as fêmeas o fator determinando o

movimento é a época seca. Desta forma as correlações que encontramos aqui para a diversidade morfológica nas fêmeas são concordantes com a fisiologia/ecologia dos gambás (animais grandes e vágeis). Porém, para os machos seria esperado menor correlação entre as variáveis climáticas e de latitude e longitude do que nas fêmeas.

A análise de transecto mostrou que há várias discontinuidades morfológicas dentro de *D. aurita*. Para o grupo da costa, as fêmeas apresentaram 7 discontinuidades e 8 populações diferentes. Entretanto, se analisarmos as diferentes populações veremos que a quebras referentes aos grupos 4,8 e 9 devem-se a um único animal relativamente maior que os demais. O mesmo ocorre para as comparações dos machos no Interior e os machos na Costa. Desta forma, o que deve estar afetando estas amostras é a subdivisão destas e o baixo número de exemplares por amostra. As amostras foram subdivididas primeiramente em machos e fêmeas e depois em costa e interior, o que reduziu consideravelmente as amostras para o teste. Sendo assim, animais particularmente grandes ou pequenos em amostras geográficas pequenas acabaram formando quebras geográficas que podem ou não representar padrões biológicos reais. Um exemplo claro disso são os machos na costa. Neste grupo, três diferentes agrupamentos foram formados, sendo que apenas o agrupamento 11 (indivíduo de Campinas-SP) foi o responsável por estas discontinuidades. Este indivíduo é relativamente menor do que os outros. Ao removê-lo das amostras vemos que não há diferenças significativas entre os outros dois grupos. Para o interior temos dois grupos formados para as fêmeas. E cinco grupos formados pelos machos (levando em consideração que já foram excluídos grupos formados por apenas um indivíduo). Porém, os grupos 12 e 22 são formados por apenas dois animais cada e removendo-os das análises, os três grupos restantes não são estatisticamente diferentes um do outro.

Esta é uma situação ilustrativa de como a pouca amostragem impactam um estudo populacional. Embora o gambá seja um animal muito comum por toda Mata Atlântica, os mastozoólogos não o coletam mais (salvo algumas exceções) por acharem que as coleções já estão com ampla amostragem. Durante a realização desta pesquisa, dois dos maiores museus do Brasil foram visitados e todos os *D. aurita* com crânios não danificados foram medidos. Mesmo assim, temos várias lacunas de amostragem. Isto se reflete nas análises deficientes, não permitindo uma resolução mais poderosa da variação geográfica dentro deste animal.

A análise de variância entre os indivíduos da costa e interior mostra um padrão contrastante. Para as fêmeas não houve diferenças para os 4 primeiro SCPs, porém, os machos se apresentam diferenciados. Esta diferenciação pode ter duas causas, pode ser um padrão biológico real, com os animais na costa diferenciados, ou pode ser devida a problemas de amostragem. Isso porque dos maiores machos de *D. aurita* medidos, (cerca de 7 animais) 5 estão na costa e 2 no interior⁸.

Temos, portanto, 2 análises diferentes (ANOVA entre costa e interior e correlações dos 4 CPs com variáveis climáticas) que nos mostram que há uma maior estruturação dentro dos machos do que entre as fêmeas: os machos apresentam algum nível de correlação com variáveis climáticas e latitude. Além disso, existe diferenciação entre costa e interior, embora, as análises de transecto não puderam nos dar uma definição de grupos biologicamente diferentes devido a falta de amostragem.

⁸ Indivíduos : MN-11435, MN-25677, MN-3856, MN-3855, Mzusp-1580 para costa e MN-20947 para o interior. (vide Anexo 4).

Como dito a maior estruturação dentro dos machos é o oposto do que esperaríamos, uma vez que os machos tendem a se movimentar mais, pelo menos durante a época reprodutiva, dado que o sistema de reprodução é poligínico (Loretto & Vieira, 2005, Cáceres, 2003; Gentili & Cerqueira, 1995). Desta forma esperaríamos encontrar as fêmeas como mais estruturadas. Este padrão não pôde ser recuperado com os marcadores genéticos, uma vez que não possuímos marcadores exclusivos dos machos (no cromossomo Y, por exemplo). Em primeiro lugar, isto pode também ser efeito de pouca amostragem. Por outro lado, uma possível explicação para este padrão aconteceria caso os machos fossem territorialistas, pelo menos durante a época reprodutiva. No entanto, Cáceres (2003), apontou que as fêmeas de *D. aurita*, no geral, mostram um padrão territorial durante a época reprodutiva, já os machos estudados apresentaram ampla sobreposição de sua área de vida. Porém, apenas dois machos foram utilizados neste estudo e desta forma nenhuma conclusão sobre o padrão territorial dos machos foi alcançada. Desta forma, são necessários mais estudos que averiguem o padrão de área de vida em *D. aurita*, a fim de esclarecer o padrão encontrado aqui.

Juntando os dois níveis de organização

Os resultados do teste de Mantel sugerem que não há diferenciação geográfica em *D. aurita*, uma vez que não houve nenhuma correlação significativa entre a diversidade genética, geográfica e morfológica. Vale ressaltar que os grupos definidos para o teste de Mantel, foram feitos a priori por conveniência, entre os locais de amostras moleculares e morfológicas. Desta forma eles foram feitos, pensando nas características do ambiente, mas podem não refletir grupos biológicos distintos, e

talvez, por isso, os resultados foram não significativos. Outro ponto importante, é que por se tratar de uma matriz de apenas nove variáveis, os elementos para permutações foram poucos o que o que pode afetar o cálculo da significância, como a alta correlação encontrada entre diversidade morfológica dos machos e distância genética (0.59) que não foi significativa.

Estamos lidando com duas escalas diferentes, caracteres quantitativos morfológicos e caracteres moleculares, embora ambos façam parte do todo e possuam uma história evolutiva compartilhada. Uma vez que ambos os conjuntos de dados apontam para uma falta de diferenciação entre os grupos, isso é um indicativo de que estas populações são jovens e por isso não tiveram tempo de se diferenciar. Completando esta visão mais histórica, é importante lembrar que a ecologia dos gambás favorece um alto fluxo gênico entre as populações o que também pode ter contribuído para este quadro geral de baixa diferenciação molecular e morfológica. A explicação contrária de uma população antiga, se comportando como população panmítica é difícil de aceitar uma vez que a distribuição desta espécie é por toda Mata Atlântica, com exceção da Mata Atlântica distribuída ao norte do Rio São Francisco (estados de Alagoas e Pernambuco), pois como vimos provavelmente a espécie de *Didelphis* que ocorre nesta região é diferente de *D. aurita*. Isso faz com que uma população nestes moldes deveria apresentar algum indício de isolamento por distância. Na morfologia em especial, a falta de estruturação deve estar ligada a um alto fluxo gênico entre as populações e à falta de um regime seletivo diferencial entre as distintas localidades.

A população de *D. aurita* estudada condiz com as premissas esperadas para corroborar a hipótese de refúgios (Aleixo, 2004):

(1) baixos níveis de variabilidade genética,

Visualizadas pelas poucas diferenças entre os haplótipos para os três marcadores estudados;

(2) pouca divergência entre as linhagens,

Como podemos visualizar na árvore para o marcador cit-b apresentada;

(3) baixa estruturação geográfica,

Visível na árvore apresentada, e também nos mapas de distribuição dos haplótipos. Este padrão também é evidente para os dados de morfologia, para os quais não há nenhum sinal de isolamento por distância ou diferenciação geográfica;

(4) sinais de uma expansão demográfica recente,

Uma expansão demográfica recente foi apontada para o marcador cit-b nos testes de neutralidade e para os três marcadores na análise de *extended bayesian skyline plot*. No entanto, este evento de expansão foi estimado há cerca de 50 mil anos, o que não condiz com o esperado pela Hipótese.

D. aurita é um animal generalista (Cáceres & Monteiro-Filho, 2001), não muito exigente na escolha de seu habitat (Pardini *et al.*, 2005). Pires *et al.*, (2002) mostraram que *D. aurita* consegue se movimentar até entre fragmentos florestais mais

distantes que 100 metros. Todas estas características tornam mais impressionante a forte assinatura de expansão demográfica encontrada. Embora aparentemente esteja ligada ao último período glacial, mais estudos são necessários uma vez que a data não é totalmente concordante com o esperado na hipótese de Refúgios⁹. Além disso, os dados aqui apresentados são contrários as previsões propostas por Carnaval *et al.* (2008), uma vez que não observamos um aumento da variação genética nos estados da Bahia e Espírito Santo, considerados áreas de refúgios no último máximo glacial. Mesmo assim, não podemos descartar que os períodos glaciais do Pleistoceno tenham desempenhado um importante papel na diversificação desta espécie de gambá. Uma hipótese alternativa que concorda com este evento de expansão demográfica é a de que *D. aurita* pode ser animal recente na Mata Atlântica, tendo invadido este ambiente há cerca de 50 mil anos se expandindo por toda sua extensão (com exceção do nordeste brasileiro), isto também explicaria o fato desta espécie possuir uma falta de estruturação geográfica.

Os estudos biogeográficos empíricos na Mata Atlântica ainda são escassos e os padrões que eles recuperam nem sempre são congruentes. Em relação à hipótese de Refúgios, diversos estudos recuperaram o padrão esperado para esta hipótese¹⁰, como exemplo o já citado Carnaval *et al.* (2009) com anfíbios; Cabanne *et al.* (2008) e Cabanne *et al.* (2007) com uma espécie de passeriforme; além de estudos que encontram um claro padrão de expansão demográfica em clados do sul da floresta

⁹ O último período glacial durou até cerca de 12 mil anos atrás, tendo sido registrado o último máximo glacial há 20 mil anos. Portanto, uma expansão começada há 50 mil anos, teria acontecido na era glacial, o que de certa forma é contrário ao esperado na hipótese de Refúgios.

¹⁰ Alta diversidade nas regiões de refúgios e baixa divergência nas regiões que sofreram retrações durante as eras glaciais, além de evidência de expansão demográfica nestas regiões.

(*e.g.* Grazziotin *et al.*, 2006, com jararaca; Tchaika *et al.*, 2007; com lobo-guará e Martins *et al.*, 2007, com morcego-vampiro). Contudo, a influência de refúgios na Mata Atlântica está longe de ser consenso e vários estudos rejeitam esta hipótese (*e.g.* Lara *et al.*, 2005; e Lara & Patton, 2000, com roedores, Leite, 2003, e Geise *et al.*, 2001 também com roedores). Além disso, é esperado que nem todos os táxons apresentem-se concordantes com apenas uma hipótese de diversificação, pois diferentes eventos históricos afetam de maneira diferente os táxons. A dinâmica de evolução da própria floresta é complexa, fazendo com que inúmeros fatores devam ter contribuído para a diversificação de sua biota. Outras hipóteses de diversificação já foram propostas para explicar padrões de diversidade na Mata Atlântica, tais como a hipótese de rios (Pellegrino *et al.*, 2005), vicariância geotectônica (Leite, 2003; Lara *et al.*, 2005) e gradientes ecológicos (Lara & Patton, 2000).

