Leila Teruko Shirai

Filogeografia e Biogeografia da Floresta
Atlântica: um estudo de caso com *Didelphis*
aurita

São Paulo

2008

Leila Teruko Shirai

Filogeografia e Biogeografia da Floresta
Atlântica: um estudo de caso com *Didelphis*
aurita

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

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Marroig

São Paulo

2008

Sobrenome, Primeiro Nome do Aluno
Título completo da Dissertação
Número de páginas

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

1. Palavra-Chave Principal:
Biogeografia 2. Palavra-Chave Secundária:
Floresta Atlântica, *Didelphis aurita*,
Filogeografia. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Mario de Vivo

Profa. Dra. Leonora Pires Costa

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Gabriel Marroig
Orientador

Dedicatória

For bears and mermaids
Who find their ways to be together

Knowledge is freedom and ignorance is slavery,
and I just couldn't believe someone could be that close
to freedom and not take advantage from it.

He [Wayne Shorter] understood that freedom in music
was the ability to know the rules
in order to bend them to your own satisfaction and taste

Miles Davis

Agradecimentos

O tempo tem um movimento estranho, silencioso, amorfo. Mas também tem certas constâncias, padrões, e hábitos. Tempos de mudança. Tempo de transição. Agradeço aos seguintes por terem sido os agentes desse movimento.

Nori Shirai pelo silêncio, honra, e melancolia. Emiko Nagai Shirai pela bondade, coragem, e amor. Li pela sua inesgotável força para lutar pela justiça. E Gô pela companhia e helicópteros.

Gabriel Marroig por ter me mostrado muitas vezes o possível do impossível. Por ter o afincado de fazer ciência honesta, divertida e com o coração. Cara, você me deixou aprender, e me ensinou coisa que não dá pra agradecer.

Valderes de Conto por continuar sorrindo. Arthur por ter estado desde a origem e ter sido do seu jeito tímido um dos mais profusos agentes evolutivos do laboratório. Tânia Menezes por ter me ensinado a pensar molecularmente. Felipe Oliveira pela inspiração em muitos momentos. Karina Tatit por continuar Karina. Harley Sebastião por continuar carioca. Roberta Paresque pelo acolhimento de sempre e pela casa mais linda do Espírito Santo. Guilherme Garcia pelo DIVA. E Ana Paula A. Assis por iluminar a vida das pessoas (nunca se esqueça disso).

Aos colaboradores moleculares Nuno Ferrand e Sofia Silva (CIBIO, Portugal) e Diogo Meyer. Prof. Sérgio Matioli pelas dicas e reagentes. Ana Carolina Pavan, Felipe Martins e Artur Lopo pelo aconselhamento genético. Instituições e pesquisadores pela doação e empréstimo de tecidos: Leonora Costa e Rafaela Duda Cardoso (Coleção de Tecidos e DNA da Universidade Federal do Espírito Santo); Valéria Fagundes e Roberta Paresque (UFES); Lena Geise (UERJ); Rui Cerqueira (UFRJ); Diego Astúa de Moraes (UFPE); Alexandre Percequillo (na então UFPB); Caroline Aires, Ana Paula Carmignotto e Mario de Vivo (MZUSP); Renata Guilardi, Yatiyo Yassuda e Miguel T. Rodrigues (IBUSP); Renata Pardini e Laura Naxara (IBUSP); Jim Patton e Chris Conroy (MVZ, Berkeley); Thais Sincero, Maurício Graipel, Carlos Oliveira, Fernando L. de Souza e Fernando Goulart (UFSC).

Bernardo Lemos pelos dados de *Didelphis*. Renata Pardini, Fabio Silveira e Ricardo P. da Rocha pela coleta do meu primeiro pequeno mamífero. A todos que me permitiram o uso de fotos e similares (citados propriamente em cada caso). E Lena Geise e Roberta Paresque pela coleta nos cafundós nordestinos.

Elzi e Erica Santos pela paciência do dia-a-dia. Meninas da biblioteca, vigias da bio e Iltons do xerox pelas inúmeras ajudas ao longo de todos esses anos no instituto. Célia Hoiffmann, Deisy Morais, e Elenice Hirata pela facilitação departamental. João Morgante pelo apoio na empreitada extra-oficial. Antônio D'Miranda por ter criado e seu paraíso (e Lea Soares por ajudar a mantê-lo). N. e E. Shirai, V. Coroama, e FAPESP pelo apoio financeiro.

Casa das meninas, Caroline Fernandes e Jéssica Camargo, por ter sido sede dos muitos encontros e desencontros da vida. Pessoas inúmeras da biologia e, principalmente, de 2001. Tiago Hermenegildo e Amalia Hellwig pelo contínuo cuidado e carinho. José Eduardo Natali, Natale Cavaçana, e Vitor Hugo Rodrigues pela representação remanescente do ABERTO. Denise Selivon e Walter Neves por se manterem

exemplos de perseverança na nada fácil tarefa de existir. Pier Luigi Luisi por ter me dado minha chave e moeda. Daniel Damineli, Rogério Hirata e André Bellucco por (também) não desistirem.

E Vlad Coroama, por ser tão familiar, tão complementar, e pelo seu desconhecido brilho de viver. Pelas montanhas, pelo mar e pelo ar. E, especialmente, por ter vindo de tão longe, me tirado da água e me dado pernas.

Sumário

Resumo	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. Os modelos de diversificação	1
1.1.1. A Hipótese de Refúgios	6
1.2. Os refúgios na Floresta Atlântica	9
1.3. O gambá <i>Didelphis aurita</i>	10
1.4. As abordagens: biogeografia e filogeografia	14
2. Material e Métodos	19
2.1. Biogeografia	19
2.1.1. Amostras morfológicas	19
2.1.2. Variação geográfica	21
2.2. Filogeografia	23
2.2.1. Das amostras às seqüências	23
2.2.2. Análises filogenéticas	27
2.2.3. Análises intraespecíficas	28
2.2.4. Simulações coalescentes	30
3. Resultados	33
3.1. Biogeografia	33
3.2. Filogeografia	43
3.2.1. Análises filogenéticas	43
3.2.2. Análises intraespecíficas	45
3.2.3. Tempos de divergência	61
3.2.4. Subamostras	61
3.3. Dados morfológicos e moleculares	64
4. Discussão	67
4.1. Variação geográfica	67
4.1.1. Medidas cranianas	67
4.1.2. CytB	69
4.1.3. <i>D. aurita</i>	73
4.2. História demográfica de <i>D. aurita</i>	74
4.3. Teste da Hipótese de Refúgios	77
5. Conclusões	79
A. Anexos	81
A.1. Gazetteer: amostras morfológicas	81

A.2. Amostras moleculares	85
A.3. Sítios polimórficos	90
A.4. Teste de Tukey	93
A.4.1. Fêmeas	93
A.4.2. Machos	95
A.5. Estimativas de θ	96
A.6. Shirai and Marroig	98

Resumo

Por que os trópicos sustentam tanta diversidade? Essa é a pergunta principal que motivou este trabalho. Uma das frentes para contribuir ao entendimento deste fenômeno é estudar a origem da diversidade. Diversas hipóteses de diversificação existem, e existe também uma acalorada discussão no campo de estudo que busca testar essas diferentes hipóteses. Uma das hipóteses mais conhecida, se também não a mais polêmica, é a Hipótese de Refúgios. O objetivo deste trabalho foi, portanto, testar a Hipótese de Refúgios na Floresta Atlântica através de um estudo de caso. Para tanto, inicialmente os padrões de distribuição morfológica e genética do marsupial *Didelphis aurita* Wied, 1826 foram investigados através do método de quadrantes. As medidas cranianas revelaram uma correlação longitudinal para fêmeas, mas ausência de associação geográfica na variação do crânio dos machos. Entretanto, complementarmente, outro critério foi utilizado. Através de uma Análise de Componentes Principais sobre a variação da latitude e longitude resumiu-se a variação geográfica em apenas uma variável. Esta acaba se refletindo em uma diagonal da latitude e longitude, que acompanha a própria distribuição da Floresta Atlântica na costa brasileira. Agora, os grupos são formados se apresentam diferenças significativas ao longo desta diagonal, permitindo que populações biológicas distintas, mas próximas geograficamente, sejam separadas. Assim, verificou-se que a associação longitudinal das fêmeas provém basicamente da diferenciação das populações da Bahia, e mais, isso também afeta os machos. Contudo, o sinal não aparece através do outro critério devido ao fato de machos também apresentarem diferenciações em menor escala dentro da distribuição ao sul da Bahia, possivelmente devido à presença do ecótono entre a Floresta Atlântica e o cerrado *latu sensu*. Por sua vez, os dados genéticos como explorados através da variação geográfica do marcador mitocondrial citocromo B, revelaram que também existe uma associação com a longitude, e novamente, ela provém principalmente da diferenciação dos extremos da distribuição. Aqui, não só a mesma quebra na Bahia aparece, mas também uma outra quebra mais ao norte, de indivíduos provenientes de Alagoas. Tanto para os dados morfológicos quanto para os moleculares, demonstrou-se que há isolamento por distância no gambá, entretanto, toda a distribuição ao sul da Bahia se comporta como uma grande população panmítica. Essa ausência de estruturação geográfica, também aparente em análises de diferenciação (F_{st}), unidas aos testes de neutralidade (D de Tajima e F de Fu) negativos e significativos, que dão sinal de expansão demográfica recente mostram, juntos, as assinaturas esperadas pela Hipótese de Refúgios. Contudo, a divergência entre as populações deste sul datam de aproximadamente 140.000 ± 60.000 anos, o que não pode ser atribuída como sendo reflexo do último interglacial, esperado em cerca de 20.000 anos. Explorando mais a fundo as análises de F_{st} e os testes de neutralidade, revelou-se que suas estimativas são altamente influenciadas por desbalanço no tamanho de amostras, assim como baixa representatividade e agrupamentos inadequados que unem populações biológicas distintas. Os aparentes sinais de refúgios obtidos foram, portanto, artefato de três população bem amostradas no Rio de Janeiro. Sendo assim, não se pode atribuir esta hipótese como tendo criado diversidade dentro da espécie *D. aurita*.

Abstract

How can the tropics present such diversity? This question lies at the very core of this work. While for the origins of diversity, numerous hypotheses have been put forward over time, the pursuit of empirical proofs for them is almost as old as the hypotheses themselves. One of the better known such hypothesis, and at the same time one of the most controversial, is the “Refugee Hypothesis.” In this context, the main goal of this thesis has been to test the Refugee Hypothesis in the Atlantic Forest by means of a study case. Initially, the morphologic and genetic distribution patterns of *Didelphis aurita* Wied, 1826 marsupial have been investigated using the grids method. Cranial measurements revealed a longitudinal correlation for the females and, at the same time, the absence of any geographic correlation in the variation of male skulls. By means of a Principal Component Analysis, the latitudinal and longitudinal variations have been reduced to a geographical variation dependent on one variable only – a diagonal that follows the extension of the Atlantic Forest along the Brazilian coast. Groups have been formed if they presented significant differences along this diagonal, thus allowing distinct, but geographically close populations, to be differentiated. It could hereby be proven that the longitudinal correlation for females reflects mainly the differentiation between populations from Bahia state, and even more, that this differentiation affects the males as well. The signature does not appear in the grid criterium for the males since they also present lower levels of differentiation in the south of Bahia, possibly due to the presence of the ecotone of the Atlantic Forest with the cerrado *latu sensu* biome. There is, nevertheless, a break in Bahia for both males and females. As for the geographic variation of the molecular mitochondrial marker cytochrome B, it also presented a longitudinal variation, and a clear differentiation between the two extremes of the analyzed distribution. Here, not only a similar break could be seen in Bahia, but another one further north in the specimens from Alagoas state. For both the morphological and the molecular data, while there is isolation by distance effect for the opossum, all the distribution south of Bahia behaves as a large panmitic population. This lack of geographical structuring, also apparent in differentiation analyzes (Fst), together with neutrality tests (Tajima’s D and Fu’s F) which point towards recent geographic expansion, show the signatures expected by the Refugee Hypothesis. Since, however, the data indicates that the divergence of southern populations occurred approximately $140,000 \pm 60,000$ years ago, the diversification cannot be due to the last inter-glacial period from 20,000 years ago. To understand this seeming contradiction, further in-depth investigations of the Fst analyzes and the neutrality tests revealed that the estimations had been highly influenced by the heterogeneity in the number of samples, as well as by the low representability of some localities and also inadequate grouping of specimens, which mixed distinct biological populations. The apparent refugee signatures have thus been the misleading consequence of three well-sampled populations from Rio de Janeiro state. Therefore, the Refugee Hypothesis cannot be regarded as an explanation for the existing diversity of the species *D. aurita*.

1. Introdução

Em 1500, Vincent Yáñez Pinzón parte para as Américas e encontra nas florestas da costa da América do Sul um estranho animal. Uma fêmea, com filhotes agarrados a sua “segunda barriga”. Pinzón foi provavelmente o primeiro europeu a colocar as mãos em um marsupial. Hartman (1952) descreve e ilustra detalhes da história das descobertas da fauna americana pelos europeus, principalmente do marsupial do gênero *Didelphis*. Um século depois, nas explorações para a América do Norte, o mesmo animal foi encontrado no estado da Virgínia pelo Capitão John Smith. Recebeu o nome de *Virginia opossum*; *opossum* vindo do algonquiano (língua indígena local) *apossoun*, que significa “besta branca” (Morris, 1999). No Brasil, ele fica conhecido como gambá, do tupi *gã’bá* ou *guaambá*, que significa “mama oca” (teta vazia), em referência ao marsúpio.

As expedições européias relataram não apenas os estranhos animais que aqui eram encontrados. Desde o início da chegada à América, notou-se a grande diversidade encontrada, principalmente nas florestas neotropicais (ver Papavero and Teixeira (2001)). A propósito, a alta diversidade é fato constatado até hoje ao longo de todo o trópico para os diversos grupos animais e vegetais. Por que os trópicos sustentam tamanha diversidade?

A alta diversidade pode ser entendida em termos de riqueza de espécies. Contudo, comparações em termos de riqueza trazem subjacentes a diversidade da variação morfológica, utilizadas para a delimitação das espécies (mesmo considerando os diferentes conceitos de espécies empregados, uma vez que sempre se leva em conta o grau de diferenças ao longo do espaço). E, mais recentemente, não só a grande diversidade morfológica tropical aparece na literatura, mas também alta diversidade genética começa a ser reportada similarmente (ver, por exemplo, a revisão por Chek et al. (2003)).

Uma das formas de se responder essa pergunta é direcionar o foco sobre a origem da diversidade ou, mais especificamente, sobre a origem das espécies. Para tanto, os modelos de diversificação, que se utilizam dos diferentes modos de especiação, vêm sendo testados em organismos tropicais mostrando, por vezes, grande congruência nas descontinuidades espaciais das espécies (*e.g.* revisão em Hall and Harvey (2002)), o que suscita a influência de algum fenômeno comum criando esse padrão compartilhado. Por outro lado, quando essa congruência não é encontrada, imediatamente se evoca a necessidade ou de modelos mais complexos, ou da união de diferentes modelos atuando em diferentes momentos na história dos grupos em questão (como sugerido em diversos trabalhos, por exemplo, Marroig and Cerqueira (1997); Costa et al. (2000); Grazziotin et al. (2006)). O próximo tópico se devota a explicar, então, como os diferentes modelos de diversificação provocariam a alta diversidade encontrada nas florestas tropicais.

1.1. Os modelos de diversificação

A maioria dos modelos ou hipóteses de diversificação (modelo e hipótese utilizados intercambiadamente como sinônimos) se baseia no modo alopátrico para explicar a

origem das novas espécies (Mayr, 1942). Como poderá ser visto abaixo, a diferença entre eles se dá pelo tipo ou tempo da barreira geográfica que explicitamente separa a espécie ancestral em duas ou mais populações, isolando-as por tempo suficiente para que não haja mais fluxo gênico caso elas se reencontrem. Entretanto, há também modelos que sugerem diversificação sem barreira geográfica, baseado em diferenciação ecológica, gerando novas espécies em simpatria ou parapatría por seleção diversificadora (Schluter, 2001). Este último é representado basicamente pela Hipótese de Gradiente Ecológico (Endler, 1977), que diz que populações com distribuição contínua possuem ao longo dela gradientes ecológicos, ou clinas. Seleção natural atuaria ou mantendo a clina estável ou de forma direcional sobre as populações. Uma das conseqüência da hipótese é a potencial existência de zonas híbridas nos ecótonos. Esta hipótese converge com o conceito de isolamento por distância que diz que pode haver diversificação entre os extremos da distribuição de uma espécie caso a distância seja suficientemente grande para que as condições ambientais sejam distintas e, conseqüentemente, levem à divergência entre as populações. note que limitação na dispersão do organismo pode levar mais facilmente a isolamento por distância.

Apesar de ser um dos poucos modelos que propõe um modo de especiação diferente do alopátrico, existe uma menor quantidade de trabalhos averiguando-a (Schluter, 2001; Haffer, 1979). As previsões para este modelo são simples: duas espécies irmãs devem estar proximamente distribuídas em um gradiente ecológico ao longo da geografia, seja por exemplo, ao longo da latitude, ou da longitude, ou altitude (Patton and Smith, 1992). Apesar disso, maior parte da atenção parece estar concentrada sobre as hipóteses alopátricas (ver Fig. 1.1, e detalhes dela abaixo). Sendo assim, apresenta-se abaixo uma revisão das hipóteses de diversificação baseadas apenas em alopatria. Apesar da gama de modelos neste caso ser maior, de forma geral eles variam em torno de três hipóteses principais: (1) Hipótese de Vicariância Geotectônica; (2) Hipótese de Rios; e (3) Hipótese de Refúgios. Revisões mais extensas dessas e outras hipóteses podem ser encontradas em Haffer (1979, 1997); e Marroig and Cerqueira (1997).

(1) Hipótese de Vicariância Geotectônica (Räsänen et al., 1987; Platnick and Nelson, 1978; Cracraft and Prum, 1988) ou Paleogeográfica (Emsley, 1965)

As espécies se originam através de mudanças paleogeográficas que alteram a distribuição das áreas de floresta e mares continentais. As mudanças são lentas e persistem por longos períodos, envolvendo movimento das placas tectônicas, que resultam em separação de terras continentais (movimentos epeirogenéticos) e soerguimento de montanhas (movimentos orogenéticos).

O aparecimento dos Andes, que se inicia no Terciário e cresce continuamente em diversos conjuntos de “ilhas” (por essa razão pode também ser chamada de Hipótese de Ilhas, Haffer (1979)), é uma das mudanças principais que provocaria diversificação na floresta Amazônica, separando diversas espécies irmãs na parte oeste (trans-andina) e leste (cis-andina). Um corolário dessa hipótese é de que durante todo o Quaternário as condições ambientais ou se mantiveram estáveis ou elas não afetaram as espécies em questão.

(2) Hipótese de Rios (Ayres and Clutton-Brock, 1992; Capparella, 1986; Sick, 1967; Wallace, 1849)

Essa hipótese surge da observação dos limites de espécies acompanhando as margens dos grandes rios amazônicos (*e.g* Wallace (1849) e Ayres and Clutton-Brock (1992) para primatas, Sick (1967) para aves), sugerindo que as espécies animais, que

possuíam distribuição ampla e uniforme, foram subdivididas em populações isoladas quando a rede de rios amazônicos principais surgiu no final do Terciário e no começo do Quaternário. Uma crítica feita por Haffer (1969) é de que essa formulação parece não ser adequada, uma vez que o porte atual da Floresta Amazônica depende do porte atual dos rios principais, e o desenvolvimento de ambos provavelmente ocorreu concomitantemente. Sendo assim, mesmo que rios separem hoje as espécies amazônicas, a separação não ocorreu durante a formação dos rios principais (na transição do Terciário/Quaternário).

Uma das predições da Hipótese de Rios é de que as espécies ou mesmo populações da mesma margem de um rio seriam mais similares entre si do que com as da margem oposta. Capparella (1986) testou essa predição usando alozimas em aves amazônicas, e não só mostrou que a previsão é válida para esse grupo, mas também que a divergência aumenta quanto maior a largura do rio. Por outro lado, Patton et al. (1994) também testaram a hipótese com uma espécie de roedor ao longo do Rio Juruá e, apesar de terem encontrado indícios de baixo fluxo gênico entre as margens, encontraram também ao longo da mesma margem. Este trabalho mostra, além disso, que existe uma estruturação entre a cabeceira e foz do rio, comparação que Capparella (1986) não fez.

Coincidentemente, a segunda previsão da hipótese é de que mesmo nas cabeceiras dos rios (local onde o fluxo gênico é facilitado) o isolamento ainda deve existir para que os rios sejam, então, barreiras suficientes para separar as espécies de fato. Caso a segunda previsão fosse atestada, ela indicaria que a separação e divergência ocorreram em um momento passado e o isolamento persiste pela presença atual do rio.

Essa hipótese ajudaria a explicar a diversidade neotropical, mas a diversidade necessariamente associada a rios. Entretanto, ela ainda apresenta deficiências em termos de evidências empíricas, principalmente quando relacionada à suas próprias previsões, por vezes não testadas. Haffer (1997) aponta diversas dessas dificuldades, concluindo que provavelmente os rios sejam exageradamente evocados como barreiras geográficas. Suas críticas provavelmente decorrem de certa tendência a favorecer a próxima hipótese, apresentada a seguir.

(3) Hipótese de Refúgios (Haffer, 1969; Simpson and Haffer, 1978; Vanzolini and Williams, 1970)

Mudanças climáticas, especialmente as glaciações do Quaternário, alteraram a distribuição de biomas florestais e de vegetação aberta, formando blocos isolados, ou refúgios, que podiam se reexpandir de acordo com as condições: caso mais quente e úmida (período interglacial), expansão de florestas; caso mais fria e seca (período glacial), de savanas. A diversificação viria do isolamento causado pela retração dos biomas, depois do qual viria a expansão quando as duas (ou mais) novas espécies ou subsespécies já estariam isoladas reprodutivamente.

Muita discussão foi voltada em torno de arduamente criticar ou facilmente aceitar a Hipótese de Refúgios, principalmente na década de 80 (Brown, 1987). A atratividade do modelo vem de que as mudanças climáticas são fato, com evidências vindas de áreas independentes, e a explicação de diversos ciclos de isolamento e expansão promovendo eventos de especiação parece bastante razoável. Contudo, como já dito, as hipóteses de diversificação explicam a história dos organismos em momentos diferentes, por vezes a partir de mecanismos diferentes. A escola da Biogeografia de Vicariância (que sugere a Hipótese de Vicariância Geotectônica), por exemplo, criticou a Hipótese de Refúgios

relembrando sobre a importância dos eventos pré-pleistocênicos e descartando esta hipótese como explicativa dos padrões de distribuição atual das espécies (*e.g.* Nelson (1979)). Entretanto, a Hipótese de Refúgios trata de eventos de especiação recentes, principalmente de origem no Quaternário, e portanto deve afetar (quando afeta) as categorias infragenéricas. Assim, ela não compete com os outros modelos de diversificação; ao mesmo tempo, não precisa de suporte de trabalhos que o próprio Brown (1987), que defende a hipótese, não reconhece como suficientemente sérios (e portanto válidos). De qualquer forma, não existe necessidade de um modelo explicativo universal, principalmente quando lidando com a complexidade espacial, temporal e biológica encontrada nas florestas tropicais. Nas palavras de Haffer (Haffer (1979), p. 10), “a Teoria dos Refúgios não propõe que todas as especiações tenham ocorridos nos refúgios, nem que todas as espécies atuais tenham se originado no Quaternário. Ao invés, a Teoria dos Refúgios quaternários busca explicar os últimos e talvez mais efetivos eventos de diferenciação que começaram durante o Mesozóico e contribuíram para o desenvolvimento das biotas modernas do mundo”.

O que se extrai dessa discussão é, então, como testar confiavelmente os modelos de diversificação? Em outras palavras, como separar as assinaturas deixadas por cada uma delas, caso elas tenham sido importantes na história de vida de determinado organismo?

Em primeiro lugar, a definição de previsões *testáveis* sobre cada modelo é necessária, e quanto menor a possibilidade de uma mesma evidência provir de dois ou mais modelos, melhor. Entretanto, e em segundo lugar, poder diferenciar entre as hipóteses é fundamental. Pelo visto até o momento, o único parâmetro que as diferencia é o tempo do evento de vicariância entre espécies. Caso datem do Quaternário, opta-se pela Hipótese de Refúgios, caso datem do Terciário (acompanhado de algum evento epeirogenético ou orogenético), opta-se pela Hipótese de Vicariância Geotectônica; quando testando a Hipótese de Rios, deve-se oferecer uma previsão sobre a origem do rio.

A fim de ilustrar como se encontra o estado de arte dos testes às hipóteses, um levantamento na plataforma de busca de artigos científicos *Web of Science* (isiknowledge.com/) foi feito até o ano de 2007 estipulando as palavras-chave “biogeografia” e “filogeografia” e, dentro desses resultados, as palavras-chave (com pequenas alterações) “vicariância”, “rios”, “refúgios”, e “isolamento por distância”, selecionando apenas os trabalhos que buscaram analisar ou testar *explicitamente* as hipóteses de diversificação.

Uma primeira discrepância clara aparece na Fig. 1.1A, que mostra a maior quantidade de trabalhos relacionadas aos modelos alopátricos sendo que, dentro destes, a maioria sobre a Hipótese de Refúgios (1053 de 1822 com marcadores moleculares e 310 de 425 com morfologia, 50% e 73%, respectivamente). Esta figura foi produzida a partir da busca dentro de “filogeografia”, e o resultado da busca dos trabalhos morfológicos para refúgios foi inserido nesse mesmo gráfico – similarmente, os testes das outras hipóteses com estes mesmos dados foram realizados em menor escala com dados morfológicos. É importante notar que os números absolutos em si não são relevantes; o intuito aqui é mostrar como é a proporção dos trabalhos relacionados a cada modelo.

Focando especificamente sobre os trabalhos moleculares com a Hipótese de Refúgios, pode-se ver o crescimento exponencial das publicações a partir dos anos 90 (Fig. 1.1B), sendo a maioria desses feita com marcadores mitocondriais (Fig. 1.1C) – note-se que filogeografia emerge como uma área dentro da biogeografia na metade dos anos 80. Nesta figura, “morfologia” representa a quantidade (ínfima) de trabalhos realizados com dados moleculares e morfológicos conjuntamente. Por último, na figura

Figura 1.1.: Estado de arte dos estudos relacionados aos modelos de diversificação na literatura científica da biogeografia e filogeografia até o ano de 2007 (ver detalhes da busca no texto). Mostra-se o número absoluto de trabalhos em (a) por modelo; especificamente relacionados à Hipótese de Refúgios em (b) realizados com marcadores moleculares ao longo dos anos; (c) detalhando o tipo de marcador molecular; (d) detalhando em qual grupo biológico; (e) em qual região política do mundo (sendo AMN, AMC e AMS as Américas do Norte, Central e Sul, respectivamente); e (f) detalhando dentro da AMS em qual dos biomas em que foi realizado. Número total de resultados: 1.822 para filogeografia e 425 para biogeografia.

1.1D pode-se ver a desproporcionalidade de estudos feitos com vertebrados (sendo que destes, 35% correspondem a mamíferos e 15% a aves), quando comparados a invertebrados e plantas. Curiosamente, este último seria o reino biológico mais afetado pelas glaciações, afinal a hipótese tem por definição alterações na distribuição das florestas e savanas (e a alteração na distribuição de muitos animais ocorre como num efeito carona); no entanto, poucos trabalhos existem disponíveis na literatura (assim como já nota Prance (1987)).

Assim sendo, esse trabalho optou por testar a Hipótese de Refúgios pelas seguintes razões: (1) ela possui um corpo empírico vasto; (2) é uma hipótese que explica a diversificação em uma área geográfica vasta, e não local como na Hipótese de Rios;

(3) se refere a grupos que possuem diversificação recente, no nível infragenérico; e (4) possui também um corpo teórico renovado pela introdução de modelos provenientes da filogeografia, que permite as previsões testáveis exclusivas do modelo, como será visto. Para o leitor interessado, Hooghiemstra and Hammen (1998) provê 24 páginas de literatura relacionada apenas à Hipótese de Refúgios.

1.1.1. A Hipótese de Refúgios

A órbita da Terra ao redor do Sol e a orientação do seu eixo de rotação variam em relação a um plano fixo de referência (chamado de eclíptica), de acordo com perturbações gravitacionais relacionados aos parâmetros: excentricidade da órbita, longitude do perihélio, e obliquidade da eclíptica (Bigarella and Andrade-Lima, 1979; Bartlein and Prentice, 1989). A excentricidade da órbita se refere à mudanças cíclicas da órbita, de elíptica a circular, que se alteram a cada 95.000 anos. A longitude do perihélio se refere ao ângulo formado pelo equinócio de outono com o perihélio (ou seja, o período em que a Terra está mais próxima do Sol), variando em média a cada 20.000 anos. A obliquidade da eclíptica, por sua vez, é a própria mudança na posição dos solstícios e equinócios, que varia entre $21,8^\circ$ e $24,4^\circ$, sendo o primeiro com periodicidade de 40.900 anos, e o segundo de 39.500 anos.

Esses três parâmetros variam minimamente, mas alteram significativamente o clima da Terra. Uma mudança de 1° na obliquidade da eclíptica altera a taxa de insolação polar no verão em cerca de 4%, correspondendo a um aumento de $9,2^\circ\text{C}$ na temperatura média em altas latitudes. Nos trópicos, essa mudança é ainda mais drástica. O aumento da insolação pode chegar a até 20%, afetada neste caso por causa dos outros dois parâmetros (Bigarella and Andrade-Lima, 1979). Quando a obliquidade é máxima e, portanto, a insolação também, a evaporação aumenta devido ao aumento da temperatura dos oceanos. Isso acelera o ciclo do vapor d'água, que aumenta a quantidade de chuvas de convecção. Dessa forma, não só a temperatura é alta, mas também a umidade do ar. Isso caracteriza os períodos interglaciais.

Nos períodos glaciais o oposto ocorre, e pode coincidir com a excentricidade máxima (*i.e.*, órbita elíptica), o que torna os invernos mais longos em latitudes altas e, conseqüentemente, as massas de água dos pólos congelam (formando geleiras). Caso haja esta coincidência, o pico do período glacial pode ter temperatura e umidade ainda menores. Assim, em conjunto, essas variações alteram a quantidade de insolação na Terra, que culminam em ciclos em que a temperatura e umidade do planeta variam significativamente. Estes ciclos, que ocorrem a cada 100.000 anos, são conhecidos como ciclos de Milankovitch (Fig. 1.2, Bartlein and Prentice (1989)).

Qual a razão dessas explicações?

Geólogos e palinólogos do hemisfério norte percebem, ao redor da década de 50 (revisão em Haffer (1979)), alterações drásticas no clima e na vegetação nos últimos 2 milhões de anos (Maa). Pólens fósseis típicos de plantas de áreas secas eram encontrados onde hoje ocupa-se áreas florestais. Pensam eles, então, que as mudanças climáticas abaixaram a temperatura da Terra o suficiente para os pólos congelarem e gradativamente se expandirem para latitudes menores. Isso também moveria as áreas secas para latitudes abaixo do limite do gelo, aonde hoje se encontram florestas, criando o padrão de distribuição encontrado. Nasceu a base para a Hipótese de Refúgios. É interessante notar que o efeito das glaciações sobre os organismos nas zonas temperadas é mais drástico em termos de extinção (uma vez que o gelo avança sobre o continente, isto é, sobre a distribuição de plantas e animais). A diversidade encontrada

Figura 1.2.: Ciclos de Milankovitch do último milhão de anos promovidos pela variação dos parâmetros: excentricidade da órbita da Terra (*eccentricity*), longitude do perihélio (*precession*), e obliquidade da eclíptica (*obliquity*), resultando na alteração da insolação (*solar forcing*). Figura reproduzida sob permissão da Licença de Bens Criativos Comuns para fins não comerciais (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

hoje, portanto, teria origem das espécies que conseguiram sobreviver ao resfriamento nos refúgios e áreas não afetadas pela migração do gelo.

Se as mudanças climáticas realmente aconteceram, elas devem ter afetado todo o planeta, e não apenas as altas latitudes. Pensando mais além, as mudanças climáticas criam áreas de isolamento de uma distribuição contínua e ampla de uma espécie. Para os casos em que as populações sobreviveram à retração de seu bioma, havendo um reencontro entre duas linhagens no momento seguinte de expansão, elas podem ter divergido em direções evolutivas distintas o suficiente para não se reconhecerem mais como reprodutores. Dessa forma, a Hipótese de Refúgios implica também no surgimento de novas espécies. Sob este raciocínio, Jürgen Haffer propõe a hipótese para os neotrópicos Haffer (1969). Outros autores também propuseram a mesma hipótese para a África e Oceania, revisados neste mesmo trabalho.

A aplicação do mesmo raciocínio de refúgios agora para o neotrópico foi conveniente para explicar a alta diversidade aqui encontrada. Determinadas áreas com alto grau de espécies endêmicas ao longo de toda a Amazônia, e também para espécies irmãs encontradas na Floresta Atlântica. Essas áreas de endemismo só poderiam ter sido formadas por algum tipo de isolamento que durasse ao longo de um tempo suficiente para que houvesse diferenciação em relação às outras áreas. Ainda mais, esse isolamento deveria ter ocorrido recentemente, uma vez que a diferenciação envolve categorias taxonômicas específicas ou subespecíficas. Ou seja, praticamente todas as características

da Hipótese de Refúgios.

Assim que Haffer e outros autores propõem que refúgios também foram determinantes na história das florestas neotropicais, toda a atenção foi voltada a encontrar as áreas de refúgios. Paralelamente, as características geomorfológicas e palinológicas da América do Sul começaram a ser investigadas, mostrando que os estratos quaternários também proviam evidências das mudanças climáticas. Então, no trabalho de 1969, Haffer usa das evidências indiretas da quantidade desigual de chuvas e da distribuição das aves para apontar as áreas de refúgios amazônicos, que são áreas em que a densidade pluviométrica reduziu pouco nos períodos glaciais em relação ao que é encontrado hoje, e coincidentemente também as áreas com alto grau de endêmicos (Fig. 5 deste mesmo artigo).

Posteriormente, os métodos de identificação das áreas de refúgios passam a levar em conta outras evidências, e podem ser listadas da seguinte forma, conforme Haffer (1979)(p. 16-17): (1) subdivisão de uma região em áreas de endemismo, excluindo (cuidadosamente) as distribuições restritas e ecologicamente especializadas (por exemplo, espécies de determinadas exposições rochosas, pântanos, lagos e ligadas à condições edáficas), (2) superimposição dos mapas de distribuição de espécies ecologicamente relacionadas, detectando as intersecções nas distribuições e, assim, desenhando isolinhas de número de espécies e identificando os centros de endemismo, (3) mapeamento das zonas de contato secundário (encontro de espécies ou subespécies e principalmente as zonas híbridas) para comparação com os centros de endemismo, sendo que estes seriam os centros de dispersão; e (4) estudo dos dados geológicos da região para identificar as regiões de refúgios ecológicos e comparar com as áreas biogeográficas acima identificadas a fim de acessar o grau de determinismo histórico dessas áreas de endemismo.

Ou seja, o único teste à Hipótese de Refúgios, como concebido na época, se restringia a encontrar as áreas de refúgio, a partir das áreas de endemismo, e os dados geológicos serviriam para corroborar ou não a identificação dessas áreas. Duas grandes incertezas subjacentes a este teste de hipótese são a taxonômica, já que mapear a distribuição de espécies razoavelmente depende de amostragem exaustiva e de conhecimento taxonômico do grupo em questão (nem sempre disponíveis); e do levantamento geológico/palinológico da região (também nem sempre disponíveis). Sendo assim, não é à toa que a hipótese foi duramente criticada. Além disso, parte considerável das críticas voltou ao redor do item (3), relacionado à zonas de contato secundário. Endler (1977) argumenta que estas áreas são exatamente as mesmas que as esperadas pela Hipótese de Gradiente Ecológico, isto é, são os ecótonos presentes hoje na distribuição das espécies (uma réplica à crítica foi feita por Mayr and O'Hara (1986)).

Entretanto, mesmo hoje com o maior conhecimento sobre a taxonomia e distribuição de espécies neotropicais e da geologia da América do Sul (apesar de ainda longes do ideal), e com novas ferramentas analíticas (como a Análise de Endemicidade por Parcimônia, Rosen (1988)), os refúgios não concordam exatamente entre grupos de espécies e não podem ser apontados com a acurácia desejada. Claro que se pudéssemos identificar os refúgios entendendo quais os parâmetros bióticos e abióticos por trás, a implicação para as diretrizes ambientais e políticas e planejamentos de conservação seria indiscutivelmente enorme. Mas mais importante para o momento é: apontar exatamente as áreas de refúgios é realmente um bom indicativo de que os refúgios existiram? Discutir se A ou B foi um refúgio no passado ou não é realmente um teste à hipótese?