Além disso, como as simulações mostraram em um cenário mais complexo com uma população descendente proveniente de dois refúgios distintos, uma assinatura de expansão demográfica não seria clara. Além do mais, como também apresentado os valores de número de polimorfismos e de haplótipos seria próximo do esperado para um cenário neutro. Desta forma, histórias mais complexas, como a que se espera para a maior parte dos táxons da Mata Atlântica, não podem ser investigadas com relação a hipótese de Refúgios com premissas simplistas como as apresentadas no começo do capítulo (Aleixo, 2004). Para a Floresta Atlântica nem mesmo a localização dos refúgios é consenso na literatura, como citado aqui Carnaval & Moritz (2009) propuseram dois refúgios, enquanto Kinzey (1982) propõe três diferentes regiões, sendo uma na Bahia, uma acima do Rio Doce no Espírito Santo e uma em São Paulo. Brown (1975) propôs uma refúgio na Bahia (que se estendia até Pernambuco) e outro no Rio de Janeiro.

Assim sendo, ao interpretarmos a diversidade encontrada nos dados para *D. aurita*, é necessário cautela ao afirmarmos que os refúgios do Quaternário foram importantes na diversificação desta espécie.

Os dados de diversidade genética e morfológica para *D.aurita* mostraram que esta espécie não se apresenta estruturada ao longo de toda sua distribuição na Mata Atlântica brasileira, não tendo sido encontrados indícios de isolamento por distância. A árvore filogenética, as baixas divergências morfológicas e moleculares e as análises de tamanho demográfico ao longo do tempo nos dão indício de que é uma população recente que passou por um evento de expansão populacional há pouco tempo, o que estaria de acordo com a hipótese de Refúgios. Porém, o evento de expansão foi datado há cerca de 50 mil anos, o que não é concordante com as previsões desta hipótese. Além disso, os animais aqui apresentados não mostraram maior divergência e variação nas áreas ditas estáveis ao longo da última era glacial como o esperado nesta hipótese. Ademais, os resultados das simulações mostraram que analisar a história demográfica desta espécie baseada nestas estatísticas descritivas e testes de neutralidade não consideram eventos como fragmentação em outros refúgios que podem ter influenciado na história da espécie. Desta forma, é necessário avaliar se esta expansão demográfica realmente deve-se à dinâmica climática do Quaternário e, avaliar se estes outros eventos como fragmentação passada podem ter influenciado a história desta espécie.

Referências Bibliográficas

- Aleixo, A. (2004). Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*. 58(6):1303-17.
- Astúa de Moraes, D.(2004) *Evolução morfológica do crânio e elementos pós-cranianos dos marsupiais americanos (Didelphimorphia, Paucituberculata, Microbiotheria)*. Tese de Doutorado- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. Vol. I. 258p.
- Astúa de Moraes, D; Santori, RT; Finotti, R & Cerqueira, R.(2003) *Nutritional and fiber contents of laboratory-established diets of Neotropical opossums (Didelphidae)*, In Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials. Jones ME; Dickman CR & Archer M (eds.) CSIRO Publishing, Collingwood. p.221-237.
- Atlas Climatológico do Brasil. (1969). Ministério da Agricultura, Escritório de planejamento e controle, escritório de meteorologia. Mapa nº44.
- Behling, H. (1998). Late Quaternary vegetational and climate changes in Brazil. *Rev. Paleobot. Palyn.* 99: 143-156.
- Behling, H. ; Dupont, L ; Safford, H D ; Wefer, G .(2007). Late Quaternary vegetation and climate dynamics in the Serra da Bocaina, southeastern Brazil. *Quaternary International*, v. 161, p. 22-31
- Brown, KS (1975). Geographical patterns of evolution in neotropical Lepidoptera. Systematics and derivation of known and new Heliconiini (Nymphalidae, Nymphalinae). *Jornal of Entomology (B)* 44:201-242.
- Cabanne, GS; Santos, FR; Miyaki, CY. (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of Linnean Society* .91 : 73-84.
- Cabanne, GS; d'Horta, FM; Sari, EHR; Santos, FR; Miyaki, CY. (2008). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49:760-773.
- Cáceres, NC. (2003). Use of the space by the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* (Impresso), v. 20, n. 2, p. 315-322.
- Cáceres, NC & Monteiro-Filho ELA .(2001). Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna & Environment*, Lisse, 36: 85-92.
- Carnaval, A.C., Moritz, C., (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* 35, 1187–1201.
- Carnaval, AC; Hickerson, MJ; Haddad, CFB; Rodrigues, MT; Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*. 323: 785-789.

- Cerqueira, R. (1982). South American landscapes and their mammals. Em: M.A. Mares & H.H. Genoways (Eds.) - *Mammalian biology in South America*. Special Publ. Series Pymatuning Laboratory of Ecology 6, Pittsburgh, 539pp
- _____. (1985). The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). *Journal of Biogeography* 12: 135-145.
- Cheverud, J.M. 1982. Phenotypic, genetic and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution* 36(3):499-516.
- _____. (1988). A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution* 42:958-968.
- _____. (1995). Morphological integration in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) cranium. *Am. Nat.* 145:63-89.
- Dinerstein, E; Olson, DM; Graham, PJ; Webster, AL; Primm, SA; Bookbinder, MP & Ledec, G. (1995). A conservation assesment of the terrestrial ecoregions of latin America and the Caribbean. *The World Bank, Washington D.C., USA*.
- Diva-GIS. Disponível em< <http://www.diva-gis.org/>> acessado em 15 de dezembro de 2010.
- Drummond A.J.; Rambaut A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Drummond, A. J.; Nicholls, G. K.; Rodrigo, A. G.; Solomon, W. (2002). Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161:1307-1320.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B & Pybus OG (2005) Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences *Mol Biol Evol* 22, 1185-1192.
- Drummond, AJ; Ho, SYW; Rawlence, N; Rambaut,A.(2007). A rough guide to Beast 1.4. Disponível em http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page , acessado em 03 de fevereiro de 2011.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J.(1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13(4), 853-864. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02004.x.
- Francisco, M R ; Gibbs, HL ; Lunardi, V. ; Galetti Jr., P M ; Galetti, M. (2007). Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 4908-4918.
- Fu, YX. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915-925.

- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (1993). Recursos naturais e meio ambiente: Uma visão do Brasil. *Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro*.
- Geise, L; Smith, MF; Patton, JL. (2001). Diversification in the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in Southeastern South America : Mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy*. 82(1):92-101.
- Gentile, R & R. Cerqueira. (1995). Movement patterns of five species of small mammals in a Brazilian restinga. *Journal of Tropical Ecology* 11: 671-677.
- Grazziotin, FG; Monzel, M; Echeverrigaray, S; Bonatto, SL. (2006). Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes : Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology*. 15, 3969– 3982.
- Haffer, J.(1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137
- _____. (1993). Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. *Biogeography*. 69:15-45.
- Hare, MP. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(12), 700-706.
- Heled, J & Drummond AJ.(2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1):289.
- Kingman, J. F. C. (1982). The coalescent. *Stochastic Processes and Their Applications*. 13:235-248.
- Kinzey, W. G. (1982). Distribution of primates and forest refuges.Em: *Biological Diversification in the Tropics*, G. T. Prance (ed.),pp. 455-482. Columbia University Press, New York.
- Knowles, L.L. (2001). Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of *explicit* refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology* 10:691-701.
- Lara, MC; Patton, JL. (2000). Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia : Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal Linnean Society*. 130, 661–686
- Lara, MC; Geise, L; Schneider, CJ . (2005). Diversification of small mammals in the Atlantic forest of Brazil: testing the alternatives. *UC Publ. Zool*. 133, 311–334
- Laval, G.; Excoffier, L. (2004) SIMCOAL 2.0: a program to simulate genomic diversity over large recombining regions in a subdivided population with a complex history . *Bioinformatics*. 20 (15)2485-2487.
- Lawrence, WF. (2009) Conserving the hottest of the hotspots. *Biological conservation*.142(6)1137.
- Ledru, MP; Mourguiart, P; Riccomini, C.(2009). Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*.271:140-152.
- Leite, Y.(2003). Evolution and systematics of the Atlantic Tree Rats, Genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae), with description of two new species. *Tese de doutorado- University of California. Berkeley*. Vol.132.

- Librado, P.; Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451-1452.
- Loretto, D. e Vieira, M.V. (2005). The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). *Journal of Mammalogy* 86:287-293.
- Marroig, G & Cerqueira, R. (1997). Plio-Pleistocene South American history and the Amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology* . 2(2): 103-118.
- Martins, FM; Ditchfield, AD; Meyer, D; Morgante, JS.(2007). Mitochondrial DNA reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) *Journal of Zool Syst Evol Research*. 45(4): 372-378.
- Müller, P. (1973). The dispersal Centers of terrestrial vertebrates in the neotropical realm. The Hague.
- Myers N; Mittermeier, RA; Mittermeier , CG; Fonseca, GAB; Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- NGA GEOnet Names Server (GNS).National geospatial –intelligence agency. **Disponível em <http://earth-info.nga.mil/gns/html/>**. Acessado em 15 de Dezembro de 2010.
- Oliveira, MAT; Behling, H; Pessenda, LCR.(2008). Late-Pleistocene and mid-Holocene environmental changes in highland valley head areas of Santa Catarina state, Southern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 26:55-67.
- Pardini, R, Marques de Souza, S., Braga-Neto, R., Metzger, JP. (2005). The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biological conservation*.124(2)253-266.
- Pellegrino, KCM; Rodrigues, MT; Waite, AN; Morando, M; Yassuda, YY; Sites, JW. (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 13–26.
- Pessenda, LCR; Oliveira, PE; Mofatto, M; Medeiros, VB; Garcia, RJF; Aravena,R; Bendassoli, JA; Leite, AZ; Saad, AR; Etchebehere, ML. (2009). The evolution of a tropical rainforest/grassland mosaic in southeastern Brazil since 28,000 14C yr BP based on carbon isotopes and pollen records. *Quaternary Research* .
- Pires, AL, Lira, PK, Fernandez, FAS, Schittini, GM, Oliveira, LC. (2002). Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biological conservation*. 108:229-237.
- Rambaut A.; Drummond A.J. (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2092-100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446801>.
- Ribeiro M C, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142(6): 1141-1153.

- Rosenberg, NA; Nordborg, M. (2002). Genealogical trees, coalescent theory, and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380-390.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by Dna polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Tamura K.; Dudley J.; Nei M.; Kumar S. (2007) *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tchaika, L; Eizirik, E; Oliveira, TG; Cândido-JR, JF; Freitas, TRO.(2007). Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology* 16: 819-839.
- Tyndale-Biscoe, C.H. & Mackenzie RB. (1976). Reproduction of *Didelphis marsupialis* and *D. Albiventris* in Colombia. *Journal of Mammalogy*, 57 : 249-265.
- Vanzolini, PE & Williams, EE. (1970). South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia (São Paulo)* 19: 1-298.
- Wakeley J.(2008). Coalescent Theory: An Introduction. New York: Roberts and Company Publishers
- WorldClim* - Global Climate Data. Disponível em <http://www.worldclim.org/> acessado em 15 de Dezembro de 2010.