Antes de finalmente entrarmos nesta questão, como pôde ser visto ao longo do texto,

e também mostrado na figura 1.1e, e principalmente 1.1f, a maioria dos trabalhos se restringem ao entendimento e teste da hipótese na Floresta Amazônica. Contudo, se os refúgios foram realmente importantes no estabelecimento da diversidade neotropical, o outro bioma florestal da América do Sul, a Floresta Atlântica, também teria sido influenciado pelos eventos quaternários. A razão pela qual o foco sempre foi sobre a Amazônia permanece especulativo. O fato é que os trabalhos na Floresta Atlântica são mínimos. Dessa forma, este trabalho se propõe a testar a Hipótese de Refúgios neste bioma, e abaixo detalhamos o contexto histórico e biológico para tal.

1.2. Os refúgios na Floresta Atlântica

O clima na América do Sul é basicamente controlado por anti-ciclones subtropicais dos Oceanos Atlântico Sul e Pacífico, anti-ciclones migratórios polares, e pela célula de baixa pressão do Chaco (Bigarella and Andrade-Lima, 1979).

Imagina-se um cenário glacial do Pleistoceno para os trópicos como o seguinte: o anti-ciclone do Atlântico Sul migrou para o norte, para latitudes tropicais. A temperatura e umidade estão menores e geleiras avançam, e tudo isso concentra a distribuição das chuvas em um intervalo menor (mais sazonal) e em uma área menor. Além disso, a célula de alta pressão, que distribui as chuvas em grande parte do Brasil, teria migrado para latitudes mais baixas (para cerca de 10° S) provocando a entrada de ventos secos no continente, favorecendo ainda mais as áreas áridas e semi-áridas (Bigarella and Andrade-Lima, 1979). Dentro desta visão, diversas áreas secas se expandiram no continente sul americano e as poucas regiões que mantiveram alguma pluviosidade puderam comportar um ambiente florestal, sendo estas os refúgios de Haffer. A redução de pluviosidade foi principalmente suportada por evidências palinológicas (*e.g.* Hammen (1974) e referências citadas em Haffer (1969, 1979)). Mais recentemente, Mayle et al. (2004) mostram que a Amazônia na época da última máxima glacial possuía temperatura média de 5°C menor do que a encontrada hoje. Entretanto, este mesmo trabalho reúne evidências provenientes de fósseis e simulações atmosféricas e geológicas passadas discutindo que a insolação maior nas latitude de 10-15° S prevista pelos ciclos de Milankovitch para a última glacial teriam aumentado a convecção na América do Sul central. Isso, por sua vez, maximizaria a migração na zona de convergência intertropical para o hemisfério sul. Isso, então, aumentaria a precipitação na parte sul da Amazônia. Mas, com o avanço de geleiras vindas da Antártica e Patagônia, o gradiente da temperatura ao longo da América do Sul teria aumentado, contrabalanceando os efeitos da insolação acima citada provocando, dessa forma, maior precipitação na parte norte da Amazônia. Por fim, com base em estudos paleoecológicos, os autores conduzem uma simulação mostrando que, na realidade, grande parte da Amazônia permaneceu florestal, adicionando que isso deve ter se mantido assim nos últimos 170.000 anos. Eles não negam, entretanto, que áreas florestais e de savanas tinham distribuição diferentes das encontradas hoje, principalmente considerando a diferença na temperatura, assim como na concentração de gás carbônico (reduzida em 32%) e conseqüente redução de precipitação (reduzida possivelmente em 20%) quando comparada ao Holoceno. Com isso, as florestas mudaram de uma floresta ombrófila densa (chamada de *evergreen forest* por Mayle et al. (2004)) para uma floresta seca semi-decídua. O contraste principal com as idéias anteriores é de que as florestas não foram completamente substituídas por savanas ao longo de toda a Amazônia.

A propósito, outro estudo baseado em dados palinológicos simulou a vegetação nos

últimos 21.000 anos mostrando que, no caso da Floresta Atlântica, houve retenção de áreas florestais em grande parte do nordeste brasileiro, sendo que apenas as áreas do sudeste e sul teriam se tornado secas (Carnaval and Moritz, 2008). Nos últimos 6.000 anos, por sua vez, a extensão das florestas neste bioma já se apresentava como conhecido hoje (ou melhor, há 500 anos atrás).

Segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a Floresta Atlântica ocupa hoje uma área de 1.110.182 km², correspondendo a 13,04% do território do Brasil. Ela é caracterizada por sazonalidade marcada, com diversos gradientes ambientais devido à complexidade topográfica e orográfica, influenciada por ventos do leste. Inclui diversos tipos de vegetação, tais como florestas estacional decídua e semi-decídua; ombrófila densa, mista e aberta, assim como manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais (no nordeste) (IBGE, 1993).

Para Dinerstein et al. (1995), a Floresta Atlântica estaria dentro do “Tipo Maior de Habitat” chamado Floresta Tropical e Subtropical Úmida de Folhas Largas (*Tropical and Subtropical Moist Broadleaf Forest*), e dentro do “Tipo Maior de Ecossistema” Floresta Tropical de Folhas largas (*Tropical Broadleaf Forest*). Esta última pode ser definida como a “floresta tropical cuja copa é fechada, dominada por espécies de folhas largas” (Dinerstein et al. (1995), pp. 63), apresentando características marcantes como presença de lianas verdadeiras, folhas com ápice caudato, árvores de tronco liso e não ramificado, dentre outros. As Florestas Tropicais de Folha Larga são divididas em Florestas Secas e Úmidas, sendo que a primeira possui mais de 50% da copa decídua e a segunda, menos de 50%; este último caso correspondendo, então, à Floresta Atlântica.

As ecorregiões que compõem a Floresta Atlântica são: Floresta Atlântica da Costa Brasileira (com 233.266 km²) e Floresta Atlântica do Interior Brasileiro (com 803.908 km²). A primeira ecorregião se estendia mais adentro do continente, mas hoje ela se restringe hoje a uma pequena faixa costeira que vai desde o estado da Paraíba até o Rio Grande do Sul. A segunda é mais extensa e mostra maior variação biogeográfica; vai desde o interior da Bahia até o Rio Grande do Sul e, apesar do nome, se estende até Argentina e Paraguai (Dinerstein et al., 1995).

Apesar de também possuir alto grau de endemismo, tais com 567 espécies de vertebrados e mais de 8.000 espécies de plantas, caracterizando-se como um dos oito *hotspots* do mundo (Myers et al., 2000), testes das hipóteses de diversificação na floresta são escassos (Grazziotin et al., 2006). Assim, a escolha de uma espécie endêmica deste bioma foi feita com o intuito de contribuir, mesmo que com um pequeno pedaço, para o quebra-cabeças da história da floresta.

1.3. O gambá *Didelphis aurita*

Didelphis aurita é representante da família Didelphidae (Marsupialia, Didelphimorphia) (Fig. 1.3). Esta família é a mais rica dentro da ordem, sendo a ordem a terceira mais rica dentre os mamíferos neotropicais (após roedores e morcegos, Gardner (1993)). O gênero *Didelphis*, junto com seu gênero irmão, *Philander*, compreende um dos clados mais robustos dentro de Didelphidae, encontrado com altos suportes nos estudos moleculares de Kirsch and Palma (1995); Steiner et al. (2005); Palma and Spotorno (1999), na análise com dados morfológicos e moleculares combinados de Voss and Jansa (2003), e na super árvore de Cardillo et al. (2004).

O gênero *Didelphis* é composto por seis espécies, sendo uma na América do Norte, *D. virginiana* (gambá da Virgínia, ou opossum), e cinco na América do Sul, divididas

Figura 1.3.: Indivíduo de *Didelphis aurita* encontrado na praia de Toque Toque Grande, em São Sebastião (SP). Foto retirada por R. Recoder, utilizada sob sua permissão.

em dois grandes grupos: o grupo *marsupialis* (gambá de orelha preta), que inclui *D. aurita* e *D. marsupialis*; e o grupo *albiventris* (gambá de orelha branca), composto por *D. albiventris*, *D. pernigra* e *D. imperfecta* (Cerqueira and Tribe, 2008). A distribuição atual tem como extensão mais ao norte o sul do Canadá, e mais ao sul o norte da Argentina (Emmons and Feer, 1997). Na América do Sul, onde as três primeiras espécies se encontram, *D. aurita* e *D. marsupialis* são as espécies exclusivamente florestais, ao passo que *D. albiventris* é a espécie de áreas abertas (Cerqueira, 1985).

A história de *Didelphis* se inicia com a história da ordem Didelphimorphia. O fóssil mais antigo atribuído a um marsupial data do final do Mesozóico, no Cretáceo Superior, encontrado na América do Norte (Clemens, 1968). Ao contrário do destino de muitas espécies deste período, alguns Didelphimorphia (*e.g.*, *Alphadon*) sobreviveram à grande extinção da transição Cretáceo-Terciário (conhecida como o limite K/T), dando origem a seus descendentes do Cenozóico (Clemens, 1968). Nos estratos mais antigos encontrados nos neotrópicos, os marsupiais já estão presentes, caracterizando-os como um dos grupos de mamíferos mais antigos na América do Sul (Hershkovitz, 1969). Os registros do Paleoceno sul americano mostram que os marsupiais eram extremamente diversos, reduzindo a diversidade a partir do Eoceno (Simpson, 1969). A fauna destes períodos costumava ser associada à família Didelphidae por similaridades morfológicas com as espécies atuais. Inclusive, *Didelphis* já foi cunhado como sendo um fóssil vivo, por reter características dos marsupiais basais. Clemens (1968), no entanto, já dizia que esse termo não se adequa exatamente a *Didelphis*, baseado em comparações da morfologia dentária com *Alphadon*, ou mesmo a *Eodelphis*, muitas vezes dito como o ancestral de *Didelphis*. Mais recentemente, comparações com novos fósseis (Rougier et al., 1998) consideram os fósseis do Paleoceno como marsupiais basais, postergando o fóssil mais antigo de Didelphidae para o o Mioceno Médio; data-se com marcadores moleculares a origem da família no Eoceno Médio, há 39,8 milhões de anos atrás –Maa (Steiner et al. (2005) e referências citadas). Atualmente, o fóssil mais antigo relacionado ao gênero *Didelphis* data do Irvingtoniano Superior (0,6 - 0,3

Maa), encontrado na Flórida (Coleman 2A, Hulbert and Morgan (1993)).

Supõe-se que os marsupiais da América do Sul encontrados no Paleoceno tenham tido origem da fauna norte americana. A partir do Mioceno, e também no Plioceno, não se encontram mais fósseis de marsupiais na América do Norte, assim como em nenhum outro continente, além do australiano (Simpson, 1969). Apesar da diversidade sul americana também ter reduzido a partir do Eoceno, os representantes que aqui sobreviveram ficaram isolados por um longo período de tempo. É só no início do Pleistoceno, com o soerguimento do Ístimo do Panamá, que o norte e sul das Américas se conectam novamente. Independente da visão de G.G. Simpson, que diz que a troca de faunas foi uma e grande logo no início do Pleistoceno, ou da contrapartida de Hershkovitz (1969), que diz o isolamento não era necessariamente uma barreira para muitos mamíferos, ou que a barreira climática das zonas temperadas poderia ser mais crítica do que a distância em si, o fóssil de *Didelphis* acima citado provavelmente tem origem do retorno dos marsupiais à América do Norte (ver, por exemplo, Clemens (1968); Szalay (1994)). A propósito, *D. virginiana* é o único marsupial encontrado atualmente na América do Norte.

A diversificação do gênero *Didelphis* parece envolver eventos mais recentes quando comparados aos outros didelfídeos. No trabalho de Patton and Costa (2003), a divergência genética (distância de Kimura 2-parâmetros, ou K-2p) dos gêneros desta família mostram em média 14% de divergência. Em *Didelphis*, essa estimativa é de 9,5%. Como Patton et al. (1996) mostram que a taxa de evolução do citocromo B em Didelphidae se comporta segundo a hipótese de relógio molecular (*i.e.*, taxas constantes ao longo do tempo de divergência entre linhagens), tira-se a conclusão de que a baixa divergência genética é resultado de eventos de especiação recentes, dentro dos últimos 2,5 Maa (Patton and Costa, 2003).

As espécies neotropicais e, especificamente, as florestais *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 e *D. aurita* Wied, 1826 já foram consideradas por alguns autores como sendo uma espécie só, *D. marsupialis* (*e.g.* Cabrera (1957); Walker et al. (1964); Hershkovitz (1969)). Gardner (1993) já considerava em seu catálogo que *D. aurita* (Mata Atlântica) é uma espécie diferente de *D. marsupialis* (Amazônia), como postulado por Cerqueira (1985) (ver na Fig. 1.4 a distribuição disjunta das duas espécies publicada neste último trabalho). Posteriormente, Cerqueira and Lemos (2000) reforçam que são duas espécies alopatricas e distintas morfologicamente, separadas através de análises de morfometria tradicional craniana, mesmo com a observação de que características morfológicas qualitativas (por exemplo, a pelagem e cor da orelha) não são diagnósticas. No mesmo ano, Patton et al. (2000) mostra com o gene mitocondrial citocromo B que, apesar da divergência genética (K-2p) entre as duas espécies ser moderada (2,9%), a monofilia do grupo suporta a idéia de duas linhagens distintas. Em trabalho subsequente, Patton and Costa (2003) chegam numa divergência similar (3,04%) entre as espécies. Apesar de Cerqueira and Lemos (2000) apenas sugerirem que as duas espécies estão isoladas reprodutivamente, eles acreditam que a separação nos diferentes biomas é suficiente para ter provocado divergência entre estes dois grupos. Consideraremos, então, *D. aurita* como uma espécie distinta de *D. marsupialis*, assim como Cerqueira and Tribe (2008) recentemente as classificam.

O gambá de orelha preta *D. aurita* é também conhecido por outros nomes populares brasileiros como: sariguê, sariguê, saruê ou sarigueia (Bahia); timbú ou cassaco (Pernambuco ao Ceará), ou micurê (Paraguai e Mato Grosso) (Emmons and Feer, 1997). São primariamente terrestres, mas escalam bem e até nadam (Santori et al., 1995). São onívoros e oportunistas, com dieta variada comendo frutas, invertebrados e pequenos

Figura 1.4.: Distribuição do grupo florestal *marsupialis*, composta por *D. aurita* e *D. marsupialis*; e do grupo de campos abertos *albiventris*. Esta figura foi produzida com base em dados de 1.400 ocorrências em museus, sobreposta a mapas climáticos e de vegetação de 288 localidades destes mesmos espécimens (ver Cerqueira (1985)). Reproduzida sob autorização do autor (R. Cerqueira).

vertebrados (preferencialmente os dois últimos itens), mostrando o uso do habitat pelo seu hábito escansorial (Cordero and Nicolas, 1987; Julien-Lafférière and Atramentowicz, 1990; Santori et al., 1995; Leite et al., 1996). São, junto com as outras espécies do gênero, os maiores marsupiais neotropicais (por exemplo, em Leite et al. (1996): 847 ± 290 g para *D. aurita*). São solitários, noturnos e florestais, comumente associados a cursos d'água (Emmons and Feer, 1997), apesar de não ser difícil encontrá-los em cidades.

A biologia reprodutiva do gambá é razoavelmente bem conhecida. *Didelphis* é um gênero poliestral, sendo que o ciclo estral dura de 25 a 32 dias (Tyndale-Biscoe and Mackenzie, 1976). Como todos os marsupiais, o período de gestação é bastante curto quando comparado a um placentário (Smith, 1997), e no caso dos gambás dura em torno de 13 dias, sendo a gestação mais curta de todos os mamíferos (Walker et al., 1964). Quando o recém nascido sai do útero, ele continua seu desenvolvimento lactando no marsúpio durante aproximadamente 90 dias e passa um período de oito a 15 dias no ninho, enquanto a mãe forrageia por comida; o cuidado parental é apenas materno. Assim, no caso mais extremo, após quatro meses o filhote já é independente, sendo que as fêmeas ficam maduras sexualmente entre os seis a sete meses de idade

(Julien-Laffèrire and Atramentowicz, 1990). Cada fmea pode ter de quatro a sete filhotes por ninhada, e consegue reproduzir at duas vezes ao ano (Julien-Laffrire and Atramentowicz, 1990). Tyndale-Biscoe and Mackenzie (1976) no encontrou correlao entre o tamanho da ninhada com a idade da me; ao invs, o tamanho da ninhada determinado pelo nmero de tetas na me (o trabalho compara as diferentes espcies de *Didelphis*, que possuem nmeros distintos de tetas, sendo nove em *D. marsupialis*). Note que o nmero da ninhada menor que o nmero de tetas, havendo um gradiente postero-anterior no desenvolvimento das glndulas mamrias, dependente do estado nutricional da me.

Enquanto a espcie norte americana tem sua reproduo influenciada pela latitude (em janeiro nas latitudes mais baixas e fevereiro a maro nas mais altas), as espcies de *Didelphis* neotropicais apresentam sazonalidade na reproduo, sendo correlacionada com a poca de chuvas e, portanto, a disponibilidade de recursos (Tyndale-Biscoe and Mackenzie, 1976; Julien-Laffrire and Atramentowicz, 1990). Em um trabalho recente, Mendel et al. (2008) mostram a influncia da disponibilidade de recursos, em um ciclo retroativo da densidade populacional com a biomassa das fmeas. Quantificando a precipitao e queda de folhas (como evidncia da quantidade de recursos) durante cinco anos, os autores observaram que quando os recursos eram mais disponveis, a densidade populacional aumentava com reduo da biomassa de fmeas. Quando os recursos eram menos disponveis, o quadro inverso ocorria. Os machos no respondem precipitao, e credita-se essa ausncia de correlao diferena entre os sexos quanto vagilidade. Os machos se movem muito mais do que fmeas (Loretto and Vieira, 2005), e portanto devem ser mais influenciados por eventos ambientais estocsticos (como variao diria na obteno de recursos, predao e doenas). A propsito, Loretto and Vieira (2005) mostram que existe uma diferena marcada no comportamento de machos e fmeas. Este trabalho quantificou o movimento dirio de machos e fmeas utilizando a tcnica de *spool and line* em animais capturados e recapturados tambm durante cinco anos. Na estao reprodutiva, os machos chegam a se mover a distncias de 2.100 m², enquanto que as fmeas se movem apenas 1.600m² (mdia = 1.868±55 m²). Na estao no-reprodutiva, os machos movem at 1.300m² e as fmeas 1.200m² (mdia = 1,266 ±58m²). Pode-se ver que os machos, como j dito, se movem mais que fmeas, e se movem menos intensamente na estao reprodutiva. O movimento das fmeas no se associa estao reprodutiva, residindo por mais tempo em um mesmo local. Apesar da menor movimentao, as fmeas se movem mais na estao seca devido menor disponibilidade de recursos. Alm disso, no s na mobilidade a espcie apresenta dimorfismo, mas tambm em medidas cranianas (ver, por exemplo, Shirai and Marroig (submetido), em anexo).

Por ltimo, no tambm recente trabalho de Kajin (2008), agora acompanhando os gambs por quase 10 anos, o tempo de gerao calculado como sendo o tempo de reposio populacional, ou a idade mdia em que todas as fmeas esto tendo suas ninhadas (Kajin (2008), p.33), resultando em um tempo mdio de 330,7 dias.

1.4. As abordagens: biogeografia e filogeografia

O contexto em que os organismos vivem, tanto no tempo quanto no espao, determina fortemente o destino histrico das linhagens biolgicas. A biogeografia tradicional nasceu da necessidade de explicar essa intrincada relao da distribuio das espcies com sua histria e como isso, ao longo do tempo, determina a diversificao das

mesmas. A grande pergunta da biogeografia até hoje é “por que os organismos estão distribuídos como eles estão hoje?”.

Já no início do século XIX, o botânico suíço Augustin de Candolle propõe uma separação que busca responder a pergunta segundo duas vertentes: uma que lida com eventos ocorridos no passado (biogeografia histórica), e outra que trata da influência de fatores atuais (biogeografia ecológica) (Ebach and Goujet, 2006). Enquanto essa separação tem extrema validade em termos teóricos, o que gradativamente aconteceu na história da biogeografia foi a separação da própria Biogeografia. Isso, por si mesmo, não significa necessariamente uma perda de poder explicativo, não fosse o fato de que muitas vezes uma das vertentes não leva em conta a outra, e vice-versa. Desconsiderar a relação histórica entre os grupos em questão pode levar a uma falsa evidência de ausência do efeito analisado quando uma das linhagens responde ao efeito de uma forma, e a linhagem irmão responde de forma oposta. Além de que devem ser raros os exemplos biológicos cuja distribuição atual não seja afetada por algum evento geológico ou climático passado. Por outro lado, buscar explicar a distribuição *atual* de um grupo evocando apenas os eventos passados pode deixar de lado fatores que influenciam hoje a distribuição encontrada, e que não são necessariamente os mesmos do passado. Dentre eles, a latitude como reflexo do clima (regra de Bergmann), a longitude, a altitude, ou o próprio efeito antrópico, influenciam a ecologia do organismo que, por sua vez, influencia na sua distribuição. A história biogeográfica de uma espécie só pode ser entendida quando ambos são considerados.

Dessa forma, a estratégia aqui adotada foi de primeiramente descrever a variação geográfica levando em conta a influência de fatores atuais sobre a distribuição da espécie. Isso se faz tanto para o nível morfológico quanto molecular. Apesar de longe do ideal, se um padrão da variação geográfica for similar na morfologia, recuperada através de medidas cranianas, e na variação do marcador mitocondrial citocromo B (cytB), a congruência em dois níveis de organização biológica pode dar uma idéia mais próxima da história biogeográfica da própria espécie *D. aurita*.

Em um segundo momento, eventos passados são explorados através de análises filogeográficas. A hipótese nula é a de ausência de efeito (ou pelo menos do sinal) das glaciações. Assim, o esperado é de que a divergência entre populações seja explicada basicamente por isolamento por distância, ou seja, quanto maior a distância, maior as diferenças. Caso este não seja o quadro da diversidade genética em questão, espera-se encontrar as assinaturas genéticas dos refúgios a partir de testes a três predições, baseadas principalmente em expansão demográfica (Lessa et al., 2003; Emerson et al., 2001): [1] falta de estruturação geográfica, [2] excesso de haplótipos únicos (alelos raros) e [3] sinais de expansão demográfica datadas do Pleistoceno.

Imagine que a distribuição de um animal florestal pudesse ser explicada por isolamento por distância. Com a retração florestal num período glacial, as populações desta espécie teriam sido fragmentadas. Num momento seguinte, interglacial, com a expansão florestal e conseqüente expansão da espécie, apesar de as populações descendentes se manterem em locais relativamente próximos do refúgio, supõe-se que os refúgios em si tenham se formado dispersamente de forma que, em uma escala maior, o que se vê hoje é um embaralhamento na diversidade genética. Isso justifica o esperado pela primeira previsão. A quebra na distribuição, rearranjando-a no momento de expansão faz com que na distribuição atual não haja associação do aumento de divergência molecular com aumento da distância geográfica. Em outras palavras, não há estruturação geográfica.

A segunda predição se baseia no fato de que a expansão demográfica faz o tamanho

populacional aumentar, implicando num efeito reduzido de deriva genética, o que permitiria a manutenção de mutações raras na espécie como um todo. É importante notar aqui que as populações descendentes de cada refúgio teriam haplótipos únicos em frequência similar ao longo de toda a distribuição da espécie, ou pelo menos na maioria delas. Isso é relevante para a terceira previsão, que espera que os tempos de divergência médios entre as populações datem do Pleistoceno. Mas porque cada ciclo glacial embaralha a distribuição genética anterior isso implica que, se de fato a espécie é afetada pelas glaciações e se isolou nos refúgios expandindo no período interglacial subsequente, a cada ciclo os sinais anteriores são apagados. E principalmente quando se considera que o último período glacial foi se não o mais, pelo menos um dos mais drásticos de todos os ciclos pleistocênicos (ver na Fig. 1.2), é razoável esperar que o sinal de expansão deva datar dessa época. Olhando o outro lado da mesma moeda, se algum outro evento pleistocênico afetou a distribuição de um organismo, todos os ciclos subsequentes não podem ter deixado nenhuma assinatura (inclusive o último), isto é, não deve ter afetado o mesmo organismo antes foi influenciado por um ciclo glacial. A última máxima glacial ocorreu há aproximadamente 21.000 anos atrás (*e.g.*, Mayle et al. (2004)), se estendendo até 15.500 anos atrás. O sinal de expansão deveria vir do interglacial que segue o período glacial, mas considerando um possível erro da estimativa, estabeleceremos que o tempo de divergência deva datar de pelo menos 20.000 anos.

A filogeografia é um ramo recente dentro da biogeografia. O termo foi cunhado no final da década de 80 por Avise et al. (1987) e pode ser definido como “o campo de estudo que lida com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genéticas, especialmente aquelas dentro e entre espécies proximalmente relacionadas” (Avise (2001), pp. 3). Os estudos filogeográficos começam com marcadores mitocondriais devido a algumas vantagens que o DNA desta organela apresenta: apesar de variável, está amplamente espalhada em uma variedade de organismos, permitindo comparações mesmo entre grupos distantes filogeneticamente; é de fácil isolamento e amplificação; possui uma estrutura genética simples sem complicações como DNA repetitivo, elementos transponíveis, pseudogenes e íntrons; não apresenta recombinação nem outros rearranjos genéticos; e devido à sua herança matrilinear e conseqüente menor tamanho efetivo, quando comparado a marcadores nucleares revela uma história relativamente mais recente das espécies (Avise et al. (1987), pp. 492). O genoma mitocondrial animal possui uma única molécula de DNA circular, com cerca de 15-20.000 pares de base (pb), contendo genes que codificam para dois RNAs ribossomais (RNAr), 22 RNAs transportadores (RNAt) e 13 RNAs mensageiros (RNAm) responsáveis pela síntese de proteínas da respiração celular. Revisões mais recentes sobre o uso de diferentes marcadores moleculares para estudos de diversidade e Genética de População podem ser encontrados em Sunnucks (2000) e Anne (2006).

A abordagem clássica da filogeografia é muito similar à da escola da Biogeografia Cladística, em que se sobrepõe a filogenia da espécie ou grupo de espécies sobre seu mapa de distribuição. A única diferença é de que ao invés de uma filogenia morfológica, a árvore filogenética colocada sobre o mapa é a do gene, possibilitando tratar da divergência de populações dentro de uma espécie. Apesar de bastante informativa, com apenas essa abordagem não é possível distinguir entre os processos históricos e atuais, uma vez que padrões filogeográficos muito similares podem ser produzidos por processos não necessariamente ligados (Templeton et al., 1995; Hoffman and Blouin, 2004; Cheviron et al., 2005). Entretanto, com posterior desenvolvimento dessa idéia, unida à novas proposições de modelos baseados em conceitos da Genética de Popula-

ções, construiu-se um corpo teórico que hoje é conhecido como Teoria da Coalescência (Kingman, 1982).

A recuperação da genealogia via coalescência depende da amostragem de determinadas linhagens genéticas que ocorre tanto pelo processo biológico de deriva quanto pelo próprio sorteio de amostras da população. A formalização estatística probabilística dos modelos se torna inevitável; no entanto, este aspecto não será tratado em detalhes aqui. O que vale ressaltar dessa abordagem é que a busca não é a genealogia que explica a história exata das linhagens, mas sim os fatores que influenciam essa história, tais como seleção natural, deriva genética, demografia, entre outros.

A teoria da coalescência é um corpo teórico do qual é possível obter diversos estimadores que recuperam a história demográfica das populações. A partir da escolha de algum marcador que potencialmente responde à pergunta de interesse, informações como o tempo de divergência, tamanho efetivo da população ancestral, etc. podem ser obtidos. O entendimento das causas que afetam a distribuição dos organismos é avaliada pelo quanto a variação encontrada desvia de modelos nulos onde, no geral, apenas deriva genética atua. Assim, o desvio ao modelo nulo indica que algum de seus pressupostos foram violados e, então, investiga-se as possíveis causas que geraram o padrão encontrado. Um resumo mais abrangente e formal pode ser encontrado em Tavaré (1984); Hartl (2000); Edwards and Beerli (2000)) mas, basicamente, o modelos nulos tem os seguintes pressupostos:

(1) Panmixia: todos os indivíduos possuem igual chance de se reproduzir e que a proporção de machos e fêmeas é igual na população.

(2) Evolução neutra: a maioria das mutações são seletivamente neutras, justificando o alto grau de polimorfismos que pode ser encontrado em populações biológicas (não condizente com a antiga expectativa de apenas ação de seleção natural). Seguem as previsões do Modelo de Wright-Fisher baseado em evolução por apenas deriva genética (Kimura, 1968; Ohta and Gillespie, 1996).

(3) Modelo de sítios infinitos: uma extensão do Modelo de Alelos Infinitos (Kimura and Crow, 1964)), sob o qual toda nova mutação gera um novo alelo em um locus não mutado. Esse modelo facilita o tratamento das estimativas que envolvem mutação, já que as mutações ficam em equilíbrio com a redução de variação provocada por deriva genética.

(4) Ausência de recombinação intragênica entre loci, apesar de permitir haver entre genes independentes (McVean et al., 2002).

2. Material e Métodos

De forma a descrever a variação geográfica, tanto morfológica quanto molecular, em primeiro lugar utilizou-se das localidades como grupos, ou “populações”, para as comparações par-a-par. Uma outra estratégia agrupou localidades em um nível hierárquico maior, unindo-as em faixas de latitude e longitude ao longo da distribuição das amostras. Decidiu-se nesse trabalho adotar intervalos de cinco em cinco graus para a latitude (denominados A, B, C e D) e longitude (1, 2, 3 e 4). A partir disso, criou-se também quadrantes (A1, A2, B1, B2, etc.) simplesmente pela intersecção dos dois anteriores, dando oportunidade de detalhar mais a geografia subjacente (estes serão referidos adiante como latlong). Note que este método de quadrantes permite uma comparação direta entre os dados de distância morfológica e molecular com a distância geográfica. Uma limitação deste trabalho, principalmente para esta comparação, é de que os dados morfológicos não provêm dos mesmos espécimens que os dados genéticos. Entretanto, essa ausência de correspondência dos dados não interfere quando se busca descrever a variação geográfica da espécie dentro destes dois níveis, como foi feito.

A partir do mapa com os quadrantes, então, as amostras foram classificadas e a construção de matrizes de distância latitudinal e longitudinal foi feita da seguinte maneira: cada faixa é representada pela média das localidades nela presentes, e a distância entre faixas é dada simplesmente pela diferença das médias. A matriz de distância geográfica (em km) foi feita com o programa GeoDis (Posada et al., 2000) para todas as localidades e, a partir desta matriz, foi calculada a média das comparações par-a-par das localidades de cada grupo (exemplo, de todas as comparações de A1 com todas de B1). As matrizes foram então comparadas através de um teste de Mantel (9999 permutações). Os mapas de distribuição serão apresentados nas próximas seções, junto com detalhes de cada abordagem. Os estados brasileiros serão citados através de suas respectivas abreviações.

2.1. Biogeografia

2.1.1. Amostras morfológicas

Os dados cranianos dos 342 espécimens do trabalho de Cerqueira and Lemos (2000), que elevam ao nível de espécie *D. aurita*, foram gentilmente cedidos por B. Lemos para serem utilizados nas análises biogeográficas. Contudo, as 18 medidas cranianas por eles definidas (Fig. 2 deste mesmo trabalho) possuem alta correlação entre si. A razão pela qual isto impõe um problema é de que as medidas precisam ser informativas quanto aos processos biológicos que elas refletem. Se duas ou mais medidas são redundantes ou se sua variação não pode ser associada a algum processo funcional, ontogenético ou filogenético, além de prejudicar a significância das análises, elas não aprimoram a interpretação dos dados. A redundância das medidas foi detectada comparando seus valores de correlação. Se apresentarem alta correlação entre si e mostrarem um padrão de correlação similar em relação a todas as outras medidas, uma dessas duas medidas, ou eventualmente mais, são retiradas. Dessa forma, 11 das 18 medidas compõe a base

Tabela 2.1.: Definição e descrição das 11 medidas cranianas utilizadas neste estudo, assim como determinadas em Cerqueira and Lemos (2000). Apesar de as siglas provirem de abreviações na língua inglesa, decidiu-se mantê-las como no artigo original (as definições nesta língua aparecem entre parênteses).

Sigla	Definição	Descrição
BAM (<i>Breadth across molars</i>)	Largura entre molares	Maior distância entre os quartos molares
BPS (<i>Breadth of palatal shelf</i>)	Largura do palato	Maior distância no espinho nasal posterior
CAN (<i>Breadth across canines</i>)	Largura entre caninos	Sutura entre pré-maxila e maxila no alvéolo
GBN (<i>Greatest breadth of nasals</i>)	Maior largura entre nasais	Sutura entre nasal, frontal e maxila
GLS (<i>Greatest length of the skull</i>)	Comprimento total do crânio	Extremidade do nasal com a extremidade do supra-occipital
MAX (<i>Length of maxillary toothrow</i>)	Comprimento da série de dentes maxilares	Extremidade anterior do canino com a extremidade posterior do quarto molar
NAS (<i>Length of nasal</i>)	Comprimento do nasal	
POC (<i>Postorbital constriction</i>)	Constrição pós-orbital	Menor largura da região pós-orbital
ROS (<i>Breadth of rostrum across jugals</i>)	Largura do rostro entre jugais	Sutura entre jugal, lacrimal e maxila
SM (<i>Length of upper molar series</i>)	Comprimento da série molar superior	Extremidade anterior do primeiro molar com a extremidade posterior do quarto molar
SMI (<i>Length of lower molar series</i>)	Comprimento da série molar inferior	Extremidade anterior do primeiro molar com a extremidade posterior do quarto molar na mandíbula

de dados morfológicos (Tabela 2.1 e Fig. 2.1). Vale ressaltar, entretanto, que a base de dados de B. Lemos possui ampla distribuição em toda a Mata Atlântica (Fig. 2.2).

O teste de Lilliefors foi realizado para detectar desvios de normalidade, pressuposto para muitas das análises subseqüentes, e todas as medidas possuem distribuição normal. Esta e as próximas análises foram realizadas com o programa SYSTAT 11 (SPSS Inc., 2004). Dado que *D. aurita* apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos maiores do que as fêmeas, esse foi analisado através de análises de variância multivariadas (*Wilks' λ*, *Pillai Trace* e *Hotelling-Lawley Trace*) dentro da rotina do “Modelo Geral Linear” do SYSTAT. Como os três testes multivariados para dimorfismo mostraram a influência desse fator na variação da espécie ($P < 0,0001$), machos e fêmeas foram tratados separadamente.

Outra observação quanto aos dados provenientes de B. Lemos é de que muitos dos espécimens possuíam algumas das medidas sem dado. Sendo assim, foi feita uma estimativa desses valores faltantes através do primeiro componente principal (PC1) através de uma Análise de Componentes Principais sobre a matriz de variância/covariância ponderada para sexo, geografia e a interação desses dois fatores (geografia classificada segundo os diferentes estados brasileiros). A importância de utilizar uma matriz ponderada é que só assim se pode atribuir a variação observada nas distâncias morfológica à variação em questão, e não a que potencialmente pode vir destes fatores. Note que

Figura 2.1.: Crânio de *D. aurita* (MZUSP 27247) em visão dorsal (esquerda) e ventral (direita) ilustrando as 11 medidas cranianas utilizadas neste estudo, correspondente à Fig. 2 do trabalho de Cerqueira and Lemos (2000). Definições estão presentes na Tabela 2.1, sendo que SMI corresponde à mesma medida que SM, porém da maxila inferior. Crânio fotografado e aqui utilizado sob permissão do curador M. de Vivo.

a ponderação para geografia não altera a média de cada medida, e sim sua covariação; e que a matriz é calculada a partir dos indivíduos que não possuem dados faltantes. A interação de sexo e geografia, quando significativa, é necessária pois a variação geográfica pode afetar diferentemente cada sexo. A estimativa das medidas faltantes se baseia na regressão múltipla dos escores dos indivíduos com dados faltantes com os autovetores do PC1 provenientes da matriz de variância/covariância acima produzida.