Capítulo 5

Considerações Finais

Os dois capítulos finais apresentados aqui são complementares no entendimento da história dos gambás-de-orelhas-pretas. Cada capítulo trata de um estágio da história deste grupo e reflete os processos afetando a floresta a qual esta espécie habita. O capítulo 3 mostrou que, o que anteriormente acreditava-se ser uma única espécie habitando a Floresta Atlântica, são provavelmente duas, sendo uma distribuída no Nordeste da Mata Atlântica (estados de Alagoas e Pernambuco, ao norte do Rio São Francisco) e outra no restante da distribuição (sul e sudeste do Brasil). Os dados que mostraram esta divergência foram tanto dados derivados de três marcadores moleculares diferentes quanto morfometria craniana. Vale ressaltar que apenas três crânios de indivíduos do Nordeste foram utilizados nestas amostras. No entanto, não foi possível esclarecer qual o relacionamento desta espécie do Nordeste com as duas espécies reconhecidas de gambás-de-orelhas-pretas: *D. marsupialis* e *D. aurita*. Foi demonstrado ainda, que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre estas espécies. Uma vez que a divergência destas espécies é recente, datando do período Pleistoceno (600.000- 800.000 anos), e por serem espécies florestais, foi sugerido que a dinâmica climática do Quaternário deve ter tido um importante papel na diversificação destas espécies. O capítulo 4 explora a história de *D. aurita* (agora utilizando apenas a distribuição sul e sudeste, isto é retirando-se os indivíduos do Nordeste), usando também dados de morfometria craniana e de marcadores moleculares. Vemos que esta espécie não apresenta indícios de estruturação ou isolamento por distância ao longo de toda a sua distribuição. Isto aliado a testes de neutralidade e análises que mostram o tamanho populacional efetivo ao longo do tempo, mostraram que esta população passou por um evento de expansão demográfica recente. Isso dá respaldo à Hipótese de Refúgios, que prevê um evento de

expansão depois do último glacial. No entanto, a data estimada para este evento de expansão foi há cerca de 50 mil anos, o que é contrário a esta hipótese, uma vez que nesta época, a era glacial ainda não havia terminado (na verdade, o máximo glacial ocorreu há 20 mil anos). Além disso, dados de simulação não mostraram diferenças na diversidade genética dos animais habitando áreas que permaneceram florestais ao longo do último período glacial, com animais habitando áreas que no último glacial foram savanas. Ademais, dados provenientes de outras simulações mostraram ainda, que eventos tais como fragmentação no passado, além de não serem detectados pelos métodos usuais (estatísticas descritivas e testes de neutralidade), tornam não evidentes os efeitos de possíveis expansões demográficas. Desta forma, não é possível afirmar que a Hipótese de Refúgios foi responsável pela diversidade genética e morfológica observada nesta espécie e outros testes que incorporem os efeitos de múltiplos refúgios na história demográfica desta espécie são necessários.

Temos portanto, padrões contrastantes do papel dos períodos glaciais neste grupo. Primeiramente foi mostrado que a dinâmica climática do Quaternário deve ter sido fundamental na diversificação destas três espécies (*D. aurita*, *D. marsupialis* e grupo do Nordeste), porém não há indícios de que estas mudanças climáticas tenham sido importante na geração da diversidade dentro da espécie *D. aurita*.

A história evolutiva dos animais é altamente influenciada pela história do ambiente em que estes vivem. A floresta Atlântica é uma das mais biodiversas do mundo, e a segunda maior na região Neotropical. A história biogeográfica desta floresta é complexa, sendo que inúmeros fatores devem ter contribuído para a diversificação de sua biota. Esta dissertação estudou os padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita*, uma espécie de marsupial didelídeo, endêmico desta floresta, a fim de esclarecer eventos biogeográficos que tenham desempenhado um papel importante na história da floresta. A distribuição desta espécie é concordante com a distribuição da floresta, do norte do Rio Grande do Norte ao sul do Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram que existe uma população muito divergente na porção nordeste desta distribuição (estados de Alagoas e Pernambuco), sendo que o grau de divergência tanto molecular quanto morfológica é um indicativo de que se trata de outra espécie. Além disso, os dados apontam que há pouco ou nenhum fluxo gênico entre as duas espécies. O relacionamento deste grupo do Nordeste com a espécie *D. aurita* e sua espécie irmã *D. marsupialis*, não pôde ser solucionado. No entanto, o evento de separação foi datado entre 800-500 mil anos, no período Quaternário. Uma vez que a Mata Atlântica e Floresta Amazônica sofreram vários eventos de expansão e retração nesta época, sugeriu-se que a dinâmica climática do Quaternário tenha desempenhado um importante papel na divergência deste grupo. Além disso, *D. aurita* (excluindo-se a população do Nordeste) foi estudado a fim de testar as previsões da hipótese de Refúgios nesta floresta para este grupo. Os padrões de diversidade genética e morfológica dentro deste grupo foram concordante com várias das premissas da Hipótese de Refúgios, porém ao datar-se o evento de expansão, este, é mais antigo do que o previsto para a hipótese. Não obstante, dados de simulação mostraram que testes de refúgios baseados nestas premissas simplistas, podem não ser aplicáveis a história da Mata Atlântica. Desta forma, embora haja indícios de que a Hipótese de Refúgios tenha sido importante para a diversidade deste grupo, é necessário avaliar se esta expansão demográfica realmente deve-se a dinâmica climática do Quaternário e, portanto, avaliar se a diversidade encontrada nesta população pode ser explicada pela hipótese de Refúgios.

The evolutionary history of animals is highly influenced by the history of the environment where these animals live. The Atlantic rainforest is one of the most diverse in the world, and the second largest forest in the Neotropics. The biogeographical history of this forest is complex, and numerous factors might have played a role in the diversification of the biota. This dissertation has studied the patterns of distribution of the genetics and morphological variation in *Didelphis aurita*, a Didelphidae marsupial, endemic from this forest. This study aims to clarify the biogeographical events that have been important in the diversification of the Atlantic biota. *D. aurita* distribution is concordant with the forest distribution, going from the north of Rio Grande do Norte state to the south of Rio Grande do Sul state. The results have showed a very diverging population in the northeast distribution (Alagoas and Pernambuco states), and both molecular and morphological divergences indicate that it might be a different species. Moreover, both species might have very low or none gene flow between them. The phylogenetic relationship between this population with the other two species (*D. aurita* and *D. marsupialis*), cannot be solved. Even so, the separation event has been dated about 500-800 hundreds years ago, in the Quaternary period. Seeing that both Neotropical forests (Atlantic and Amazonian forests) have experienced several expansions and retractions events in this period, it has been suggested that the climatic dynamics of this period might have played a key role in the divergence of the three species. Moreover, *D. aurita* (excluding the Northeast population) has been studied with the purpose of testing the Refugee hypothesis in this forest. The genetic and morphological and molecular variations patterns are in agreement with several of this Hypothesis premises. However, the dating of the expansion event is not in agreement with the hypothesis, once it's much older than expected. Moreover, simulated data showed that this Refugee tests based in such simplistic assumptions might not be applicable to the history of the Atlantic forest. In this way, even though there are evidences supporting that the Quaternary climate oscillations have been important for this group, it is necessary to evaluate if this demographic expansion is really due to the cyclic glaciations events, and hence evaluate the roll of the Refugee hypothesis for this population.

Anexo 1: Amostras moleculares

Lista das amostras utilizadas nas análises moleculares com suas respectivas coordenadas geográficas e os marcadores para as quais foram sequenciadas. As amostras seguidas de * são as provenientes do Genbank e as com ** são as que foram cedidas pelo Prof. James Patton. Todas as amostras de Citb restantes foram sequenciadas pela aluna Leila Shirai, menos as sinalizadas com *** produzidas para esta dissertação. GF= Guiana Francesa, MEX= México; GUI= Guiana, PN= Panamá; CR= Costa Rica, USA= Estados Unidos e EQ= Equador

ID	Gênero	Espécie	Localidade	Estado	S	CitB	βfib	G6PD	Lat	Long
LPC 210	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Andaraí	BA			x		-12.8	-41.26
CD179	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Lençóis	BA	M	x		x	-12.55	-41.38
YL 206	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Salvador	BA	M	x			-12.6	-38.4
LPC 272	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Crato	CE	F	x	x		-7.28	-39.45
LPC 280	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Crato	CE			x		-7.28	-39.45
LPC 281	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Crato	CE	M	x	x	x	-7.28	-39.45
LPC 360**	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Nova Ponte	CE			x		-19.12	-47.73
AJ487004*	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Petit Saut	GF		x			4.8	-53.25
LG 460	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Itinga	MG	F			x	-16.57	-41.78
LG 484**	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Joaíma	MG	F			x	-16.72	-41.23
CO 55	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Lavras	MG			x	x	-21.23	-45
CD 216	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Lençóis	MG	F	x		x	-12.55	-41.38
DAM 115	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	PN Serra das Confusões	PI	M	x		x	-9	-43.5
DAM 117	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	PN Serra das Confusões	PI	M	x		x	-9	-43.5
MAM 236	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Foz do Iguaçu	PR			x		-25.42	-54.53
MAM 237	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Foz do Iguaçu	PR		x	x		-25.42	-54.53
DAU34667*	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	Aragua, Venezuela	VE		x			10.35	-67.67
BC 40	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Campo Alegre	AL	M		x	x	-9.8	-36.35
DAM 136***	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Ibateguara	AL	F	x	x	x	-8.98	-35.87
DAM 138	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Ibateguara	AL	M	x	x	x	-8.98	-35.87
DAM 152	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Ibateguara	AL	M	x	x	x	-8.98	-35.87
BC 26	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Murici	AL	F		x	x	-9.32	-35.93
BC 32	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Murici	AL	F		x	x	-9.32	-35.93
EDH29**	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Itabuna	BA	M	x			-14.92	-39.23
ML 106	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Itabuna	BA	F	x	x		-14.92	-39.23
VF 20	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Una	BA		x			-15.28	-39.07
LGA984	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Domingos Martins	ES	F	x	x	x	-20.4	-40.63
LGA985	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Domingos Martins	ES	M	x			-20.4	-40.63
LGA986	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Domingos Martins	ES	F	x		x	-20.4	-40.63
EDH39**	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	M	x			-19.93	-40.6
LGA 142	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	M	x		x	-19.93	-40.6
LGA 92	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	M	x	x	x	-19.93	-40.6
LGA184	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	F	x	x	x	-19.93	-40.6
ML119	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	F	x			-19.83	-40.37
ML123	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Santa Tereza	ES	M	x			-19.93	-40.6
LGA1016	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Vitória	ES	F	x		x	-20.32	-40.35
LGA1022	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Vitória	ES	F	x	x	x	-20.32	-40.35
LGA1024	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Vitória	ES	M	x	x	x	-20.32	-40.35
LGA1026	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Vitória	ES	M	x	x	x	-20.32	-40.35
LGA1027	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Vitória	ES	F	x		x	-20.32	-40.35
CO 11	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	Lavras	MG			x	x	-21.23	-45