2.1.2. Variação geográfica

As diferenças entre as populações de *D. aurita* foram exploradas através da Análise Discriminante (AD) de função linear, com a estatística multivariada de (*Wilks' λ* para avaliar a significância das funções discriminantes. A partir da porcentagem de classificação da AD (originais e pelo método de *jackknife*), pode-se ter uma idéia do quão confiável é esse critério de classificação (Marroig and Cheverud, 2004; Klecka, 1980). Quando essas duas porcentagens são similares, o critério é consistente, e a porcentagem dá uma idéia do quanto o critério explica diferenciação dentro da distribuição encontrada. Caso o critério não seja suficiente, a porcentagem original será muito maior à reamostrada por *jackknife*. Contudo, note-se que essas porcentagens também podem apresentar valores distintos devido a baixo número de amostra dentro de um ou dos dois grupos.

As distâncias morfológicas entre as populações foram medidas através da distância de Mahalanobis (D^2) entre os centróides dos grupos. Matrizes de D^2 foram construídas tanto para os grupos definidos pelas localidades, assim como para os quadrantes, e correlacionadas à matrizes de distâncias geográficas através do teste de Mantel. Correlaciona-se também as matrizes de distância morfológica definidas para os quadrantes com as matriz de distância genética igualmente definidas para os quadrantes.

Figura 2.2.: Mapa da distribuição das amostras de crânio. O método de quadrantes utilizado classifica as populações de cinco em cinco graus para latitude (B, C, D, E), longitude (1, 2, 3, 4) e a combinação de ambos (B1, C1, C2, etc.). Números das localidades listados no Gazetteer (Tabela A.1, em anexo).

Além disso, porque sabe-se de antemão que o PC1 corresponde à variações de tamanho em *D. aurita*, e que a evolução de tamanho é importante dentro da família Didelphidae (Shirai and Marroig, submetido), explorou-se se a variação geográfica corresponde a variações no tamanho do crânio. A primeira abordagem para tal foi analisar os dados originais e corrigidos para tamanho (a serem chamados de originais e Y, respectivamente), sendo que no caso de a variação ao longo da geografia ser de tamanho, os sinais de estruturação geográfica reduzem ou desaparecem nos dados corrigidos. A correção foi feita através do método MASS (do inglês, *Multivariate Allometric Size Scaling*), modificado de Lleonart et al. (2000) por Marroig and Cheverud (2004). Para aplicá-la, os dados originais foram transformados no seu logaritmo natural e os escores do PC1 de cada medida foram regredidos sobre o PC1 de todas as medidas. A correção Y^*i é derivada da equação teórica de crescimento alométrico, e pode ser descrita como:

$$Y^*i = Yi[Xo/Xi]^b$$

sendo Yi o valor original da medida no indivíduo i , Xo é a média do *antilog_e* dos escores do PC1 para esta mesma medida, Xi o *antilog_e* do escore do PC1 no indivíduo i , e b o coeficiente do PC1 da medida (equação original corresponde à equação (13) de Lleonart et al. (2000)). Os escores do PC1 podem ser entendidos como uma métrica do tamanho do crânio. Dessa forma, a segunda abordagem foi simplesmente analisar como os escores variam em cada grupo definido.

Adicionalmente, além do critério de quadrantes, dois outros critérios de agrupamento foram feitos. O primeiro separa a distribuição nas localidades que estão próximas à

borda da floresta e as que não (Fig. 2.3). Esse critério foi utilizado para acessar a influência do ecótono entre a Floresta Atlântica e o cerrado *latu sensu*. O segundo critério se baseia também numa Análise de Componentes Principais, mas dessa vez feita sobre a variação da latitude e longitude de todos os indivíduos. Reduzindo latitude e longitude em uma única variável não só torna o entendimento dos resultados mais simples, mas também resume a variação das faixas latitudinais e longitudinais em um eixo diagonal entre elas. O PC1 corresponde a 87,84% da variação total das fêmeas, e 88,48% dos machos; e a correlação com as variáveis de latitude e longitude originais são de 0,937 para fêmeas e de 0,941 para machos.

Para criar os grupos ao longo deste eixo diagonal, um método de variação geográfica simples foi empregado através do qual, em um primeiro momento, atribuiu-se visualmente quebras entre os escores do PC1. Por exemplo, o indivíduo 1 possui um escore de 1,75 neste PC1 da latitude e longitude. Os próximos dez indivíduos possuem todos escores de 0,98 (estes provêm de uma mesma localidade, mas diferente do indivíduo 1). Atribui-se uma quebra entre o primeiro (grupo 1) e os próximos dez indivíduos (grupo 2). Então, através de uma Análise de Variância (ANOVA) entre o grupo 1 e 2, usando as medidas originais e sem tamanho (Y) de cada indivíduo sabe-se se o grupo 1 e 2 se diferenciam significamente. Caso eles não se diferenciem, os grupos 1 e 2 passam a ser o mesmo; caso sim, eles são mantidos separados. Prossegue-se para a próxima quebra nos escores do PC1, e novamente testa-se com uma ANOVA a diferenciação entre os dois novos grupos, e assim por diante. Depois de determinados os grupos, uma ANOVA é realizada para todas as medidas, e também para os escores do PC1, entre os grupos. A figura 2.4 mostra como os oito grupos formados tanto para fêmeas quanto para machos se comportam ao longo das latitudes e longitudes, ilustrando como os grupos mapeiam a geografia da Floresta Atlântica. Note que existe sobreposição de alguns grupos ao longo da geografia.

Usando os grupos classificados pelos escores do PC1 (diagonal), foi realizada uma ANOVA a fim de quantificar para cada medida, com e sem tamanho, se há diferenciação significativa entre grupos. Quando ela existe, o teste *pos hoc* de Tukey mostra para cada comparação entre grupos qual delas é a responsável por esta significância.

2.2. Filogeografia

2.2.1. Das amostras às seqüências

Dentre as 247 amostras de tecido obtidas para este trabalho (incluindo 27 *D. albiventris* e dois *D. marsupialis*), 118 correspondiam a orelha, intestino, pêlo, rabo e patágio; e outras 129 a fígado, todos conservados em álcool 95%. Os tecidos foram cedidos pelos seguintes pesquisadores (instituições abreviadas como na tabela A.1, em anexo): Prof. Dr. James Patton (MVZ), Prof. Dr. Mario de Vivo (MZUSP), Prof. Dr. Miguel Trefault e Profa. Dra. Yatiyo Yassuda (IBUSP), Profa. Dra. Renata Pardini (IBUSP), Prof. Dr. Rui Cerqueira (UFRJ), Profa. Dra. Lena Geise (UERJ), Profa. Dra. Valéria Fagundes (UFES), Profa. Dra. Leonora Costa (UFES), Prof. Dr. Alexandre Percequillo (UFPA), e Prof. Dr. Diego Astúa de Moraes (UFPE); sem a colaboração dos quais este trabalho não teria sido possível. O DNA total foi extraído com sucesso apenas dos tecidos de fígado, a partir do protocolo de extração salina (Aljanabi and Martinez, 1997). O kit de extração CST gDNA Mini tissue kit (Invitrogen, Estados Unidos) foi testado, uma vez que ele maximiza a quantidade de DNA obtida de pequenos fragmentos ou, como no caso, de tecidos pobres em material nucleico; com

Figura 2.3.: Distribuição dos grupos formados através da classificação de ecótono, separando as localidades que se situam próximas ao encontro da Floresta Atlântica com o cerrado, em azul. A distribuição da Floresta Atlântica encontra-se em verde, e as localidades consideradas dentro dela em vermelho.

Figura 2.4.: Distribuição dos grupos formados através da classificação sobre os escores do PC1 da latitude e longitude (diagonal) para fêmeas (à esquerda) e machos (à direita).

Tabela 2.2.: Seqüência dos iniciadores utilizados nesse trabalho. Bases degeneradas segundo o Código de Ambigüidade IUPAC. Iniciadores MVZ23 e MVZ45 modificados de Smith and Patton (1993). A direção *forward* ou *reverse* está indicada por 5' → 3' e 3' → 5', respectivamente.

Iniciadores	Seqüência
MVZ 05	5' CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G 3'
MVZ 14	3' GGT CTT CAT CTY HGG YTT ACA AGA C 5'
MVZ 23	5' TAC TCT TCC TCC ACA AAG CYA CMC 3'
MVZ 45	5' ACA GCH ATA GCY ACA GCA TTC GTA GG 3'

um controle positivo de uma amostra de fígado já extraída com o protocolo salino. No entanto, apenas alguns dos tecidos de fígado (recebidos em pequenas quantidades e extraídos com baixa qualidade através do protocolo salino) obtiveram sucesso na extração por este método.

As amplificações foram realizadas através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, PCR). Em nenhum dos casos foi necessário clonagem para amplificar os fragmentos. Lemos et al. (1999) reportam a presença de pseudogenes do genoma mitocondrial (incluindo o *cytB*) no genoma nuclear, no entanto o produto da amplificação por PCR resultou em apenas uma banda de 1200pb para todos os casos, e nenhum outro fragmento menor. Conferindo as seqüências obtidas com o banco de dados disponível publicamente (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), todas correspondem ao fragmento desejado, portanto isto não deve apresentar nenhum problema.

Os iniciadores utilizados foram desenhados por Smith and Patton (1993) para roedores, e posteriormente aplicados em marsupiais didelfídeos por Patton et al. (1996). Os iniciadores MVZ05 e MVZ14 (amplificação em ambas as direções, Tabela 2.2 e Fig.2.5) geram uma seqüência de 1146-1200pb, correspondente à cadeia leve completa do *cytB*, posicionada portanto no início do *cytB*, no gene de RNAt de ácido glutâmico (MVZ05); e no final do *cytB*, no gene de RNAt de treonina (MVZ14). Além disso, dois iniciadores internos (MVZ23 e MVZ45, Tabela 2.2) foram escolhidos do mesmo trabalho (Smith and Patton, 1993) e ligeiramente modificados para aumentar a especificidade com *D. aurita*. O primeiro iniciador interno gera um fragmento de 800pb, iniciando na posição 561 do *cytB*; e o segundo produz um fragmento de 850pb, iniciando em 402pb (Fig.2.5).

A amplificação por PCR seguiu o seguinte protocolo: tampão para PCR [1x], cada dnTP a [0,4mM], cada iniciador (MVZ05, MVZ23 ou MVZ45 *forward*, e MVZ14 *reverse*) a [2μM], cloreto de magnésio a [2,5mM], Taq polimerase a [2U], completando com água milliQ em volume total de 50μl. As condições para a termociclagem foram: denaturação inicial a 95°C por 5min, seguido de 35 ciclos de denaturação a 95°C por 40s, hibridização a 55°C (MVZ05 e MVZ23) ou 59°C (MVZ45) por 40s, extensão a 72°C por 30s, finalizando com uma extensão a 72°C por 5min. A concentração do DNA deveria ser suficiente para resultar em um produto purificado a [60ng/μl], [40ng/μl], e [50ng/μl], respectivamente para cada iniciador, conferido com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Estados Unidos) sob luz ultravioleta em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Alemanha) e seqüenciados na direção *forward* com o DYE-

Devido à dificuldades em amplificar determinadas amostras e também a porção inicial do marcador (primeiros 60pb), ao final, 88 indivíduos com 600pb foram seqüenciados nesse trabalho. A razão pela qual determinou-se este total de pares de base foi de possibilitar a inclusão de sete seqüências de *D. aurita* (com apenas 660pb) cedidas por J. Patton, provenientes de localidades diferentes das obtidas através dos tecidos. J. Patton também cedeu seqüências de sete *D. virginiana* e 27 *D. marsupialis*. Além disso, Kajin (2008) seqüenciou o cytB inteiro de 81 amostras de *D. aurita* do estado do Rio de Janeiro, e reporta que a região inicial do gene é uma região bastante variável. Deste mesmo trabalho, foram cedidas 52 seqüências presentes em três localidades do estado (Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu). Além disso, 13 outras seqüências provenientes do Genbank para espécies de *Philander opossum* e também *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. virginiana* foram utilizadas como grupos externos. Totalizando então as amostras deste trabalho (88) com as de J. Patton (41), M. Kajin (52), e do Genbank (13) temos então 194 indivíduos, sendo nove *P. opossum*, oito *D. albiventris*, 30 *D. marsupialis*, oito *D. virginiana* e portanto 139 *D. aurita* (Anexo 1, Fig. 2.6).

Figura 2.6.: Mapa do continente americano ilustrando a distribuição dos indivíduos de *Philander opossum*, *D. marsupialis*, *D. virginiana*, *D. albiventris* e *D. aurita* cujas seqüências do cytB foram estudadas.

2.2.2. Análises filogenéticas

Um dos primeiros passos de uma análise filogeográfica é estabelecer grupos em que se imagina existir um fator comum subjacente, no geral determinados *a priori* segundo critérios biogeográficos que se adequem à pergunta em questão. Apesar de nesse trabalho ter sido adotado o critério de quadrantes para descrição da variação geográfica, busca-se especificamente detectar estruturação geográfica ao longo da distribuição de *D. aurita*, e também identificar se fatores históricos ou contemporâneos influenciam a distribuição encontrada. Sendo assim, o mais adequado é explorar a distribuição dos próprios haplótipos, sem também adotar uma estrutura de diferenciação pré-definida. A construção de árvores filogenéticas é uma ferramenta que permite avaliar estes dois aspectos sem a necessidade de um critério *a priori*. Mais ainda, é a partir dela que se pode identificar se algum agrupamento claro aparece nas relações entre os indivíduos, podendo definir eventualmente os grupos sobre os quais as análises filogeográficas são aplicadas.

A possibilidade de saturação na terceira posição dos códons, assim como em todas as posições, foi avaliada para transições (Ts) e tranversões (Tv) quantificando Ts e Tv e relacionando esses valores com as distâncias corrigidas entre os haplótipos para todas as espécies. Os gráficos de saturação podem ser facilmente produzidos com o programa DAMBE (Xia and Xie, 2001), e o sinal de saturação é visualizado como a estabilização da função tanto para Ts quanto para Tv.

As árvores filogenéticas foram construídas sob a abordagem de máxima verossimilhança. A estimativa dos parâmetros do modelo mutacional que melhor se adequa aos dados foi calculada através do programa ModelTest (Posada and Crandall, 1998). Os

parâmetros do melhor modelo foram então impostos à estimativa da árvore, feita com o programa PAUP beta version 4.0b10 (Swofford, 2002) através de uma busca heurística com o algoritmo *Tree Bisection Reconnection* (TBR), retendo em cada busca apenas uma árvore por réplica. A razão para este número de árvores retidas por réplica é porque se inicia com valores de verossimilhança resultantes de uma busca anterior sob o método de distância (*Neighbor Joining*), computacionalmente mais rápido. Esse procedimento otimiza a busca por fornecer valores de verossimilhança baixos já de início. Prosseguindo com a Máxima Verossimilhança, árvores com valores menores do que 5% da melhor verossimilhança obtida até o momento são descartadas antes de prosseguir com a busca. O suporte dos ramos das árvores foi avaliado pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), usando 1000 réplicas para a estimativa sobre árvores de *Neighbor Joining*, apresentando o resultado em uma árvore por consenso de maioria. As árvores são não-enraizadas mas, para melhor visualização das relações, estabeleceu-se *P. opossum* como a raiz. Como na estimativa da árvore a informação sobre a frequência de cada haplótipo é irrelevante, foram utilizados os próprios haplótipos neste caso (na estimativa do modelo mutacional, por outro lado, é necessário usar todos os indivíduos para a análise).

2.2.3. Análises intraespecíficas

As análises descritivas de diversidade das populações foram realizadas não só para caracterizar a história do marcador molecular, mas também para avaliar as predições de [1] falta de estruturação geográfica e [2] excesso de haplótipos únicos. Para isso, foi calculado: o número de sítios segregantes (S), o número médio de diferenças nucleotídicas (k), a diversidade nucleotídica (π), o número de haplótipos (h), e a diversidade haplotípica (Hd); calculados através dos programas DnaSP versão 4.0 (Rozas et al., 2003). As amostras de todas as localidades de *D. aurita* foram utilizadas, assim como as populações classificadas pelos quadrantes de latlong, como definidos na Fig. 2.7, e também classificadas pelos escores do PC1 da latitude e longitude (Fig. 2.8). Este PC1 corresponde a 87,13% da variação presente no conjunto de dados de 354pb e 85,98% para 600pb, e se correlaciona com as variáveis latitude e longitude originais com $r = 0,933$ e $0,927$, respectivamente.

A fim de aprofundar a exploração da predição [1], duas outras análises foram realizadas: Análise de Variância Molecular (em inglês, AMOVA) e Fst, ambas com o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al., 2005). A primeira (AMOVA) avalia a variância da divergência genética dentro e entre populações, apontando em qual dessas situações encontra-se maior parte da diversidade. Se o valor de AMOVA for maior dentro das populações do que entre, indica-se falta de estruturação geográfica. Já a segunda (Fst, ou coeficiente de endocruzamento ou diferenciação) avalia diferenças par-a-par entre as populações definidas, mostrando o grau de diferenciação entre os grupos testados. Sabendo da distribuição dos indivíduos de cada grupo, pode-se ter uma idéia de quão díspares geneticamente são duas regiões geográficas, independente de sua proximidade física. Assim, quando duas populações distantes não apresentam diferenciação significativa, isso pode ser um indício de fluxo gênico entre populações. Também estruturação geográfica pode ser avaliada através desta análise pelo oposto. Se localidades distantes apresentarem incrementos significativos nos valores de Fst, há estruturação geográfica baseada em isolamento por distância.

Uma ressalva importante quanto a esta última análise é de que o teste é sensível à presença de haplótipos únicos, mostrando significância numa comparação mesmo

Figura 2.7.: Separação das amostras de *D. aurita* em quadrantes de cinco em cinco graus de latitude (A, B, C, D, E) e longitude (1, 2, 3, 4).

Figura 2.8.: Distribuição dos grupos formados através da classificação sobre os escores do PC1 da latitude e longitude (diagonal) para o conjunto de dados de 354pb (à esquerda) e 600pb (à direita).

quando apenas um *singleton* é encontrado em uma população (Neigel, 2002). Isso implica que se de fato houver um excesso de haplótipos únicos, um sinal de estruturação aparecerá, contudo, como artefato da análise. Para explorar esta influência,

três localidades do RJ, Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu, as melhores amostradas neste trabalho ($n = 92$), foram submetidos a uma simulação. Decidiu-se usar tamanhos de subamostra de 5, 10, 20 e 50 indivíduos, sorteando ao acaso 100 réplicas para cada tamanho de subamostra. A partir dessas 100 novas “populações” de cada subamostragem, as análises de F_{st} e também os de neutralidade foram recalculados, usando o programa Arlequin. Assim, pode-se ter uma idéia do impacto de diferentes tamanhos de amostra do ponto de vista do sorteio amostral que ocorre na investigação de qualquer população biológica; no caso, o que se aproximaria da realidade biológica seria a amostra total, de 92 indivíduos, e as subamostras com tamanhos variados representam diferentes acessos à diversidade “total”. E, já que essas localidades são tão bem representadas e há a informação da proveniência de cada indivíduo, o F_{st} e os testes de neutralidade também foram calculados para cada um dos fragmentos florestais do qual eles provêm (dois indivíduos foram excluídos pois não possuíam informação sobre o fragmento de origem). Essa exploração também ajuda a entender o que ocorre dentro dessa população (ou populações), e esclarece o comportamento que o desbalanço amostral cria frente à comparações com populações de menor tamanho.

As localidades de Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu estão situadas em dois municípios, de mesmo nome das duas últimas localidades. Garrafão faz parte do município de Guapimirim, mas está situado a uma altitude de aproximadamente 600m, sendo que as outras localidades estão a menos de 100m de altitude. Essas três localidades são separadas por no máximo 17km Kajin (2008). Compondo a localidade de Guapimirim, estão os fragmentos de número 2, 4, 13, 18 e 19; e em Cachoeiras de Macacu, fragmentos de número 5 e 9, e o fragmento Rosimeri.

A fim de responder à primeira parte da predição [4] de expansão demográfica, dois testes de neutralidade foram realizados, utilizando o programa Arlequin. O teste de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) é baseado na expectativa de que sob equilíbrio de mutação e deriva genética, o valor de θ (ou $4N_e\mu$, sendo N_e o tamanho populacional efetivo e μ taxa de mutação) é igual ao número de diferenças nucleotídicas esperada entre quaisquer dois haplótipos pegos ao acaso. Em outras palavras, o estimador do número de polimorfismos (S) seria o mesmo que o da média das diferenças par-a-par entre as seqüências (π) (Wakeley, 2003). Diferenças significativas nos estimadores de S e π podem indicar desvios da neutralidade (razão pela qual o teste tem esse nome), mas também desvios dos outros pressupostos desse modelo. Além de mutações neutras, D de Tajima supõe panmixia, que as gerações sejam discretas, e tamanho populacional constante. Assim, entende-se o porquê D é usado como uma métrica para sinal de expansão demográfica.

Adicionalmente, Ramos-Onsins and Rozas (2002) avaliaram o poder estatístico dos testes de neutralidade focando especificamente sobre a quebra do pressuposto de tamanho constante, ou seja, expansão demográfica. Este trabalho mostra que o teste F de Fu and Li (1993) possui sensibilidade maior a esse pressuposto, assim como o próprio Fu já havia demonstrado em trabalho anterior (Fig. 3 de Fu (1997)), uma vez que compara diferenças na estimativa de θ levando em conta o número de *singletons* e S .

2.2.4. Simulações coalescentes

Por fim, a última predição se relaciona ao tempo de divergência entre as populações e para toda a amostra, a fim de datar os eventos de divergência entre as localidades. Em primeiro lugar, deve-se testar a hipótese de relógio molecular para *Didelphis*, ou seja,

que as taxas de mutação são constantes ao longo das separações das linhagens. Decidiu-se usar o evento da separação de *D. virginiana* com os outros *Didelphis* neotropicais porque é o evento datado mais próximo da história de *D. aurita*. Adotou-se a própria idade do fechamento Ístimo do Panamá como o ponto de calibração, ou seja, 3 Maa (Knowlton and Weigt, 1998; Marko, 2002; Coates et al., 1992), mesmo que o fóssil mais antigo tenha sido encontrado apenas no final do Pleistoceno (0,6 Maa). A premissa adotada como justificativa é de que esse fóssil encontrado na América do Norte teve origem da dispersão dos *Didelphis* sul americanos, e de que desde a ascensão do ístimo até a chegada na Flórida, o intervalo de 2,4 Maa não é exagerado (considerando também que a probabilidade de fossilização é baixa). Claro que a dispersão não deve ter ocorrido assim que o ístimo soerguiu; ao mesmo tempo, não é impossível que já tenha havido alguma migração antes do ístimo estar completamente fechado, unindo os dois continentes. É importante ter em mente que a capacidade de dispersão de *Didelphis* é alta, chegando até a 2km por dia (Loretto and Vieira, 2005). Além disso, a idade concorda razoavelmente com a sugestão de Patton and Costa (2003) de 2,5 Maa para a diversificação do gênero.

A hipótese de relógio molecular foi verificada através do teste de razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*, ou LRT), que compara através de χ^2 as verossimilhanças de uma topologia obrigada a obedecer relógio molecular com uma topologia sem essa restrição. A estimativa das verossimilhanças foi realizada com o pacote PHYLIP v3.68 (Felsenstein (2008), disponível em <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), utilizando os parâmetros do modelo mutacional provenientes do ModelTest apenas para o conjunto de dados de 600pb, nos programas DNAMLK, que assume relógio molecular, e DNAML, que não. O número de graus de liberdade para o teste de χ^2 equivale ao número de taxa menos 2. Caso as topologias apresentem verossimilhanças significativamente diferentes, a hipótese de relógio não pode ser aceita. Caso a hipótese possa ser aceita, *i.e.* as probabilidades não são diferentes, então a taxa de mutação μ é calculada apenas como o número de mutações entre as linhagens de *D. virginiana* e dos gambás neotropicais sobre o tempo de divergência entre elas (número total de substituições dividido por cada um dos dois ramos), isto é, 3 Maa.

A estimativa do tempo de divergência entre as populações de *D. aurita*, por sua vez, foi realizada através de simulações coalescentes com o programa MDIV, que fornece estimativas para Θ (ou $4N_e\mu$, sendo N_e o tamanho efetivo da população e μ a taxa de mutação) adotando o modelo de sítios finitos (HKY) num total de 5 milhões de ciclos de Cadeia de Markov Monte Carlo, descartando as 500.000 primeiras como *burn-in time*. Cada comparação foi realizada três vezes sob os mesmos critérios. As populações adotadas nesta etapa referem-se aos quadrantes de latitude e longitude juntos (A1, B1, etc.), fazendo comparações de um quadrante contra todo o resto da amostra.

Obtendo, então uma taxa de mutação para *Didelphis*, o tempo de divergência (T_{div} , em termos de número de gerações) entre as linhagens de *D. aurita* pode ser obtido pela seguinte relação:

$$T_{div} = \frac{E[TACMR] \times \Theta/4}{\mu}$$

sendo $E[TACMR]$ a expectativa do tempo até o Ancestral Comum Mais Recente (para a genealogia do marcador, e não das linhagens da espécie), e μ a própria taxa de mutação (em termos de milhões de anos, multiplicada pelo número de pares de bases). $E[TACMR]$ e θ são os parâmetros estimados pelo MDIV. O tempo T_{div} multiplicado

Material e Métodos

pelo tempo de geração de *D. aurita* converte este valor em termos de anos. Foi considerado 1 ano por geração, arredondando a média de 330 dias obtida por Kajin (2008).

3. Resultados

3.1. Biogeografia

Começamos este capítulo apresentando inicialmente a associação entre distância geográfica com a distância morfológica (distância de Mahalanobis) considerando localidades como o critério agrupador (Fig. 3.1). Fêmeas são encontradas em 54 localidades, ao passo que machos em 61. Apesar disso, as 11 primeiras funções discriminantes juntas explicam 100% da variação entre os grupos sendo que em ambos os casos há significância multivariada para todas as 11 funções (Wilk's $\lambda = 0$, $gl = 583, 760$; $P < 0,0001$ para fêmeas, e Wilk's $\lambda = 0,002$, $gl = 660, 1446$; $P < 0,0001$ para machos).

Na figura 3.1 pode-se ver que existe uma associação positiva e significativa apenas nas fêmeas, mesmo que com um valor de r razoavelmente baixo. Os machos, por sua vez, não apresentam significância e, portanto, não incrementam a diferença entre os crânios com o aumento da distância geográfica. O comportamento entre os dados originais e sem tamanho (Fig. 3.1A e B, respectivamente) é similar.

Figura 3.1.: Correlação entre distância geográfica e morfológica para fêmeas (acima) e machos (abaixo), avaliadas pelo teste de Mantel. Análise feita com os dados originais aparece em (A) e com os dados sem tamanho em (B).

Tabela 3.1.: Valores de correlação (r) e probabilidade (P) do teste de Mantel comparando os grupos definidos pelos quadrantes de latitude, longitude e a união de ambos (latlong) para fêmeas e machos, com valores de $P < 0,05$ aparecem em negrito. Apresenta-se os resultados com dados originais à esquerda e com dados sem tamanho (Y) à direita.

	r	P	r	P
Latitude				
Fêmeas	0,485	0,251	0,577	0,206
Machos	0,834	0,082	0,958	0,040
Longitude				
Fêmeas	0,922	0,042	0,939	0,042
Machos	0,910	0,041	0,865	0,041
Latlong				
Fêmeas	0,363	0,096	0,335	0,143
Machos	-0,035	0,436	-0,058	0,424

Tabela 3.2.: Porcentagem cumulativa de variação explicada por cada função discriminante (FD) para os quadrantes de latitude, longitude e latlong, assim como para os grupos definidos pelo PC1 da latitude e longitude (diagonal). Todas as funções são significativas a $P < 0,001$. Apresenta-se os resultados com dados originais à esquerda e com dados sem tamanho (Y) à direita.

	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5	FD6	FD7		FD1	FD2	FD3	FD4	FD5	FD6	FD7
Latitude															
Fêmeas	64,4%	94,4%	100%						62,1%	95%	100%				
Machos	50,6%	79,3%	100%						50,8%	84,7%	100%				
Longitude															
Fêmeas	69,8%	89,4%	100%						71,6%	89,7%	100%				
Machos	59,3%	92,7%	100%						61,9%	92,3%	100%				
Latlong															
Fêmeas	44,2%	69,7%	84,2%	93,4%	97,6%	100%			43,4%	68,9%	84,4%	93,1%	98,5%	100%	
Machos	48,8%	76,6%	88%	97,5%	100%				48,1%	76,6%	89,4%	97%	100%		
Diagonal															
Fêmeas	42,8%	62,1%	78,4%	89,6%	97%	99%	100%		42,5%	64,4%	83,8%	92,6%	96,4%	98,7%	100%
Machos	29,2%	52,9%	72,1%	84,8%	93,8%	98,1%	100%		34%	58,7%	73,8%	87,1%	93,9%	98,5%	100%

O teste de Mantel para o próximo nível hierárquico, isto é, dos quadrantes (Tabela 3.1), mostra que a correlação vista nas fêmeas provavelmente vem da diferenciação entre longitudes, as únicas significativas para este sexo. Os machos, por outro lado e ao contrário do que foi visto na Fig. 3.1, agora apresentam significância com a latitude (só nos dados sem tamanho) e com a longitude. De forma geral, novamente os dados originais e sem tamanho (Y) não diferem entre si.

A AD com os quadrantes como variável agrupadora mostrou que as funções são significativas a $P < 0,001$ em todos os casos tanto para os dados originais quanto para os sem tamanho, assim como quando se considera os grupos definidos pelo PC1 da latitude e longitude (diagonal). A função discriminante sobre a classificação de ecótonos, contudo, não é significativa para fêmeas. A porcentagem cumulativa de variação explicada por cada função discriminante em cada um dos casos é apresentada na tabela 3.2, com exceção do critério de ecótonos (apenas dois grupos, portanto apenas uma função discriminante). O número amostral de cada um dos agrupamentos aparece na tabela 3.3.

Em relação à credibilidade dos critérios agrupadores baseados nos quadrantes (Tabela

3.3), na maioria dos casos as porcentagens originais são relativamente maiores quando comparadas às obtidas por *jackknife*, sendo que em alguns casos a primeira é muito maior que a segunda. Isto acontece nos quadrantes E e 4 e praticamente todos os casos de latlong para fêmeas, e também em quase todos de latlong para machos. Olhando para o critério da latitude e longitude resumidos no PC1 (diagonal), um comportamento similar aos quadrantes de latlong aparece, no entanto machos são mais similares entre as duas porcentagens. Olhando para os valores de porcentagem de classificações corretas em si, em todos os casos eles não são muito altos. E, mais uma vez, dados com e sem tamanho não são muito diferentes entre si, apesar de que as fêmeas de forma geral reduzem mais os valores da porcentagem de classificação, enquanto que os machos reduzem, mas também aumentam de valores. Por último, as porcentagens originais e por *jackknife* para o critério do ecótone já são mais similares entre si, no entanto, como já dito, a função discriminante das fêmeas não é significativa.

Tabela 3.3.: Porcentagem de classificação original e obtida por reamostragem através da técnica de *jackknife* (*jack*) para cada população definida dentro dos agrupamentos de quadrantes (latitude, longitude e latlong) e também pelo PC1 da latitude e longitude (diagonal) e ecótone. Apresenta-se os resultados com dados originais à esquerda e com dados sem tamanho (Y) à direita.

Fonte	n	% original	% <i>jack</i>	% original	% <i>jack</i>
Latitude					
Fêmeas					
B	9	100	56	78	78
C	15	80	53	73	40
D	99	53	45	53	45
E	8	50	0	50	13
Total	131	59	44	56	45
Machos					
B	20	65	50	75	50
C	18	67	39	61	28
D	148	50	47	48	44
E	15	67	53	73	67
Total	201	54	47	54	45
Longitude					
Fêmeas					
1	11	91	64	91	64
2	71	59	46	51	44
3	46	65	57	63	52
4	3	100	0	100	0
Total	131	65	50	60	47
Machos					
1	20	70	55	65	45
2	99	48	41	52	44
3	75	55	48	48	37
4	7	100	86	100	86
Total	201	55	47	53	43
Latlong					
Fêmeas					
B1	9	89	56	78	67
C1	2	100	50	100	50
C2	13	62	38	54	38
D2	58	38	29	36	22
D3	41	51	41	56	46

Continua na próxima página

Tabela 3.3 – Continuação

Fonte	n	% original	% <i>jack</i>	% original	% <i>jack</i>
E3	5	40	0	40	0
E4	3	100	0	100	0
Total	131	50	34	50	34
Machos					
B1	20	55	30	55	30
C2	18	61	22	50	11
D2	81	42	32	38	33
D3	67	48	40	40	33
E3	8	38	0	38	0
E4	7	100	57	100	86
Total	201	49	33	44	31
Diagonal					
Fêmeas					
1	29	38	21	31	17
2	11	73	36	73	27
3	12	50	8	42	0
4	40	40	28	25	18
5	14	50	21	36	0
6	5	80	20	80	20
7	10	40	10	40	0
8	10	90	60	80	50
Total	131	50	25	40	16
Machos					
1	16	69	50	75	56
2	23	52	30	52	26
3	32	47	38	44	28
4	28	54	36	50	32
5	25	48	44	40	32
6	33	12	6	18	9
7	21	43	19	33	5
8	23	52	48	57	52
Total	201	45	32	44	28
Ecótone					
Fêmeas					
1	26	69	46	77	58
2	105	67	58	63	56
Total	131	67	56	66	56
Machos					
1	44	68	52	68	52
2	157	71	68	71	68
Total	201	70	65	71	64

As tabelas 3.4 e 3.5 mostram os resultados de ANOVA usando o PC1 de latitude e longitude como fator e os ecótones como covariável para cada medida em fêmeas e machos, respectivamente. As fêmeas apresentam diferenças significativas na maioria das medidas originais (exceções: ROS, GBN e SMI), mas quase nenhuma diferença significativa nos dados sem tamanho. Os machos, por sua vez, apresentam diferenças significativas para todas as medidas nos dados originais e também nos sem tamanho, com exceção de YSM, YCAN e YROS. O efeito do ecótone aparece significativo em muitas das medidas nos machos (GLS, CAN, BPS, e SMI nos dados originais; YBPS e YSMI nos dados sem tamanho) mas, novamente, isso não aparece nos resultados das fêmeas.

Os resultados do teste de Tukey estão apresentados em anexo (A.4.1 e A.4.2 para

fêmeas e machos, respectivamente), assim como a diferença nas médias das medidas entre todas as comparações. No caso das fêmeas, a maioria das significâncias provêm de comparações do grupo correspondente aos indivíduos da BA (grupo 8), e também algumas comparações envolvendo indivíduos de SP, especialmente aqueles de Cotia e São Paulo (grupo 2). Para machos, o grupo com indivíduos da BA (8) é novamente um grupo que se destaca na maioria das diferenças, mas grupos que incluem indivíduos de SP (2, 3 e 4), assim como a distribuição sul (grupo 1) e mesmo alguns dos indivíduos do RJ (grupo 5) também mostram diferenças significativas em algumas das comparações. Outra forma de visualizar estes resultados é através das figuras 3.2 e 3.5, que mostram para todas as medidas as médias de cada grupo, com respectivos desvios padrão.

A última parte desta seção se refere aos resultados relacionados à variação de tamanho em fêmeas e machos de *D. aurita*. Apesar de para fêmeas o PC1 corresponder a 83,25% da variação total, e nos machos ainda mais, 87,80%, na maioria dos resultados acima postos, não existe contrastes claros entre os dados com e sem tamanho. Entretanto, na figura 3.4 mostra-se como o PC1 varia em relação ao PC1 de latitude e longitude (diagonal) e nela se vê que especialmente o grupo da BA (8) se contrasta em relação aos outros grupos tanto para fêmeas quanto para machos. Os machos, apesar de mostrarem maiores diferenças no PC1 entre grupos, seu desvio também é maior.

Tabela 3.4.: Resultados da diferenciação de fêmeas para cada medida, original e corrigida (Y), através de uma Análise de Variância usando como fator os grupos como definidos pelo PC1 entre latitude e longitude (diagonal); e a classificação de ecótonos (ver texto) como covariável. Apresenta-se a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl), a média dos quadrados (MQ), o valor de F (F), e a probabilidade associada (P). Valores de P em negrito são significativos para $P < 0,05$.