FMA 01***	<i>Didelphis aurita</i>	Igarassú	PE	F	x		x	-7.83	-34.9
FMA 09***	<i>Didelphis aurita</i>	Igarassú	PE	M	x	x		-7.83	-34.9
FMA 12***	<i>Didelphis aurita</i>	Igarassú	PE	F	x		x	-7.83	-34.9
FMA 15***	<i>Didelphis aurita</i>	Igarassú	PE	F	x	x		-7.83	-34.9
PHA 16	<i>Didelphis aurita</i>	Jaqueira	PE	F		x		-8.73	-35.82
PHA 240***	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	F	x	x	x	-7.9	-35.17
PHA 241	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	M		x	x	-7.9	-35.17
PHA 242	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	F		x	x	-7.9	-35.17
PHA 243***	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	F	x	x	x	-7.9	-35.17
PHA 245	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	M		x	x	-7.9	-35.17
PHA 247	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	M		x	x	-7.9	-35.17
PHA 248***	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	F	x	x	x	-7.9	-35.17
PHA 249	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	F		x	x	-7.9	-35.17
PHA 250	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	M		x	x	-7.9	-35.17
PHA 253***	<i>Didelphis aurita</i>	Paudalho	PE	M	x	x	x	-7.9	-35.17
PHA 506***	<i>Didelphis aurita</i>	Paulista	PE	M	x	x	x	-7.95	-34.88
PHA 70	<i>Didelphis aurita</i>	Paulista	PE	M			x	-7.95	-34.88
PHA 310***	<i>Didelphis aurita</i>	Rio Formoso	PE	M	x	x	x	-8.67	-35.15
PHA 313***	<i>Didelphis aurita</i>	Rio Formoso	PE	F	x	x	x	-8.67	-35.15
PHA 319***	<i>Didelphis aurita</i>	Rio Formoso	PE	F	x	x	x	-8.67	-35.15
PHA 321***	<i>Didelphis aurita</i>	Rio Formoso	PE	M	x	x	x	-8.67	-35.15
PHA 330***	<i>Didelphis aurita</i>	Rio Formoso	PE	M	x	x	x	-8.67	-35.15
LPC 864	<i>Didelphis aurita</i>	Foz de Iguaçu	PR	M	x		x	-25.63	-54.46
LPC 865	<i>Didelphis aurita</i>	Foz de Iguaçu	PR	M		x	x	-25.63	-54.46
MAM 234	<i>Didelphis aurita</i>	Morretes	PR	M	x			-25.9	-48.57
IIM-010	<i>Didelphis aurita</i>	Pinhalão	PR	F	x		x	-23.78	-50.05
IIM-012	<i>Didelphis aurita</i>	Pinhalão	PR	F	x		x	-23.78	-50.05
IIM-030	<i>Didelphis aurita</i>	Pinhalão	PR	M	x		x	-23.78	-50.05
IIM-257	<i>Didelphis aurita</i>	Wenceslau Brás	PR	F	x	x	x	-23.87	-49.8
IIM-258	<i>Didelphis aurita</i>	Wenceslau Brás	PR	F	x	x	x	-23.87	-49.8
IG 21	<i>Didelphis aurita</i>	Angra dos Reis	RJ			x		-23.18	-44.18
LGP 43	<i>Didelphis aurita</i>	Angra dos Reis	RJ	M		x	x	-23.18	-44.18
FS 11-01	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-04	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-08	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x		-22.53	-42.86
FS 11-10	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x			-22.53	-42.86
FS 11-13	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-15	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-17	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-18	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x		-22.53	-42.86
FS 11-21	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x			-22.53	-42.86
FS 11-35	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x		-22.53	-42.86
FS 11-43	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-44	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-45	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x		-22.53	-42.86
FS 11-48	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-50	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x			-22.53	-42.86
FS 11-74	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-77	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-78	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 11-79	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x			-22.53	-42.86
FS 11-81	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-85	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 11-86	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M		x	x	-22.53	-42.86
FS 11-88	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86

FS 12-07	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 12-19	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M		x		-22.53	-42.86
FS 12-20	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 12-27	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x			-22.53	-42.86
FS 12-47	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 12-48	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 14-01	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 14-04	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x		x	-22.53	-42.86
FS 14-07	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x		-22.53	-42.86
FS 14-09	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x			-22.53	-42.86
FS 14-10	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 14-16	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 14-19	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M		x		-22.53	-42.86
FS 15-17	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x		-22.53	-42.86
FS 15-18	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x		x	-22.53	-42.86
FS 15-20	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 15-24	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 15-28	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 16-17	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F		x	x	-22.53	-42.86
FS 16-18	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 16-21	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F	x	x	x	-22.53	-42.86
FS 16-26	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F		x		-22.53	-42.86
FS 16-31	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F		x		-22.53	-42.86
FS 16-32	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M	x	x		-22.53	-42.86
FS11-07	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	M		x		-22.53	-42.86
FS11-09	<i>Didelphis aurita</i>	Cachoeiras de Macacu	RJ	F			x	-22.53	-42.86
SOB 10	<i>Didelphis aurita</i>	Guapimirim	RJ	F	x	x	x	-22.45	-42.98
IG 25	<i>Didelphis aurita</i>	Ilha Grande	RJ		x	x		-23.15	-44.23
LG 167	<i>Didelphis aurita</i>	Paraty	RJ	F	x		x	-23.32	-44.7
PSP 56	<i>Didelphis aurita</i>	São Fco de Itabapoana	RJ	M	x			-21.4	-41.07
SC 330	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	M		x		-27.58	-48.57
SC 336	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	F		x	x	-27.58	-48.57
SC 350	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	F		x		-27.58	-48.57
SC 353	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	M		x		-27.58	-48.57
SC 354	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	M	x	x	x	-27.58	-48.57
SC 355	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	F		x	x	-27.58	-48.57
SC 356	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	M		x		-27.58	-48.57
SC 357	<i>Didelphis aurita</i>	Florianópolis	SC	M		x	x	-27.58	-48.57
ITM 471	<i>Didelphis aurita</i>	Buri	SP	F	x	x	x	-23.8	-48.58
ITM 477	<i>Didelphis aurita</i>	Buri	SP	M	x		x	-23.8	-48.58
B 109	<i>Didelphis aurita</i>	Capão Bonito	SP			x		-24.04	-48.31
RG 1313	<i>Didelphis aurita</i>	Capão Bonito	SP	F			x	-24.04	-48.31
RG 1927	<i>Didelphis aurita</i>	Capão Bonito	SP	M			x	-24.04	-48.31
RG 1933	<i>Didelphis aurita</i>	Capão Bonito	SP	F		x	x	-24.04	-48.31
LTS 001	<i>Didelphis aurita</i>	Caucaia do Alto/Ibiúna	SP	F	x			-23.68	-47.03
B 110	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	M			x	-23.62	-46.93
B 142	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F			x	-23.62	-46.93
B 2	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F			x	-23.62	-46.93
B 370	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	x	-23.62	-46.93
B 405	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	M			x	-23.62	-46.93
B 416	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F			x	-23.62	-46.93
B 503	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F			x	-23.62	-46.93
B 57	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	M		x	x	-23.62	-46.93
B 62	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x		-23.62	-46.93
B 620	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	x	-23.62	-46.93

B 677	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	-23.62	-46.93
B 704	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	-23.62	-46.93
B 755	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	M		x	-23.62	-46.93
B 781	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	-23.62	-46.93
B 794	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	-23.62	-46.93
B 85	<i>Didelphis aurita</i>	Cotia	SP	F		x	-23.62	-46.93
TAP 1735	<i>Didelphis aurita</i>	Piedade	SP	M		x	-23.84	-47.45
TAP 2109	<i>Didelphis aurita</i>	Piedade	SP	F?		x	-23.84	-47.45
TAP 2115	<i>Didelphis aurita</i>	Piedade	SP	F?		x	-23.84	-47.45
AB31	<i>Didelphis aurita</i>	Ribeirão Grande	SP	F	x	x	-24.09	-48.35
RG 1360	<i>Didelphis aurita</i>	Ribeirão Grande	SP	M		x	-24.09	-48.35
RG 1485	<i>Didelphis aurita</i>	Ribeirão Grande	SP	F		x	-24.09	-48.35
RG 1910	<i>Didelphis aurita</i>	Ribeirão Grande	SP	F		x	-24.09	-48.35
MAM 238	<i>Didelphis aurita</i>	Sete Barras	SP	F	x		-24.22	-48.08
MAM 239	<i>Didelphis aurita</i>	Sete Barras	SP	F	x		-24.22	-48.08
LPC 806	<i>Didelphis aurita</i>	Sorocaba	SP	M	x	x	-23.44	-47.63
LPC 807	<i>Didelphis aurita</i>	Sorocaba	SP	M	x	x	-23.44	-47.63
LN233	<i>Didelphis aurita</i>	Tapiraí	SP	F		x	-23.91	-47.48
LN329	<i>Didelphis aurita</i>	Tapiraí	SP	F		x	-23.91	-47.48
TAP 1715	<i>Didelphis aurita</i>	Tapiraí	SP	F		x	-23.91	-47.48
PSP 27	<i>Didelphis aurita</i>	Ubatuba	SP	M	x		-23.43	-45.07
DMU34665*	<i>Didelphis marsupialis</i>	Porongaba	AC		x		-8.67	-72.78
MNFS1160**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Porongaba	AC		x		-8.67	-72.78
MNFS1182**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Porongaba	AC		x		-8.67	-72.78
VCSV69**	<i>Didelphis marsupialis</i>	PN Pico da Neblina	AM		x		0.61	-66.09
JLP15751**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Barro Vermelho	AM		x		-6.47	-68.77
JUR467**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colocação Vira-Volta	AM		x		-3.28	-66.23
JUR468**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Ilhazinha	AM		x		-3.28	-66.23
VCSV70**	<i>Didelphis marsupialis</i>	PN Pico da Neblina	AM		x		0.61	-66.09
JLP15654**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Seringal Condor	AM		x		-6.75	-70.85
FAR75**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Monteverde, Puntarenas	CR		x		-5.35	-49.12
F37201**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Pompeya Sur, Napo	EQ		x		-0.67	-76.4
F37381**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Pompeya Sur, Napo	EQr		x		-0.67	-76.4
FN35021**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Baramita, Barima-Waini	GUI		x		7.37	-60.48
FN35048**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Baramita, Barima-Waini	GUI		x		7.37	-60.48
FN34599**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Mappena Creek	GUI		x		5.38	-57.37
FN30222**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Chekubul, Campeche	MEX		x		18.85	-90.97
FN29211**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Constitución, Campeche	MEX		x		18.68	-90.13
FN32731**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Escarcega, Campeche	MEX		x		18.62	-90.72
FN33112**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Frontera Comalapa, Chiapas	MEX		x		15.65	-92.13
FN30003**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Jonuta, Tabasco	MEX		x		18.08	-92.13
FN32627**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Kohunlich, Quintana Roo	MEX		x		18.43	-88.8
FN30669**	<i>Didelphis marsupialis</i>	X-Kanha, Campeche	MEX		x		19.1	-89.33
FN30864**	<i>Didelphis marsupialis</i>	El Refugio, Campeche	MEX		x		18.31	-89.37
CS1**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Marabá	PA		x		-5.8	-50.52
FMG2634**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Isla Popa, Bocas del Toro	PN		x		9.18	-82.12
FMG2678**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Isla Popa, Bocas del Toro	PN		x		9.18	-82.12
FMG2573**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Punta Alegre	PN		x		9.08	-81.85
F38187**	<i>Didelphis marsupialis</i>	Santa Clara, Chiriqui	PN		x		-5.35	-49.12
ESTR 1583	<i>Didelphis marsupialis</i>	Palmeirante	TO		x	x	-7.8	-47.8
FN32516**	<i>Didelphis virginiana</i>	Walsingham, Ontario	CAN		x			
FN33111**	<i>Didelphis virginiana</i>	Chiapas	MEX		x			
ASK2590**	<i>Didelphis virginiana</i>	Constitución, Campeche	MEX		x			
FN30774**	<i>Didelphis virginiana</i>	El Refugio, Campeche	MEX		x			

FN32626**	<i>Didelphis</i>	<i>virginiana</i>	Kohunlich, Quintana Roo	MEX	x
FN30300**	<i>Didelphis</i>	<i>virginiana</i>	Labna, Yucatán	MEX	x
ASK2367**	<i>Didelphis</i>	<i>virginiana</i>	San Angelo, Texas	USA	x
Z29573 *	<i>Didelphis</i>	<i>virginiana</i>	Berkeley		x
HM222715.1*	<i>Didelphis</i>	<i>virginiana</i>			x
AJ487009*	<i>Philander</i>	<i>opossum</i>	Trinité	GF	x
AJ628367.1*	<i>Philander</i>	<i>opossum</i>	Trinité	GF	x
POU34678*	<i>Philander</i>	<i>opossum</i>	Flora, Rio Juruá	RJ	x
POU34679*	<i>Philander</i>	<i>frenatus</i>	Majé, Garrafão	RJ	x

Anexo 2: Protocolos de Extração de DNA

Extração salina (baseado em Aljanabi & Martinez 1997)

Soluções:

Tampão salino (para 100ml)

- NaCl 0,4M – 6,7ml de NaCl 6M
- Tris-HCl 10mM pH 8,0 - 1ml de Tris-HCl 1M pH 8,0
- EDTA 2mM pH 8,0 - 400µl de EDTA 0,5M pH8,0
- 91,9 ml de água destilada

SDS 20%

Proteinase K [10mg/ml]

NaCl 6M

Isopropanol

Etanol 70%

RNase [10mg/ml]

T.E.

Extração de DNA a partir de amostras de tecido:

- Retirar em torno de 10mg de tecido;
- Homogeneizar bem a amostra em 400µl de tampão salino em um tubo de 1,5ml com pinça;
- Adicionar 40µl de SDS 20% e 8µl de proteinase K 10mg/ml e misturar bem;
- Incubar a 65°C por pelo menos 1h ou por pernoite;
- Adicionar 10µl de RNase 10mg/ml e deixar por 1h a 37 °C;
- Adicionar 300µl de NaCl 6M e levar ao vortex por 1 minuto;
- Centrifugar por 30 minutos a 10.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para tubos limpos de 1,5ml;
- Adicionar o dobro do volume de isopropanol e misturar bem;

- Incubar a -20°C por pelo menos 1h ou pernoite;
- Centrifugar por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
- Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* em etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000 rpm;
- Secar o *pellet* e ressuspender em TE. Incubar a 4°C *overnight*. No dia seguinte, guardar a 20°C.

Extração fenol-clorofórmio-isoamílico (Sambrook et al, 1989)

Digestão:

- 300µl TNE 1X
 - 30µl Tris/HCl 1M
 - 8µl SDS 20%
 - 20µl de proteinase K
 - 2-3 mm³ de material
- Incuba-se o material a 55°C por pernoite
 - Adicionar 400µl de Fenol:Clorofórmio:Isoamílico 25:24:1
 - Centrifugar a velocidade de 14000 rpm por 30 minutos
 - transferir o sobrenadante sem perturbar a fase média para outro tubo
 - Adicionar ao sobrenadante 3 volumes de etanol absoluto
 - Fechar e misturar suavemente
 - Centrifugar a velocidade de 14000 rpm por 15 minutos
 - Retirar sobrenadante
 - Adicionar 300 µl de etanol 70%
 - Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm
 - Retirar sobrenadante
 - Secar em estufa e diluir com 50-200 µl de TE

Anexo 3: Sequências dos iniciadores

β -fibrinogênio

Forward 5'-ACC CCA GTA GTA TCT GCC GTT TGG ATT-3'

Reverse 5'-CAC AAC GGC ATG TTC TTC AGC AC-3'

G6PD

Para PCR

G6PD- *fwd* 5' GAG CCA CCT CCT TTC AGC GTC TC 3'

G6Pd-*rev* 5' TCA GAG TTG GTG GAG GCA GGT TT 3'

G6PD-*fwdn* 5' CAC ATG AAC TCC CTG CAC CAT GG 3'

G6PD-*revn* 5' AGG AGG TGG TTC TGC ATC ACG TC 3'

Para Sequenciamento

G6PD-*int-fwd* 5'AAC CGG ATC ATT GTG G 3'

Citocromo b

MVZ 05 5' CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G3'

MVZ 14 3' GGT CTT CAT CTY HGG YTT ACA AGA C 5'

Anexo 4: Amostras morfológicas

Anexo 4. Lista dos crânios de *D. marsupialis* e “Nordeste” utilizados para análises com respectivos número de tombos, localidades e coordenada geográfica. Para sexo M=macho e F=fêmea, I=indeterminado.

Museu	ID	Espécie	Sexo	Localidade	Estado	Lat	Long
UFPE	FMA12	“Nordeste”	F	Igarassu	PE	-7.8	-34.9
UFPE	PHA285	“Nordeste”	M	Paulista	PE	-8.0	-34.9
Mzusp	7366	“Nordeste”	M	Sao Miguel	AL	-9.8	-36.1
Mzusp	17105	<i>marsupialis</i>		Ananindeua	PA	-1.4	-48.4
MN	1166	<i>marsupialis</i>	M	Anil	MA	-2.5	-44.2
Mzusp	16558	<i>marsupialis</i>	M	Belem	PA	-1.5	-48.5
Mzusp	21315	<i>marsupialis</i>	M	Cachoeira do Espelho	PA	-3.8	-52.5
Mzusp	10593	<i>marsupialis</i>	F	Cameta	PA	-2.3	-49.5
Mzusp	4774	<i>marsupialis</i>	M	Caxiricatuba- Rio Tapajos	PA	-2.4	-54.6
Mzusp	4779	<i>marsupialis</i>	M	Caxiricatuba- Rio Tapajos	PA	-2.4	-54.6
Mzusp	10589	<i>marsupialis</i>	M	Caxiricatuba- Rio Tapajos	PA	-2.4	-54.6
Mzusp	706	<i>marsupialis</i>	F	Chapada dos Guimares	MT	-15.4	-55.8
MN	4570	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4512	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	20955	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4505	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4532	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4565	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4510	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4533	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4514	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4502	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4503	<i>marsupialis</i>	M	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4535	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
MN	4578	<i>marsupialis</i>	F	Curralinho	PA	-0.5	-49.2
Mzusp	12871	<i>marsupialis</i>	F	Fordlandia	PA	-3.8	-55.5
Mzusp	4777	<i>marsupialis</i>	F	Itacoatiara	AM	-3.1	-58.4
Mzusp	4745	<i>marsupialis</i>	M	Lago de Serpa	AM	-3.1	-58.5
Mzusp	10579	<i>marsupialis</i>	F	Lago do Batista	AM		
Mzusp	10578	<i>marsupialis</i>	F	Lago do Batista	AM		
Mzusp	4739	<i>marsupialis</i>	M	Lago do Batista	AM		
Mzusp	10591	<i>marsupialis</i>	M	Lago Tapaiuna	AM	-3.4	-58.3
Mzusp	10588	<i>marsupialis</i>	M	Lago Tapaiuna	AM	-3.4	-58.3
Mzusp	10592	<i>marsupialis</i>	F	Lago Tapaiuna	AM	-3.4	-58.3
Mzusp	361	<i>marsupialis</i>	F	Manaus	AM	-3.1	-60.0
MN	20924	<i>marsupialis</i>	F	Manaus	AM	-3.1	-60.0
MN	30058	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30097	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30090	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30080	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4

MN	30065	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30087	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30086	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30103	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30071	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
MN	30092	<i>marsupialis</i>	I	Nova Timboteua	PA	-1.2	-47.4
Mzusp	4743	<i>marsupialis</i>	M	Pau da Letra- Rio Tapajos	PA	-3.1	-55.2
Mzusp	LTSM18	<i>marsupialis</i>	F	Rio Juruema	MT		
MN	20133	<i>marsupialis</i>	F	Rio Tracajatuba	AP	0.9	-51.0
Mzusp	17153	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17135	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17201	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17132	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17142	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17192	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17158	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17162	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17138	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17149	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17134	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17154	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
Mzusp	17150	<i>marsupialis</i>	I	Rod Belem -Brasilia K 87-94	PA		
MN	5711	<i>marsupialis</i>	M	Santarem	PA	-1.0	-47.0
MN	20087	<i>marsupialis</i>	M	Serra do Navio	AP	1.0	-52.1
Mzusp	16515	<i>marsupialis</i>	F	Serra do Navio	AP	1.0	-52.1
MN	20165	<i>marsupialis</i>	M	Serra do Navio	AP	1.0	-52.1
MN	20072	<i>marsupialis</i>	F	Serra do Navio	AP	1.0	-52.1
MN	20088	<i>marsupialis</i>	F	Serra do Navio	AP	1.0	-52.1
Mzusp	16514	<i>marsupialis</i>	F	Terezinha-Rio Amapari	AP	1.0	-52.0
Mzusp	16513	<i>marsupialis</i>	M	Terezinha-Rio Amapari	AP	1.0	-52.0
Mzusp	13475	<i>marsupialis</i>	I	Tucurui- Vila Bravo	PA	-3.7	-49.7

Anexo 4. Lista de exemplares medidos de *D. aurita* com respectivos números de tombo, sexo (sendo M= macho e F= fêmea) e localidade de coleta. Tm= temperatura média anual em graus Celsius x10. Alt= altitude de coleta em metros. Tmax= temperatura máxima do mês mais quente em graus Celsius x10, Tmin= temperatura mínima no mês mais frio em graus Celsius x10, amp= amplitude de temperatura no ano em graus Celsius x10, P_ch= precipitação média no mês mais chuvoso em milímetros, P_se= precipitação média no mês mais seco em milímetros. Grupo corresponde ao grupo classificado em C=costa e I= interior. C é o número do indivíduo no grupo costa para o teste de transecto, e em I temos o número do indivíduo no teste de transecto para o interior. Lat= latitude e Long= longitude.