Fêmeas											
Fonte	SQ	gl	MQ	F	P	Fonte	SQ	gl	MQ	F	P
GLS						YGLS					
Diagonal	1052,18	7	150,31	5,59	<0,001	Diagonal	180,46	7	25,78	4,51	<0,001
Ecótone	13,94	1	13,94	0,52	0,473	Ecótone	7,71	1	7,71	1,35	0,248
Erro	3280,12	122	26,89			Erro	697,76	122	5,72		
MAX						YMAX					
Diagonal	67,05	7	9,58	4,75	<0,001	Diagonal	23,74	7	3,39	3,83	<0,001
Ecótone	1,49	1	1,49	0,74	0,392	Ecótone	0,84	1	0,84	0,95	0,333
Erro	245,79	122	2,01			Erro	108,15	122	0,89		
SM						YSM					
Diagonal	6,23	7	0,89	2,15	0,043	Diagonal	3,62	7	0,52	1,57	0,152
Ecótone	0,07	1	0,07	0,17	0,679	Ecótone	0,02	1	0,02	0,07	0,787
Erro	50,38	122	0,41			Erro	40,31	122	0,33		
CAN						YCAN					
Diagonal	37,47	7	5,35	3,71	<0,001	Diagonal	5,44	7	0,78	1,73	0,108
Ecótone	0,21	1	0,21	0,15	0,703	Ecótone	0,06	1	0,06	0,14	0,711
Erro	176,24	122	1,44			Erro	54,87	122	0,45		
BAM						YBAM					
Diagonal	23,91	7	3,42	2,52	0,019	Diagonal	5,76	7	0,82	1,31	0,253
Ecótone	0,00	1	0,00	0,00	0,984	Ecótone	0,12	1	0,12	0,18	0,669
Erro	165,29	122	1,35			Erro	76,86	122	0,63		
BPS						YBPS					
Diagonal	27,97	7	4,00	2,16	0,042	Diagonal	15,23	7	2,18	2,14	0,045
Ecótone	2,13	1	2,13	1,15	0,285	Ecótone	2,88	1	2,88	2,82	0,095
Erro	225,43	122	1,85			Erro	124,31	122	1,02		
POC						YPOC					
Diagonal	3,43	7	0,49	2,26	0,033	Diagonal	3,43	7	0,49	2,53	0,018
Ecótone	0,17	1	0,17	0,78	0,380	Ecótone	0,21	1	0,21	1,07	0,303
Erro	26,39	122	0,22			Erro	23,61	122	0,19		
ROS						YROS					
Diagonal	37,06	7	5,29	1,66	0,125	Diagonal	6,61	7	0,94	0,70	0,668
Ecótone	0,00	1	0,00	0,00	0,991	Ecótone	0,19	1	0,19	0,14	0,707
Erro	389,04	122	3,19			Erro	163,63	122	1,34		
GBN						YGBN					
Diagonal	18,17	7	2,60	1,47	0,184	Diagonal	10,90	7	1,56	2,39	0,025
Ecótone	0,75	1	0,75	0,43	0,514	Ecótone	0,49	1	0,49	0,75	0,387
Erro	215,33	122	1,77			Erro	79,60	122	0,65		
NAS						YNAS					
Diagonal	212,22	7	30,32	3,53	0,002	Diagonal	29,45	7	4,21	1,54	0,158
Ecótone	2,34	1	2,34	0,27	0,603	Ecótone	1,32	1	1,32	0,48	0,488
Erro	1048,79	122	8,60			Erro	332,33	122	2,72		
SMI						YSMI					
Diagonal	7,12	7	1,02	1,39	0,214	Diagonal	4,98	7	0,71	1,04	0,404
Ecótone	0,01	1	0,01	0,02	0,895	Ecótone	0,04	1	0,04	0,05	0,817
Erro	89,03	122	0,73			Erro	83,16	122	0,68		

Tabela 3.5.: Resultados da diferenciação de machos para cada medida, original e corrigida (Y), através de uma Análise de Variância usando como fator os grupos, como definidos pelo componente principal entre latitude e longitude (diagonal); e a classificação de ecótonos (ver texto) como covariável. Apresenta-se a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl), a média dos quadrados (MQ), o valor de F (F), e a probabilidade associada (P). Valores de P em negrito são significativos para $P < 0,05$.

Machos											
Fonte	SQ	gl	MQ	F	P	Fonte	SQ	gl	MQ	F	P
GLS						YGLS					
Diagonal	1629,27	7	232,75	3,28	0,003	Diagonal	266,48	7	38,07	3,62	<0,001
Ecótone	304,43	1	304,43	4,29	0,040	Ecótone	21,95	1	21,95	2,09	0,150
Erro	13615,99	192	70,92			Erro	2018,69	192	10,51		
MAX						YMAX					
Diagonal	93,18	7	13,31	4,28	<0,001	Diagonal	34,18	7	4,88	2,91	0,006
Ecótone	6,81	1	6,81	2,19	0,141	Ecótone	0,39	1	0,39	0,24	0,628
Erro	596,99	192	3,11			Erro	322,15	192	1,68		
SM						YSM					
Diagonal	14,38	7	2,05	2,5	0,018	Diagonal	7,26	7	1,04	1,38	0,216
Ecótone	0,05	1	0,05	0,07	0,797	Ecótone	0,08	1	0,08	0,11	0,737
Erro	158,05	192	0,82			Erro	144,41	192	0,75		
CAN						YCAN					
Diagonal	95,17	7	13,6	3,67	<0,001	Diagonal	2,92	7	0,42	0,54	0,806
Ecótone	20,91	1	20,91	5,64	0,019	Ecótone	2,95	1	2,95	3,8	0,053
Erro	712,17	192	3,71			Erro	149,06	192	0,78		
BAM						YBAM					
Diagonal	77,14	7	11,02	5,55	<0,001	Diagonal	42,79	7	6,11	4,39	<0,001
Ecótone	0	1	0	0	0,966	Ecótone	1,65	1	1,65	1,18	0,278
Erro	381,55	192	1,99			Erro	267,28	192	1,39		
BPS						YBPS					
Diagonal	37,92	7	5,42	3,55	<0,001	Diagonal	38,63	7	5,52	5,07	<0,001
Ecótone	9,25	1	9,25	6,06	0,015	Ecótone	16,18	1	16,18	14,87	<0,001
Erro	293,16	192	1,53			Erro	209,01	192	1,09		
POC						YPOC					
Diagonal	5,76	7	0,82	3,28	0,003	Diagonal	5,74	7	0,82	3,33	0,002
Ecótone	0,07	1	0,07	0,26	0,609	Ecótone	0,13	1	0,13	0,53	0,466
Erro	48,1	192	0,25			Erro	47,33	192	0,25		
ROS						YROS					
Diagonal	139,41	7	19,92	2,96	0,006	Diagonal	17,24	7	2,46	1,84	0,081
Ecótone	4,93	1	4,93	0,73	0,393	Ecótone	3,02	1	3,02	2,26	0,134
Erro	1290,24	192	6,72			Erro	256,57	192	1,34		
GBN						YGBN					
Diagonal	95	7	13,57	3,93	<0,001	Diagonal	24,95	7	3,56	3,44	0,002
Ecótone	7,73	1	7,73	2,24	0,136	Ecótone	0,01	1	0,01	0,01	0,936
Erro	663,86	192	3,46			Erro	198,65	192	1,03		
NAS						YNAS					
Diagonal	406,11	7	58,02	2,98	0,005	Diagonal	86,4	7	12,34	2,51	0,017
Ecótone	66,82	1	66,82	3,43	0,066	Ecótone	4,91	1	4,91	1	0,319
Erro	3743,85	192	19,5			Erro	942,72	192	4,91		
SMI						YSMI					
Diagonal	25,47	7	3,64	4,01	<0,001	Diagonal	19,09	7	2,73	3,16	0,003
Ecótone	6,6	1	6,6	7,27	0,007	Ecótone	4,46	1	4,46	5,16	0,024
Erro	174,33	192	0,91			Erro	165,94	192	0,86		

Fêmeas

Figura 3.2.: Médias e desvios padrão de cada medida original e sem tamanho (Y) para cada um dos grupos definidos pelo PC1 de latitude e longitude (diagonal) em fêmeas.

Machos

Figura 3.3.: Médias e desvios padrão de cada medida original e sem tamanho (Y) para cada um dos grupos definidos pelo PC1 de latitude e longitude (diagonal) em machos.

Figura 3.4.: Relação entre a variação de tamanho (PC1) ao longo dos grupos definidos pelo PC1 da latitude e longitude (diagonal) à esquerda, e médias e desvios padrão dos escores do PC1 para cada grupo à direita, com fêmeas apresentadas acima e machos abaixo.

3.2. Filogeografia

Dentre os 194 indivíduos utilizados neste trabalho, 18 não amplificaram com qualidade suficiente para completar a sequência com 600pb. Dessa forma, estes indivíduos apresentam dados faltantes (ou *missing data*) e em muitas das análises o dado faltante é considerado como um quinto estado (junto com deleções, ou *gaps*), ou seja, é tratado como se fosse um polimorfismo. Por causa disso, foi necessário tratar o conjunto de dados com 600pb excluindo estes 18 indivíduos. Mas como alguns destes provêm de localidades relevantes e pouco representadas (ver na Tabela A.1, em anexo) e de forma a não perder a informação destas amostras, um outro conjunto de dados foi analisado, agora com 354pb. Sendo assim, para os resultados apresentados a seguir, serão indicados da seguinte forma, sempre na mesma ordem: –354pb e –600pb.

Dos 354pb do cytB, 25 sítios polimórficos foram encontrados em *D. aurita* (101, considerando os grupos externos – apresentados adiante entre parênteses), sendo que 22 (83) são filogeneticamente informativos. Os 139 indivíduos de *D. aurita* (194) correspondem a 27 haplótipos (59). Já para os 600pb, 41 sítios polimórficos foram encontrados em *D. aurita* (165), sendo que 38 (138) são filogeneticamente informativos. Neste conjunto de dados, os 128 indivíduos de *D. aurita* (176) correspondem a 40 haplótipos (70). Estas e outras estatísticas descritivas de *D. aurita* estão resumidas na Tabela 3.6. Encontra-se alta diversidade haplotípica (H_d) e baixa diversidade nucleotídica (π), o que indica excesso de alelos raros. A classificação de todos os indivíduos nos haplótipos está apresentada na tabela A.1, em anexo, e os sítios polimórficos do conjunto de dados de 354 na tabela A.3, e do conjunto de 600pb na tabela A.2, ambas em anexo.

3.2.1. Análises filogenéticas

O valor da melhor verossimilhança para todas as sequências, incluindo os grupos externos ($-\ln L = 1353,5134 - 354\text{pb}$; $-\ln L = 2257,2712 - 600\text{pb}$) foi obtido para o modelo TrN+G (Tamura and Nei, 1993). A composição nucleotídica encontrada é de: A = 29,6%, C = 24%, G = 16,1%, T = 30,3% – 354pb; A = 30,3%, C = 24,6%, G = 14,4%, T = 30,6% – 600pb). Este modelo indica que transversões ocorrem de maneira igual ($a=c=d=f$), mas transições ocorrem de maneira diferente (b, e; sendo “b” mudanças de A-G e “e” mudanças de C-T), e que há variação na taxa de mutação entre os sítios ($\alpha = 0,265 - 354\text{pb}$; $\alpha = 0,195 - 600\text{pb}$).

A figura 3.5 mostra que não há sinal de saturação nos dados. Adotou-se a correção de Tamura and Nei (1993), como obtida pela estimativa do ModelTest. Apenas as funções da terceira posição e das três posições juntas estão representadas.

O valor da melhor verossimilhança para as árvores foi de $-\ln L = 1570.98371 - 354$ (Fig. 3.6), e $-\ln L = 2645.59384 - 600$ (Fig. 3.7). Note que em ambos os casos, o indivíduo de *P. opossum* da Floresta Atlântica (classificado no trabalho de Patton et al. (1996), do qual as sequências provêm, ainda como pertencente à *P. opossum*, mas elevado ao nível de espécie como *P. frenata* posteriormente em Patton and da Silva (1997)) se relaciona ao clado de *Didelphis* com altos índices de *bootstrap*, tornando o gênero *Philander* parafilético. *Didelphis*, por sua vez, é um gênero monofilético, com alto suporte em ambos casos (354 e 600pb). Da mesma forma, o clado de *D. virginiana* é bastante robusto e se relaciona a todos os outros *Didelphis* neotropicais. Este último clado não possui um valor de *bootstrap* alto, mas um resultado interessante aparece dentro dele. Enquanto na Fig. 3.6 *D. albiventris* é grupo irmão de *D. aurita*, e o

Tabela 3.6.: Análises descritivas da diversidade: número de seqüências dentro do grupo (n), número de sítios segregantes (S), número médio de diferenças nucleotídicas (k), diversidade nucleotídica (π), número de haplótipos (h), e diversidade haplotípica (Hd), para os grupos definidos pelos quadrantes de latlong, assim como a amostra total de *D. aurita* para os conjuntos de dados de 354 e 600pb.

amostra	n	S	k	π	h	Hd
<i>D. aurita</i> 354	139	25	1,99	0,0056	27	0,792
<i>D. aurita</i> 600	128	41	3,00	0,0050	40	0,903
354						
A1	4	—	—	—	1	0
B1	2	2	2	0,0056	2	1
C2	1	—	—	—	1	0
D2	118	13	1,254	0,0035	21	0,763
D3	7	3	1,524	0,0043	3	0,762
D4	5	2	1,2	0,0034	2	0,6
E3	1	—	—	—	1	0
E4	1	—	—	—	1	0
600						
A1	2	—	—	—	1	0
B1	2	4	4	0,0067	2	1
D2	110	21	2,267	0,0038	31	0,894
D3	7	3	1,524	0,0025	3	0,762
D4	5	4	2,2	0,0037	3	0,8
E3	1	—	—	—	1	0
E4	1	—	—	—	1	0

Figura 3.5.: Gráficos de saturação relacionando a distância corrigida de Tamura and Nei (1993) com a frequência de transições (Ts) e transversões (Tv) para as três posições dos códons juntas, assim como apenas a terceira posição usando os indivíduos de *D. aurita* mais os grupos externos.

haplótipo de AL é externo a esse clado; na Fig. 3.7 quem é irmão a *D. aurita* é o grupo formado por *D. marsupialis* e o haplótipo de AL. Como o conjunto de dados de 354pb traz menos informação filogenética (e o resultado deste árvore é deveras inesperado biogeograficamente), a árvore resultante dos 600pb deve estar refletindo melhor as relações dentro do gênero.

Estimando o modelo mutacional apenas para *D. aurita*, o melhor valor de verossimilhança ($-\ln L = 723,7097 - 354\text{pb}$; $-\ln L = 1221,7211 - 600\text{pb}$) foi o do modelo HKY+I+G (Hasegawa et al., 1985). A composição nucleotídica encontrada neste caso é de: A = 30,6%, C = 24,4%, G = 16,6%, T = 28,4% – 354pb; A = 30,3%, C = 24,8%, G = 14,9%, T = 30,0% – 600pb). O modelo indica que transversões ocorrem igualmente ($a=c=d=f$), e também as transições ($b=e$), com uma proporção de sítios invariáveis ($I = 0,651 - 354\text{pb}$; $0,787 - 600\text{pb}$), e também com taxas de mutação variáveis ($\alpha = 0,242 - 354\text{pb}$; $\alpha = 0,616 - 600\text{pb}$). Os parâmetros deste modelo foram usados para as análises intraespecíficas.

Os valores da melhor verossimilhança nas árvores de *D. aurita* foram de $-\ln L = 719.19967 - 354$ (Fig. 3.8), e $-\ln L = 1213.74567 - 600\text{pb}$ (Fig. 3.9). Neste caso, como as diferenças entre os haplótipos é menor, os índices de *bootstrap* apresentados são menos estridentes (valor mínimo de 60%, ao passo que para as árvores com os grupos externos adotou-se 70%). Contudo, isso não altera o fato de que os ramos são pouco consistentes. A propósito, na árvore com 354pb (Fig. 3.8), não há suporte para nenhum ramo. Apesar disso, em ambos casos (354 e 600), pode-se ver claramente que o haplótipo 1, correspondente aos indivíduos de AL, é bastante divergente de todas as outras amostras.

Como a única diferença clara que aparece nestes resultados é dos indivíduos de AL para todo o resto da amostra, as árvores filogenéticas não apontaram nenhum agrupamento que poderia ser adotado *a priori* para as análises intraespecíficas, além do que já seria recuperado pelo método de quadrantes.

3.2.2. Análises intraespecíficas

O primeiro resultado desta seção descreve a associação da distância genética com a geográfica, feita através do teste de Mantel, no menor nível hierárquico, ou seja, das “populações” definidas como as próprias localidades (Figs. 3.10 –354pb e 3.11 – 600pb). Porque algumas localidades possuem baixo número amostral, decidiu-se unir os casos em que a distância entre localidades é menor do que 50km (Figs. 3.10B –354 e 3.11B –600). Adotou-se este valor considerando a grande capacidade de dispersão de *D. aurita*. Une-se portanto: Ibateguara e Murici (AL) em “AL”; Vitória, Santa Teresa e Domingos Martins (ES) em “ES”; Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ) em “GGMacacu”; Paraty (RJ) e Ubatuba (SP) em “Picinguaba”; Ribeirão Grande e Sete Barras (SP) em “RbGde7”; e Wenceslau Brás e Pinhalão (PR) em “PR”. Adicionalmente, dada que a alta divergência dos indivíduos de AL influencia muito na correlação observada, mostra-se também o teste de Mantel excluindo as localidades deste estado (Figs. 3.10C –354 e 3.11C –600).

Como pode ser visto, todas as correlações são significativas, sendo que a única marginalmente significativa é a de 354pb, sem os indivíduos de AL (Fig. 3.10C). Em todos os casos, observa-se uma correlação positiva da variação genética com distância geográfica, o que suportaria a hipótese de isolamento por distância. No entanto, quando se exclui AL (Figs. 3.10C –354 e 3.11C –600) o valor da correlação cai de cerca de 0,75 para 0,27 mostrando, como imaginado, a grande influência da dos indivíduos

Tabela 3.7.: Valores de correlação (r) e probabilidade (P) do teste de Mantel comparando os grupos definidos pelos grids de latitude, longitude e a união de ambos (latlong), assim como para o PC1 da latitude e longitude (diagonal) para o conjunto de dados de 354 e 600pb. Valores de $P < 0,05$ aparecem em negrito. Apresenta-se os resultados com todos os indivíduos à esquerda e excluindo os indivíduos de AL à direita.

	r	P	r	P
Latitude				
354	0,321	0,25	-0,155	0,381
600	0,509	0,04	0,956	–
Longitude				
354	0,921	0,04	0,759	0,040
600	0,919	0,04	0,877	0,041
Latlong				
354	0,730	0,001	0,506	0,048
600	0,746	0,001	0,745	0,004
Diagonal				
354	0,835	0,009	0,848	0,041
600	0,899	0,040	0,969	–

deste estado.