Museu	ID	Sexo	Localidade	Tm	alt	Tmax	Tmin	amp	P_ch	P_se	Grupo	C	I	Lat	Long
Mzusp	3906	F	Cananeia	227	8	312	138	174	371	80	C		1	-25.0	-48.0
Mzusp	16584	F	Iporanga- Betari	219	237	309	117	192	199	52	C		2	-24.6	-48.6
Mzusp	16595	F	Porto Estrada- Rio Ipiranga	202	339	282	111	171	255	61	C		3	-24.2	-47.5
Mzusp	16596	F	Porto Estrada- Rio Ipiranga	202	339	282	111	171	255	61	C		3	-24.2	-47.5
Mzusp	9663	F	Bertioga	223	5	291	150	141	349	101	C		4	-23.9	-46.2
Mzusp	9787	F	Caraguatatuba	237	4	305	154	151	269	67	C		5	-23.6	-45.4
Mzusp	1809	F	Ubatuba	225	2	306	136	170	339	84	C		6	-23.4	-45.1
Mzusp	1871	F	Ubatuba	225	2	306	136	170	339	84	C		6	-23.4	-45.1
MN	24443	F	Ubatuba	225	2	306	136	170	339	84	C		6	-23.4	-45.1
MN	72771	F	Rua Cosme Velho, Humaita, Rio de Janeiro	222	239	304	130	174	259	51	C		7	-23.0	-44.6
MN	43966	F	Manbucaba- Angra dos Reis	233	7	308	165	143	259	67	C		8	-23.0	-44.3
MN	3858	F	Mangaratiba	223	206	302	139	163	219	41	C		9	-23.0	-44.0
MN	5615	F	Rio de Janeiro Morro do Amorim- Rio de Janeiro	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	5740	F	Rio de Janeiro	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	10486	F	Rio de Janeiro	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	10490	F	Rio de Janeiro	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	10503	F	Rio de Janeiro	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	30118	F	Tijuca- Rio de Janeiro Restinga da Marambaia- Rio de Janeiro	193	700	272	108	164	251	54	C		10	-22.9	-43.3
MN	46532	F	Caxias	231	13	300	164	136	150	53	C		10	-22.9	-43.2
MN	5795	F	Caxias	231	29	307	154	153	175	44	C		11	-22.8	-43.3
MN	5812	F	Caxias	231	29	307	154	153	175	44	C		11	-22.8	-43.3
MN	5856	F	Caxias	231	29	307	154	153	175	44	C		11	-22.8	-43.3
MN	51878	F	Tingua- Nova Iguacu	233	34	318	148	170	240	47	C		12	-22.6	-43.4
MN	42795	F	Mage	230	19	310	149	161	195	43	C		13	-22.7	-43.0
MN	46509	F	Mage	230	19	310	149	161	195	43	C		13	-22.7	-43.0
MN	50370	F	Mage	230	19	310	149	161	195	43	C		13	-22.7	-43.0
MN	27827	F	Marica	233	5	306	161	145	151	49	C		14	-22.9	-42.8
MN	28903	F	Marica	233	5	306	161	145	151	49	C		14	-22.9	-42.8
MN	50612	F	Marica	233	5	306	161	145	151	49	C		14	-22.9	-42.8
MN	50626	F	Marica	233	5	306	161	145	151	49	C		14	-22.9	-42.8
MN	50628	F	Fazenda Uniao- Casimiro de Abreu	231	22	302	156	146	175	34	C		15	-22.5	-42.2

MN	50634	F	Glicerio- Macae	229	8	297	154	143	173	42	C	16	-22.4	-41.8
MN	5700	F	Alem Paraiba	230	197	321	128	193	261	18	C	17	-21.9	-42.7
Mzusp	2732	F	Teofilo Ottoni	233	329	321	144	177	201	21	C	18	-17.9	-41.5
MN	11324	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	11330	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	11426	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	11431	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	29895	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	30277	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	30286	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
MN	M22404	F	Ilheus	248	8	296	194	102	200	129	C	19	-14.8	-39.0
			Fazenda Monte											
MN	68364	F	Alegre- Telemaco	180	842	275	70	205	162	67	I	1	-23.5	-46.6
			Borba											
Mzusp	17374	F	Itaporanga-	205	546	292	99	193	176	46	I	2	-20.4	-43.4
			Bairro da Onca											
Mzusp	17375	F	Itaporanga-	205	546	292	99	193	176	46	I	2	-23.6	-46.6
			Bairro da Onca											
Mzusp	10138	F	Casa Grande-	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-19.9	-40.6
			Salesopolis											
Mzusp	12874	F	Casa Grande	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-19.9	-40.6
Mzusp	12877	F	Casa Grande	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-22.4	-43.0
Mzusp	16440	F	Casa Grande	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-22.4	-43.0
			Casa Grande-											
Mzusp	16586	F	Barragem	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-22.4	-43.0
Mzusp	17510	F	Casa Grande	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-22.1	-48.5
Mzusp	17511	F	Casa Grande	209	516	296	98	198	211	37	I	3	-23.6	-46.9
Mzusp	9649	F	Boraceia	215	430	300	108	192	220	21	i	4	-22.2	-48.8
Mzusp	9650	F	Boraceia	215	430	300	108	192	220	21	i	4	-22.2	-48.8
Mzusp	9651	F	Boraceia	215	430	300	108	192	220	21	i	4	-22.2	-48.8
Mzusp	10359	F	Boraceia	215	430	300	108	192	220	21	I	4	-23.6	-46.9
			Boraceia- Poco											
Mzusp	16572	F	Preto	215	430	300	108	192	220	21	I	4	-23.6	-46.9
Mzusp	17514	F	Boraceia	215	430	300	108	192	220	21	I	4	-23.6	-46.9
			Varjao do											
Mzusp	9644	F	Guaratuba	213	488	294	108	186	235	22	I	5	-23.6	-46.9
Mzusp	13755	F	Conchas	205	511	287	104	183	207	25	I	6	-23.6	-46.9
Mzusp	12855	F	Itapetininga	189	669	273	90	183	194	35	I	7	-23.5	-46.6
Mzusp	24820	F	Sao Roque	179	789	257	86	171	235	39	I	8	-23.5	-46.6
Mzusp	24822	F	Sao Roque	179	789	257	86	171	235	39	I	8	-23.5	-46.6
Mzusp	9647	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.6	-46.9
Mzusp	9652	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.6	-46.9
Mzusp	9653	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	9657	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-22.4	-49.9
Mzusp	9694	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	9702	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	10047	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	10052	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	16550	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	16551	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.5	-46.6
Mzusp	17619	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-22.2	-48.8
Mzusp	17621	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-23.6	-48.1

Mzusp	17622	F	Cotia	178	802	256	89	167	255	48	I	9	-22.4	-49.9
Mzusp	271	F	Sao Paulo	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.4	-49.9
Mzusp	10002	F	Sao Paulo- Zoo	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.5	-46.6
Mzusp	10022	F	Agua Funda	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.5	-46.6
Mzusp	10025	F	Sao Paulo- Zoo	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.1	-48.0
Mzusp	10058	F	Agua Funda	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.5	-46.6
Mzusp	10321	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.4	-49.9
Mzusp	10323	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.6	-46.9
Mzusp	10324	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.6	-46.9
Mzusp	10325	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.2	-48.8
Mzusp	10336	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.4	-49.9
Mzusp	10337	F	Sao Paulo- Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.7	-49.5
Mzusp	12881	F	Sao Paulo - Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-23.7	-49.5
Mzusp	12882	F	Sao Paulo - Interlagos	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.4	-49.9
Mzusp	16430	F	Sao Paulo- Agua Funda	188	729	265	103	162	223	35	I	10	-22.4	-49.9
Mzusp	3019	F	Sao Paulo (Ipiranga)	183	776	259	96	163	223	34	I	11	-22.2	-48.8
Mzusp	30667	F	Riacho Grande, Sao Bernardo do Campo	176	779	251	90	161	237	49	I	12	-23.6	-46.9
Mzusp	30768	F	Riacho Grande, Sao Bernardo do Campo	176	779	251	90	161	237	49	I	12	-23.6	-46.9
MN	7157	F	Teresopolis	184	903	267	93	174	305	40	I	13	-23.6	-46.9
MN	7164	F	Teresopolis	184	903	267	93	174	305	40	I	13	-23.5	-47.1
MN	7166	F	Teresopolis	184	903	267	93	174	305	40	I	13	-23.5	-47.1
MN	43753	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-23.7	-46.6
MN	50329	F	Porteira Verde- Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-23.7	-46.6
MN	50332	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
MN	50361	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
MN	59568	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
MN	59569	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
MN	59575	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
MN	59577	F	Sumidouro	218	366	308	119	189	273	20	I	14	-22.1	-42.7
Mzusp	2295	F	Mariana	205	724	287	101	186	255	9	I	15	-22.1	-42.7
MN	5718	F	Santa Teresa	204	783	281	124	157	207	39	I	16	-22.1	-42.7
Mzusp	6204	F	Santa Teresa	204	783	281	124	157	207	39	I	16	-24.3	-50.5
Mzusp	1680	M	Joinville	211	52	293	129	164	248	77	C	1	-26.3	-48.8
Mzusp	10631	M	Onca parda, Barra do Ribeira	227	53	314	134	180	227	51	C	2	-23.5	-46.6
Mzusp	16589	M	Porto Estrada- Rio Ipiranga	202	326	282	111	171	255	61	C	3	-22.3	-42.3
Mzusp	10053	M	Bertioga	223	7	291	150	141	349	101	C	4	-20.2	-47.5
MN	42776	M	Manbucaba- Angra dos Reis	233	48	308	165	143	259	67	C	5	-20.2	-47.5
MN	62188	M	Angra dos Reis	233	48	308	165	143	259	67	C	5	-14.8	-39.0
MN	66191	M	Angra dos Reis	233	48	308	165	143	259	67	C	5	-21.9	-42.7

MN	66197	M	Angra dos Reis	233	48	308	165	143	259	67	C	5	-21.5	-42.3
MN	3854	M	Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-21.9	-42.7
MN	3860	M	Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-21.9	-42.7
MN	3863	M	Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-23.0	-44.0
MN	5739	M	Fazenda da Lapa- Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-21.9	-42.7
MN	24935	M	Ilha de Jaguanum- Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-22.9	-44.0
MN	30276	M	Fazenda da Lapa- Mangaratiba	223	47	302	139	163	219	41	C	6	-23.0	-44.0
MN	3856	M	Sao Joao Marcos	196	553	284	91	193	242	27	C	7	-23.0	-44.0
MN	5688	M	Tijuca- Rio de Janeiro	193	713	272	108	164	251	54	C	8	-21.9	-42.7
MN	5614	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-22.9	-43.2
MN	5616	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-22.9	-43.2
MN	10483	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-21.9	-42.7
MN	10485	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-22.9	-43.3
MN	10488	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-19.9	-40.6
MN	10496	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-23.0	-44.0
MN	30262	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-21.9	-42.7
MN	33425	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-21.9	-42.7
MN	51866	M	Rio de Janeiro	231	21	300	164	136	150	53	C	9	-22.6	-43.4
MN	5811	M	Caxias	231	15	307	154	153	175	44	C	10	-22.8	-43.3
MN	5799	M	Tingua	233	66	318	148	170	240	47	C	11	-22.4	-43.0
MN	28825	M	Tingua	233	66	318	148	170	240	47	C	11	-22.4	-43.0
MN	46503	M	Mage	230	17	310	149	161	195	43	C	12	-22.4	-43.0
MN	50336	M	Mage	230	17	310	149	161	195	43	C	12	-22.4	-43.0
MN	28896	M	Marica	233	7	306	161	145	151	49	C	13	-22.4	-43.0
MN	50614	M	Marica	233	7	306	161	145	151	49	C	13	-22.4	-43.0
MN	25677	M	Ilha das Pombas- Rio das Ostras		11						C	14	-22.1	-48.5
MN	30423	M	Morro de Sao Joao- Casimiro de Abreu	231	25	302	156	146	175	34	C	15	-23.6	-46.9
MN	3850	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	3852	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	3853	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	3855	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	3865	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	5641	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	5744	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	5782	M	Alem Paraiba	230	231	321	128	193	261	18	C	16	-23.6	-46.9
MN	3851	M	Volta Grande	230	159	321	124	197	253	17	C	17	-23.6	-46.9
Mzusp	LMS002	M	Guarapari (confirmar com a ju depois)		8						C	18	-23.6	-46.9
MN	20948	M	Vila Velha		24						C	19	-23.6	-46.9
MN	23758	M	Campinho	246	24	315	182	133	183	46	C	20	-23.6	-46.9
MN	11671	M	Serra								C	21	-23.6	-46.9
MN	28925	M	Sao Mateus	241	25	314	170	144	171	51	C	22	-23.6	-46.9
Mzusp	29605	M	RPPN Serra do Teimoso- Jussari	231	408	287	170	117	129	55	C	23	-23.6	-46.9

Mzusp	3494	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-22.9	-47.1
MN	11307	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.5	-46.6
MN	11309	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.6	-46.9
MN	11323	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.6	-46.9
MN	11328	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.6	-46.9
MN	11419	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.9	-46.2
MN	11424	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.5	-45.9
MN	11430	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.5	-46.6
MN	11435	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-23.3	-48.6
MN	11445	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-22.9	-43.2
MN	11446	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-22.9	-43.2
MN	11447	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-22.9	-43.2
MN	11450	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-22.9	-43.2
MN	30227	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-24.7	-48.2
MN	30247	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30278	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30280	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30284	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30287	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30292	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30296	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	30297	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
MN	M22324	M	Ilheus	248	4	296	194	102	200	129	C	24	-14.8	-39.0
Mzusp	31381	M	Pinhalao	199	617	289	93	196	169	53	I	1	-14.8	-39.0
Mzusp	17365	M	Itaporanga-Bairro da Onca	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-14.8	-39.0
Mzusp	17932	M	Itaporanga-Bairro da Onca	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-14.8	-39.0
Mzusp	19369	M	Itaporanga-Bairro da Onca	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-20.1	-40.2
Mzusp	19374	M	Itaporanga-Bairro da Onca	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-22.2	-48.8
Mzusp	24816	M	Itaporanga	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-22.2	-48.8
Mzusp	24817	M	Itaporanga	205	509	292	99	193	176	46	I	2	-22.2	-48.8
Mzusp	10427	M	rio Tamandua, Ipiranga	202	625	289	100	189	209	34	I	3	-22.4	-49.9
Mzusp	30977	M	Buri	199	592	286	97	189	180	40	I	4	-22.2	-48.8
Mzusp	27247	M	Fazenda Intervalles	173	855	260	75	185	206	48	I	5	-23.1	-48.0
Mzusp	27249	M	Fazenda Intervalles	173	855	260	75	185	206	48	I	5	-23.1	-48.0
Mzusp	13774	M	Conchas	205	510	287	104	183	207	25	I	6	-23.5	-46.6
Mzusp	13775	M	Conchas	205	510	287	104	183	207	25	I	6	-22.4	-49.9
Mzusp	12875	M	Casa Grande	209	571	296	98	198	211	37	I	7	-22.4	-49.9
Mzusp	16438	M	Casa Grande	209	571	296	98	198	211	37	I	7	-23.4	-47.0
Mzusp	16442	M	Casa Grande	209	571	296	98	198	211	37	I	7	-23.6	-46.9
Mzusp	12856	M	Boraceia	215	450	300	108	192	220	21	I	8	-22.2	-48.8
Mzusp	12858	M	Boraceia	215	450	300	108	192	220	21	I	8	-23.4	-47.0
Mzusp	12859	M	Boraceia	215	450	300	108	192	220	21	I	8	-24.2	-47.5
Mzusp	12878	M	Boraceia	215	450	300	108	192	220	21	I	8	-23.5	-46.6
Mzusp	16576	M	Boraceia	215	450	300	108	192	220	21	I	8	-23.7	-49.5
Mzusp	9643	M	Varjao do	213	501	294	108	186	235	22	I	9	-23.7	-49.5

Guaratuba

Mzusp	2989	M	Ituverava	200	995	265	116	149	289	12	I	10	-23.7	-49.5
Mzusp	2992	M	Ituverava	200	995	265	116	149	289	12	I	10	-23.7	-49.5
Mzusp	10000	M	Campinas	192	697	272	88	184	221	26	I	11	-19.9	-40.6
Mzusp	16520	M	Pirapora- bairro da Ilha	182	694	260	88	172	230	35	I	12	-20.3	-40.3
Mzusp	16578	M	Pirapora- bairro da Ilha	182	694	260	88	172	230	35	I	12	-20.2	-40.3
Mzusp	24821	M	Sao Roque	179	785	257	86	171	235	39	I	13	-23.7	-49.5
Mzusp	24825	M	Sao Roque	179	785	257	86	171	235	39	I	13	-23.7	-49.5
Mzusp	24826	M	Sao Roque	179	785	257	86	171	235	39	I	13	-23.5	-47.1
Mzusp	9646	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-23.5	-47.1
Mzusp	9648	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-23.5	-47.1
Mzusp	9656	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-23.0	-44.0
Mzusp	9666	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-22.5	-42.0
Mzusp	9667	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-24.2	-48.3
Mzusp	9668	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-24.2	-48.3
Mzusp	9669	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-22.6	-43.4
Mzusp	9670	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-22.9	-42.8
Mzusp	9698	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-18.7	-39.9
Mzusp	9699	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-15.2	-39.5
Mzusp	9700	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	9701	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	9703	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-22.9	-43.2
Mzusp	9781	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-23.0	-44.0
Mzusp	9911	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	9923	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	10045	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	10050	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	10051	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	16552	M	Cotia	178	865	256	89	167	255	48	I	14	-14.8	-39.0
Mzusp	2573	M	Sao Paulo	188	730	265	103	162	223	35	I	15	-14.8	-39.0
Mzusp	10001	M	Sao Paulo- Zoo Agua Funda	188	730	265	103	162	223	35	I	15	-22.5	-42.2
Mzusp	10335	M	Sao Paulo- Interlagos	188	730	265	103	162	223	35	I	15	-23.7	-46.6
Mzusp	16431	M	Sao Paulo- Agua Funda	188	730	265	103	162	223	35	I	15	-23.8	-48.6
Mzusp	16601	M	Sao Paulo- Interlagos	188	730	265	103	162	223	35	I	15	-23.8	-50.1
Mzusp	30648	M	Riacho Grande, Sao Bernardo do Campo	176	774	251	90	161	237	49	I	16	-22.9	-43.2
Mzusp	10139	M	Barragem rio Campo- Salesopolis	174	804	248	84	164	237	47	I	17	-23.0	-44.3
MN	50679	M	Simao Pereira- Juiz de For a	212	512	301	107	194	284	21	I	18	-22.7	-43.0
MN	7149	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.7	-43.0
MN	7150	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.1	-42.7
MN	7152	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.1	-42.7
MN	7154	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.1	-42.7
MN	7160	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.9	-42.8
MN	7169	M	Teresopolis	184	1045	267	93	174	305	40	I	19	-22.0	-43.3

MN	50356	M	Sumidouro	218	623	308	119	189	273	20	I	20	-22.9	-43.2
MN	50365	M	Sumidouro	218	623	308	119	189	273	20	I	20	-22.1	-42.7
MN	50366	M	Sumidouro	218	623	308	119	189	273	20	I	20	-23.0	-44.3
MN	59578	M	Sumidouro	218	623	308	119	189	273	20	I	20	-23.0	-44.3
Mzusp	2808	M	Serra de Macae	189	851	272	102	170	243	25	I	21	-23.0	-44.3
MN	5720	M	Santa Teresa	204	658	281	124	157	207	39	I	22	-20.7	-40.5
MN	20947	M	Santa Teresa	204	658	281	124	157	207	39	I	22	-14.8	-39.0

Anexo 5- análises bayesianas

Distribuição das probabilidades posteriores da árvore filogenética estimada para o marcador cit-b apresentada no Capítulo3.

Extended Bayesian Skyline Plot

Distribuição das probabilidades posteriores da análise de ebs (capítulo 4), da verossimilhança da árvore estimada pela análise e dos números estimados de mudanças demográficas.

Anexo 6- arquivos de entrada simulações

Simulação- comparação da diversidade nas áreas instáveis e estáveis

```
//Parametros para o programa de simulação : simcoal.exe
1 amostras para simular
//Tamanho efetivo da população
185714
//Tamanho amostral
17 para bahia e Espírito Santo
62 para Restante da distribuição
//taxa de crescimento: taxas negativas indicam expansão
0
//número de matrizes de migração : 0 implica em não migração entre as demes
0
//eventos históricos: tempo, source, sink, migrantes, novo tamanho das demes, nova taxa de
crescimentos, número da matriz de migração
0 eventos históricos
//número de loci independentes
1
// número de estruturas cromossômicas
1
//por bloco: tipo de dado, úmero de loci, taxa de recombinação e mutação por geração
DNA 600 0.000 0.000000015 0.02
```

Cenário 1

```
//Parametros para o programa de simulação : simcoal.exe
1 amostras para simular
//Tamanho efetivo da população
258642
//Tamanho amostral
79
//taxa de crescimento: taxas negativas indicam expansão
0
//número de matrizes de migração : 0 implica em não migração entre as demes
0
//eventos históricos: tempo, source, sink, migrantes, novo tamanho das demes, nova taxa de
crescimentos, número da matriz de migração
0 eventos históricos
//número de loci independentes
1
// número de estruturas cromossômicas
1
//por bloco: tipo de dado, úmero de loci, taxa de recombinação e mutação por geração
DNA 600 0.000 0.000000015 0.02
```

Cenário 2

```
//Parametros para o programa de simulação : simcoal.exe
2 amostras para simular
//Tamanho efetivo da população
129321
```

```

129321
//Tamanho amostral
39
40
//taxa de crescimento: taxas negativas indicam expansão
0
0
//número de matrizes de migração : 0 implica em não migração entre as demes
2
//Matriz de migração: 0
0 1
1 0
//Matriz de migração: 1
0 0
0 0
//eventos históricos: tempo, source, sink, migrantes, novo tamanho das demes, nova taxa de
crescimentos, número da matriz de migração
3 historical event
0 0 1 1 2 0 0
15000 0 1 0 1 0 1
110000 0 1 1 2 0 0
//número de loci independentes
1
// número de estruturas cromossômicas
1
//por bloco: tipo de dado, úmero de loci, taxa de recombinação e mutação por geração
DNA 600 0.000 0.000000015 0.02

```

Cenário 3

```

//Parametros para o programa de simulação : simcoal.exe
2 amostras para simular
//Tamanho efetivo da população
129321
129321
//Tamanho amostral
39
40
//taxa de crescimento: taxas negativas indicam expansão
0
0
//número de matrizes de migração : 0 implica em não migração entre as demes
2
//Matriz de migração: 0
0 1
1 0
//Matriz de migração: 1
0 0.05
0.05 0
//eventos históricos: tempo, source, sink, migrantes, novo tamanho das demes, nova taxa de
crescimentos, número da matriz de migração
3 historical event
0 0 1 1 2 0 0
15000 0 1 0 1 0 1
110000 0 1 1 2 0 0

```

```
//número de loci independentes
1
// número de estruturas cromossômicas
1
//por bloco: tipo de dado, úmero de loci, taxa de recombinação e mutação por geração
DNA 600 0.000 0.000000015 0.02
```

Cenário 4

```
//Parametros para o programa de simulação : simcoal.exe
2 amostras para simular
//Tamanho efetivo da população
64660
64660
//Tamanho amostral
39
40
//taxa de crescimento: taxas negativas indicam expansão
0
0
//número de matrizes de migração : 0 implica em não migração entre as demes
2
//Matriz de migração: 0
0 1
1 0
//Matriz de migração: 1
0 0
0 0
//eventos históricos: tempo, source, sink, migrantes, novo tamanho das demes, nova taxa de
crescimentos, número da matriz de migração
3 historical event
0 0 1 1 2 0 0
15000 0 1 0 1 0 1
110000 0 1 1 2 0 0
//número de loci independentes
1
// número de estruturas cromossômicas
1
//por bloco: tipo de dado, úmero de loci, taxa de recombinação e mutação por geração
DNA 600 0.000 0.000000015 0.02
```

Anexo 7- Análise de transectos

Figura A7.1. Pontos estabelecidos para análise de transecto para machos do grupo interior.

Figura A7.2. Pontos estabelecidos para análise de transecto para fêmeas do grupo interior.

Figura A7.3. Pontos estabelecidos para análise de transecto para machos do grupo costa.

Figura A7.4. Pontos estabelecidos para análise de transecto para machos do grupo costa.

Tabela A7.1. Cada localidade definida para teste na análise de transectos. Estão apresentados as médias de cada CP, os desvios-padrões (DP) e o coeficiente de variação (CV- desvio-padrão dividido pela média e multiplicado por cem).

Fêmea													
Interior	n	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4
		média				DP				CV			
Pop 1	1	150.66	824.21	895.57	869.03								
Pop 2	2	135.06	721.81	782.57	756.28	9.37	43.51	48.36	45.44	6.94	6.03	6.18	6.01
Pop 3	7	140.11	746.23	809.06	783.62	8.36	45.42	48.32	48.99	5.97	6.09	5.97	6.25
Pop 4	6	140.21	745.75	808.44	784.31	4.48	27.37	29.56	29.22	3.20	3.67	3.66	3.73
Pop 5	1	142.01	753.70	814.63	789.38								
Pop 6	1	129.40	677.12	733.42	715.33								
Pop 7	1	138.13	738.21	800.08	771.90								
Pop 8	2	139.17	736.33	797.09	774.09	1.30	9.04	8.80	10.67	0.94	1.23	1.10	1.38
Pop 9	13	134.82	715.93	775.10	751.56	4.73	23.25	25.32	25.36	3.51	3.25	3.27	3.37
Pop 10	14	138.09	733.92	793.37	772.80	7.73	35.53	40.54	39.35	5.60	4.84	5.11	5.09
Pop 11	1	137.33	734.39	794.36	773.84								
Pop 12	2	131.89	693.77	751.74	728.74	9.88	55.90	58.87	59.47	7.49	8.06	7.83	8.16
Pop 13	3	134.68	715.69	773.70	751.16	3.10	20.52	21.63	20.02	2.30	2.87	2.80	2.66
Pop 14	8	132.75	702.79	759.64	736.83	4.72	25.96	28.62	26.60	3.56	3.69	3.77	3.61
Pop 15	1	144.44	765.89	832.01	808.56								
Pop 16	2	142.51	758.23	821.82	798.93	5.97	25.87	26.19	28.04	4.19	3.41	3.19	3.51
Total	65	137.34	729.88	790.09	767.03	6.54	35.01	38.64	37.89	4.76	4.80	4.89	4.94
Costa													
Pop 1	1	139.09	734.06	796.61	768.98								
Pop 2	1	138.97	735.83	798.68	774.07								
Pop 3	2	138.40	736.86	798.09	772.94	2.54	14.44	12.91	15.42	1.83	1.96	1.62	1.99
Pop 4	1	149.26	794.88	860.52	835.65								
Pop 5	1	142.10	750.80	813.03	793.06								
Pop 6	3	143.27	757.49	819.30	797.53	1.32	11.41	12.32	11.91	0.92	1.51	1.50	1.49
Pop 7	1	143.99	756.69	819.13	795.96								
Pop 8	1	138.42	733.29	792.20	769.35								
Pop 9	1	136.25	726.22	787.95	763.35								
Pop 10	7	139.33	738.64	799.52	777.56	6.37	37.24	39.65	40.26	4.57	5.04	4.96	5.18
Pop 11	3	130.92	691.50	749.18	728.06	1.71	11.15	13.31	11.23	1.31	1.61	1.78	1.54
Pop 12	1	128.45	670.38	725.88	703.48								
Pop 13	3	135.92	720.26	778.80	754.96	2.72	11.87	13.11	13.07	2.00	1.65	1.68	1.73
Pop 14	4	139.93	741.12	803.21	779.13	5.02	25.61	28.82	29.19	3.59	3.46	3.59	3.75
Pop 15	1	138.56	745.91	805.14	780.21								
Pop 16	1	134.93	708.59	764.82	743.89								
Pop 17	1	133.82	700.31	760.33	737.07								
Pop 18	1	135.53	724.36	783.10	762.17								
Pop 19	8	143.01	757.20	821.65	794.99	4.97	25.40	28.30	27.44	3.46	3.34	3.42	3.44
Total	42	139.18	737.03	798.29	774.62	5.52	30.59	33.36	32.64	3.96	4.15	4.18	4.21

Machos

Costa	n	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4
		média				DP				CV			
Pop 1	1	1104.46	889.93	967.40	935.85								
Pop 2	1	1074.51	865.77	937.56	912.26								
Pop 3	1	891.57	715.60	776.55	746.99								
Pop 4	1	879.43	707.49	764.61	746.55								
Pop 5	4	968.90	777.51	842.51	817.35	43.10	37.19	39.71	37.97	4.45	4.78	4.71	4.65
Pop 6	6	1005.59	811.16	877.07	854.91	75.94	62.43	68.80	66.72	7.55	7.70	7.84	7.80
Pop 7	1	1098.01	881.02	959.03	934.79								
Pop 8	1	960.07	771.13	833.35	810.13								
Pop 9	9	972.51	780.45	844.89	823.19	90.57	75.02	80.96	81.28	9.31	9.61	9.58	9.87
Pop 10	1	910.25	731.50	789.66	767.40								
Pop 11	2	845.47	677.01	732.61	710.72	27.85	22.28	21.32	24.08	3.29	3.29	2.91	3.39
Pop 12	2	886.01	711.80	769.86	744.53	14.52	9.45	13.03	11.24	1.64	1.33	1.69	1.51
Pop 13	2	913.54	731.79	793.59	770.30	2.01	0.77	1.29	3.35	0.22	0.11	0.16	0.44
Pop 14	1	1047.58	849.09	913.97	887.20								
Pop 15	1	946.14	759.76	819.50	801.47								
Pop 16	8	1040.63	836.46	908.99	883.56	57.03	45.83	50.49	50.05	5.48	5.48	5.55	5.66
Pop 17	1	960.06	771.03	835.14	813.35								
Pop 18	1	958.36	770.26	834.37	803.54								
Pop 19	1	1056.58	852.35	923.73	900.01								
Pop 20	1	946.07	758.56	823.13	798.11								
Pop 21	1	932.30	747.91	811.88	785.14								
Pop 22	1	956.03	769.84	833.01	806.44								
Pop 23	1	1071.14	862.09	934.72	908.85								
Pop 24	23	982.46	789.85	857.26	830.40	57.73	47.57	52.29	50.33	5.88	6.02	6.10	6.06
Total	72	981.47	788.94	855.21	830.34	73.20	60.18	65.94	64.81	7.46	7.63	7.71	7.81
Interior													
Pop 1	1	961.66	775.66	840.80	813.58								
Pop 2	6	919.58	738.81	800.80	775.31	46.01	37.42	40.69	40.55	5.00	5.07	5.08	5.23
Pop 3	1	931.20	751.06	812.31	787.55								
Pop 4	1	896.50	718.74	779.61	755.93								
Pop 5	2	959.96	771.60	835.79	811.27	22.98	20.36	21.31	21.15	2.39	2.64	2.55	2.61
Pop 6	2	935.56	753.16	814.76	792.75	73.34	60.96	65.05	64.23	7.84	8.09	7.98	8.10
Pop 7	3	962.21	776.21	840.78	816.11	74.30	60.92	66.53	63.70	7.72	7.85	7.91	7.81
Pop 8	5	966.66	776.89	842.80	816.60	69.38	58.03	61.31	60.98	7.18	7.47	7.27	7.47
Pop 9	1	939.46	751.83	814.73	792.43								
Pop 10	2	884.25	709.45	768.48	747.31	21.19	14.67	18.66	17.08	2.40	2.07	2.43	2.29
Pop 11	1	1091.67	874.00	953.09	930.06								
Pop 12	2	836.48	671.47	726.05	704.52	11.05	7.54	9.84	7.30	1.32	1.12	1.36	1.04
Pop 13	3	943.90	760.40	823.60	799.13	14.95	11.11	13.55	11.41	1.58	1.46	1.65	1.43
Pop 14	5	912.70	733.48	794.60	770.49	48.80	39.86	43.72	41.60	5.35	5.43	5.50	5.40

Pop 15	20	929.14	749.56	811.39	787.17	76.75	62.05	68.97	65.74	8.26	8.28	8.50	8.35
Pop 16	1	1051.46	846.67	919.39	892.34								
Pop 17	1	1056.88	852.54	926.11	895.89								
Pop 18	1	907.79	729.29	788.47	765.99								
Pop 19	6	913.75	733.57	793.20	771.27	57.56	46.64	50.90	48.25	6.30	6.36	6.42	6.26
Pop 20	4	863.75	692.41	750.14	726.41	41.21	34.71	35.91	36.55	4.77	5.01	4.79	5.03
Pop 21	1	940.79	761.46	822.22	799.33								
Pop 22	23	1003.57	808.99	876.45	849.79	101.07	87.93	92.96	94.13	10.07	10.87	10.61	11.08
Total	92	928.50	746.56	808.74	784.56	63.10	51.77	56.65	55.04	6.80	6.93	7.00	7.02