A tabela 3.7 mostra os resultados da correlação de Mantel para o nível hierárquico seguinte (quadrantes e diagonal). Nela pode ser vista que todas as correlações com a longitude são altas e significativas, e isso provavelmente influencia a significância observada em latlong. Apenas no conjunto de dados de 600pb correlação significativa aparece para a latitude. Como o teste de Mantel não calcula a significância quando a correlação é entre apenas três casos, não se pode saber se sem os indivíduos de AL o mesmo padrão apareceria. Isso também afeta o teste para a diagonal excluindo o grupo de AL no conjunto de 600pb. Nos outros resultados do teste de Mantel para este critério, todas as correlações são altas e significativas, e não se alteram com e sem o grupo de AL.

Partindo para os resultados de AMOVA (Tabela 3.8), mostra-se que considerando as comparações entre localidades, agrupadas ou não, a porcentagem de variação é praticamente a mesma entre e dentro das populações. Contudo, quando os indivíduos de AL são retirados, fica clara a maior proporção de variância dentro das localidades, o que indica ausência de estruturação geográfica.

Considerando por sua vez os resultados dos quadrantes com os indivíduos de AL inclusos, o mesmo quadro aparece, no qual maior porcentagem de variância aparece entre grupos e não dentro deles, isto é, existe grande divergência entre as latitudes, longitudes e os quadrantes da união destes (latlong). Ao lado de cada caso, os resultados retirando os indivíduos de AL mostram novamente que maior parte da variância passa a estar dentro de cada grupo. Especificamente para a longitude, as porcentagens de variação entre e dentro de populações para todas as localidades são mais similares quando comparadas à latitude e latlong. Após retirados os indivíduos de AL, maior parte da variação fica dentro das faixas longitudinais, no entanto, deve-se lembrar que no teste de Mantel existe diferenciação significativa entre as longitudes. Similarmente, considerando o PC1 da latitude e longitude mostram o mesmo padrão que os quadrantes, com a diferença de uma redução ainda maior da porcentagem entre populações

Tabela 3.8.: Valores da porcentagem de variância entre e dentro de cada população definidas considerando todas as localidades (localidades) e localidades com distâncias menores do que 50km unidas (locas. unidas), assim como para as comparações entre quadrantes de latitude, longitude, latlong, e para o PC1 da latitude e longitude (diagonal). Apresenta-se os resultados com todos os indivíduos à esquerda e excluindo os indivíduos de AL à direita.

AMOVA	Entre	Dentro	Entre	Dentro
Localidades				
354	55,54%	44,46%	32,09%	67,91%
600	44,06%	55,94%	26,35%	73,65%
Locas. unidas				
354	59,56%	40,44%		
600	47,26%	52,74%		
Latitude				
354	80,01%	19,99%	28,38%	71,62%
600	76,41%	23,59%	28,41%	71,59%
Longitude				
354	59,37%	40,63%	28,89%	71,11%
600	44,31%	55,69%	23,66%	76,34%
Latlong				
354	68,6%	31,4%	29,4%	70,6%
600	57,54%	42,46%	22,21%	77,79%
Diagonal				
354	53,51%	46,49%	11,35%	88,65%
600	42,72%	57,28%	11,52%	88,48%

quando excluindo o grupo de AL.

Já para os resultados de Fst, as matrizes de diferenciação para o conjunto de dados de 354pb considerando todas as localidades (Tabela 3.9), localidades excluindo AL (Tabela 3.10) e localidades com distâncias menores que 50km agrupadas (Tabela 3.11) são apresentadas, com valores significativos a $P < 0,05$ em negrito. O mesmo para 600pb, respectivamente nas tabelas 3.12, 3.13 e 3.14. Em todas matrizes, a maioria das significâncias aparecem em comparações que envolvem as localidades de Santa Teresa, Vitória e Domingos Martins (ES); e Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ), incluindo comparações das próprias localidades entre si. Comparando os resultados entre todas as localidades (Tabelas 3.9 e 3.12) e todas as localidades sem AL (Tabelas 3.10 e 3.13), a comparação de Vitória com Itabuna (354) ganha significância quando se retira AL, mas Vitória com Buri e Wenceslau Brás perdem (354 e 600). Guapimirim perde também significância com Itabuna (354), assim como Garrafão com São Francisco de Itabapoana (354). Comparando os resultados entre todas as localidades (Tabelas 3.9 e 3.12) e as localidades agrupadas (Tabelas 3.11 e 3.14), a principal diferença que aparece é a significância das comparações de PR com AL (354 e 600), e também de PR com RbGde7 (354) e Buri (600). Por fim, comparando o conjunto de dados de 354 e 600pb, além das pequenas diferenças acima citadas, duas localidades merecem atenção. A primeira é Ilha Grande, que no conjunto de 354pb, comparando todas as localidades e localidades agrupadas (Tabelas 3.9 e 3.11), mantém a significância que já aparecia levando em consideração todas as localidades com os grupos RbGde7 (que inclui Sete Barras) e PR (que inclui Wenceslau Brás), mas passa a ter também diferenças significativas com o grupo de AL. Agora, Ilha Grande no conjunto de 600pb não apresenta significância em nenhuma comparação. A segunda

localidade que merece atenção é Marliéria. Apesar de ela não ser representada no conjunto de 600pb, em 354 não há diferença significativa para nenhuma comparação com outras localidades.

Em relação aos valores de F_{st} , o valor médio da diferenciação das localidades de AL com o restante das localidades é de $0,928 \pm 0,040$ –354 e $0,901 \pm 0,043$ –600, ao passo que nas comparações dentro do restante das localidades é de $0,553 \pm 0,235$ –354 e $0,529 \pm 0,230$ –600 (valores das tabelas 3.9 e 3.12). Considerando as localidades agrupadas (Tabelas 3.11 e 3.14), os valores das comparações AL x resto não se altera tanto em relação à comparação anterior ($0,931 \pm 0,04$ –354 e $0,888 \pm 0,052$), mas dentro do restante das localidades, diminui ($0,344 \pm 0,170$ –354 e $0,296 \pm 0,089$ –600).

Os resultados de F_{st} considerando agora a divisão de quadrantes são iguais em termos de significância entre 354 e 600pb, portanto apenas a de 600 é apresentada (Tabelas 3.15A a C). Na latitude, apenas as comparações de A e B com D são significativas, e isso se reflete em latlong que, apesar de em longitude todas as comparações serem significativas, apenas os quadrantes que incluem D em relação a A, B e outros quadrantes dentro de D (D2, D3 e D4) são significativas. As comparações que envolvem o grid A, 1 e conseqüentemente A1 possuem valores de F_{st} altos. Considerando a longitude 1, que inclui não só AL mas também BA, assim como a latitude B e latlong B1, os valores também são moderadamente altos. Todas as outras comparações mostram uma diferenciação menor. Valores médios de F_{st} significativos nas comparações de AL com os resto dos quadrantes de latlong são de $0,924 \pm 0,317$ –354 e $0,923 \pm 0,356$, e entre o restante dos quadrantes de latlong de $0,317 \pm 0,121$ –354 e $0,357 \pm 0,179$ –600.

Nas matrizes de F_{st} do critério do PC1 da latitude e longitude (Tabela 3.15 D –354 e E –600), a maioria das comparações são significativas, com exceção apenas de três das quatro comparações do grupo 1 em 354, correspondente a Foz do Iguaçu (PR). A única diferenciação significativa apresentada por este grupo é alta, quando comparada aos outros grupos sem incluir as comparações com o grupo de AL (F_{st} médio = $0,211 \pm 0,231$, enquanto que sem Foz do Iguaçu a média é de $0,096 \pm 0,020$). Mais uma vez, os valores de F_{st} considerando os grupos correspondentes a AL (grupo 5 na tabela 3.15D, grupo 4 em 3.15E), apresentam os valores mais altos ($0,887 \pm 0,020$ –354 e $0,890 \pm 0,036$).

Para a próxima e última análise desta seção, os testes de neutralidade (Tabela 3.16), reporta-se os resultados considerando todas as amostras de *D. aurita* juntas. A espécie possui D de Tajima e F de Fu negativos e significativos, e isso aparece devido aos valores referentes ao quadrante D2, marginalmente significativo para D de Tajima, mas altamente significativo para F de Fu (os testes foram calculados no critério de quadrantes excluindo os indivíduos de AL). Para o critério da diagonal, os grupos que apresentam valores significativos também os mostram negativos, mas apenas para F de Fu. O grupo 3 e 4 de 354pb (o último sendo marginalmente significativo) correspondem respectivamente a Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ); e Marliéria (MG), São Francisco de Itabapoana (RJ), Itabuna (BA) e todas as localidades do ES. No caso de 600pb, os grupos que apresentam significância são o grupo 1, correspondente a todas as localidades do PR, de SP e do RJ até Ilha Grande; e o grupo 2, composto por Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ). Note que os componentes do grupo 1 mostraram valores significativos apenas sob este critério.

Figura 3.6.: Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança para o conjunto de dados de 354pb. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 70% são apresentados acima de cada ramo, em negrito. As cores indicam as diferentes espécies, assim como representadas em seu mapa de distribuição (Fig. 2.6). A escala indica 0.1 substituições nucleotídicas por sítio.

Figura 3.7.: Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança para o conjunto de dados de 600pb. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 70% são apresentados acima de cada ramo, em negrito. As cores indicam as diferentes espécies, assim como representadas em seu mapa de distribuição (Fig. 2.6). A escala indica 0.1 substituições nucleotídicas por sítio.

Figura 3.8.: Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança para o conjunto de dados de 354pb. Nenhum ramo apresenta valores de *bootstrap* maiores do que 60%. As cores indicam as localidades de cada um dos haplótipos, sendo que grandes alterações de cada cor representam os diferentes estados. A escala indica 0.01 substituições nucleotídicas por sítio.

Figura 3.9.: Árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança para o conjunto de dados de 600pb. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 60% são apresentados acima de cada ramo, em negrito. As cores indicam as localidades de cada um dos haplótipos, sendo que grandes alterações de cada cor representam os diferentes estados. A escala indica 0.01 substituições nucleotídicas por sítio.

Figura 3.10.: Correlação entre distância geográfica e genética para comparações do conjunto de dados de 354 pb entre (A) todas as localidades, (B) localidades agrupando distâncias menores do que 50km, e (C) sem as localidades de AL.

Figura 3.11.: Correlação entre distância geográfica e genética para comparações do conjunto de dados de 600 pb entre A) todas as localidades, (B) localidades agrupando distâncias menores do que 50km, e (C) sem as localidades de AL.

Tabela 3.9.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par de todas as localidades do conjunto de dados de 354pb, com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidades abreviadas correspondem a Ibategua: Ibateguara (AL), StaTeresa: Santa Teresa (ES) DMartins: Domingos Martins (ES), Itabap: São Francisco de Itabapoana (RJ), Guapi: Guapimirim (RJ), Macacu: Cachoeiras de Macacu (RJ), IlhaGde: Ilha Grande (RJ), Caucaia: Caucaia do Alto (SP), RbGde: Ribeirão Grande (SP), 7Barras: Sete Barras (SP), WBrás: Wenceslau Brás (PR), Foz: Foz do Iguaçu (PR).

354	Localidd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	Ibategua	0																						
2	Murici	0	0																					
3	Itabuna	0,905	0,905	0																				
4	Marliéria	1	1	0,333	0																			
5	StaTeresa	0,867	0,867	0,070	0,28	0																		
6	Vitória	0,973	0,973	0,552	0,667	0,241	0																	
7	DMartins	1	1	0,25	1	0,526	0,855	0																
8	Itabap	1	1	0,333	1	0,28	0,667	1	0															
9	Garrafão	0,957	0,957	0,428	0,647	0,282	0,084	0,710	0,647	0														
10	Guapi	0,887	0,887	0,275	0,256	0,218	-0,015	0,478	0,256	0,045	0													
11	Macacu	0,925	0,925	0,477	0,392	0,324	-0,076	0,625	0,392	0,102	0,104	0												
12	IlhaGde	0,962	0,962	0,302	0,75	0,359	0,661	0,8	0,75	0,484	0,329	0,504	0											
13	Paraty	1	1	-1	1	-0,2	0,5	1	1	-0,2	-0,204	0,162	0	0										
14	Ubatuba	1	1	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0									
15	Caucaia	1	1	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0								
16	RbGde	1	1	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0	0							
17	Sorocaba	1	1	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0	0	0						
18	7Barras	1	1	0,8	1	0,684	0,901	1	1	0,864	0,671	0,753	0,906	1	1	1	1	1	0					
19	Buri	1	1	0,667	1	0,455	0,744	1	1	0,699	0,383	0,467	0,836	1	1	1	1	1	1	0				
20	Pinhalão	1	1	0,647	1	0,25	-0,132	1	1	0,307	-0,005	-0,096	0,8	1	0	0	0	1	1	1	0			
21	WBrás	1	1	0,75	1	0,6	0,858	1	1	0,813	0,57	0,643	0,88	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
22	Morretes	1	1	0,333	1	0,28	0,667	1	1	0,647	0,256	0,392	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
23	Foz	1	1	0,5	1	0,486	0,818	1	1	0,786	0,509	0,601	0,818	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Tabela 3.10.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par de todas as localidades excluindo as localidades de AL, para o conjunto de dados de 354pb, com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidades abreviadas correspondem a Sta Teresa: Santa Teresa (ES), DMartins: Domingos Martins (ES), Itabapoana: São Francisco de Itabapoana (RJ), Macacu: Cachoeiras de Macacu (RJ), IlhaGde: Ilha Grande (RJ), Caucaia: Caucaia do Alto (SP), RbGde: Ribeirão Grande (SP), 7Barras: Sete Barras (SP), WBrás: Wenceslau Brás (PR), Foz: Foz do Iguaçu (PR).

354	sem AL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Itabuna	0																				
2	Marlheria	0,333	0																			
3	StaTeresa	0,070	0,28	0																		
4	Vitória	0,552	0,667	0,241	0																	
5	DMartins	0,25	1	0,526	0,855	0																
6	Itabapoana	0,333	1	0,28	0,667	1	0															
7	Garrafão	0,428	0,647	0,282	0,0837	0,709	0,647	0														
8	Guapimirim	0,275	0,256	0,218	-0,015	0,478	0,256	0,0454	0													
9	Macacu	0,477	0,392	0,324	-0,076	0,625	0,392	0,102	0,104	0												
10	IlhaGde	0,302	0,75	0,359	0,661	0,8	0,75	0,484	0,329	0,504	0											
11	Paraty	-1	1	-0,2	0,5	1	1	-0,2	-0,204	0,162	0	0										
12	Ubatuba	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0									
13	Caucaia	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0								
14	RbGde	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0	0							
15	Sorocaba	0	1	-0,2	-1	1	1	0	-0,533	-0,737	0,6	1	0	0	0	0						
16	7Barras	0,8	1	0,684	0,901	1	1	0,864	0,671	0,753	0,905	1	1	1	1	1	0					
17	Buri	0,667	1	0,455	0,744	1	1	0,699	0,382	0,467	0,836	1	1	1	1	1	1	0				
18	Pinhalão	0,647	1	0,25	-0,132	1	1	0,307	-0,005	-0,096	0,8	1	0	0	0	1	1	1	0			
19	WBrás	0,75	1	0,6	0,858	1	1	0,813	0,571	0,643	0,88	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
20	Morretes	0,333	1	0,28	0,667	1	1	0,647	0,256	0,392	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
21	Foz	0,5	1	0,486	0,818	1	1	0,786	0,509	0,601	0,818	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	

Tabela 3.11.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par das localidades cujas distâncias menores de 50km são agrupadas para o conjunto de dados de 354 com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidade abreviada corresponde a Itabapoana: São Francisco de Itabapoana (RJ). Localidades agrupadas correspondem a AL (1): Ibatiguara e Murici (AL); ES (4): Santa Teresa Vitória e Domingos Martins (ES); GGMacacu(6): Garrafão, Guapimirim, e Cachoeiras de Macacu (RJ); Picinguaba(8): Paraty (RJ) e Ubatuba (SP); RbGde7 (10): Ribeirão Grande e Sete Barras (SP); e PR(13): Wenceslau Brás e Pinhalão (PR).

354	Locas. unidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	AL	0														
2	Itabuna	0,952	0													
3	Marliéria	1	0,333	0												
4	ES	0,886	-0,008	0,241	0											
5	Itabapoana	1	0,333	1	0,241	0										
6	GGMacacu	0,914	0,392	0,332	0,112	0,332	0									
7	Ilha Grande	0,977	0,302	0,75	0,261	0,75	0,416	0								
8	Picinguaba	0,978	0	0,333	-0,248	0,333	-0,242	0,323	0							
9	Caucaia do Alto	1	0	1	-0,423	1	-0,687	0,6	-1	0						
10	RbGde7	0,942	0,5	0,333	0,452	0,333	0,523	0,636	0,348	0	0					
11	Sorocaba	1	0	1	-0,423	1	-0,687	0,6	-1	0	0	0				
12	Buri	1	0,667	1	0,388	1	0,425	0,836	0,667	1	0,25	1	0			
13	PR	0,947	0,497	0,333	0,247	0,333	0,196	0,593	0,124	-0,5	0,463	-0,5	0,506	0		
14	Morretes	1	0,333	1	0,241	1	0,332	0,75	0,333	1	-0,2	1	1	0,333	0	
15	Foz do Iguaçu	1	0,5	1	0,483	1	0,566	0,818	0,6	1	0,5	1	1	0	1	0

Tabela 3.12.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par de todas as localidades do conjunto de dados de 600pb, com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidades abreviadas correspondem a StaTeresa: Santa Teresa (ES), DMartins: Domingos Martins (ES), Itabapoana: São Francisco de Itabapoana (RJ), Guapi: Guapimirim (RJ), Macacu: Cachoeiras de Macacu (RJ), IlhaGde: Ilha Grande (RJ), Caucaia: Caucaia do Alto (SP), RbGde: Ribeirão Grande (SP), 7Barras: Sete Barras (SP), WBrás: Wenceslau Brás (PR), Foz: Foz do Iguaçu (PR).

600	Localidds	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Ibateguara	0																				
2	Itabuna	0,897	0																			
3	StaTeresa	0,838	-0,034	0																		
4	Vitória	0,985	0,667	0,310	0																	
5	DMartins	1	0,647	0,5	0,906	0																
6	Itabapoana	1	0,2	0,067	0,667	1	0															
7	Garrafão	0,935	0,521	0,373	0,143	0,627	0,312	0														
8	Guapi	0,916	0,464	0,353	-0,031	0,544	0,118	0,106	0													
9	Macacu	0,915	0,489	0,376	-0,040	0,557	0,085	0,156	0,089	0												
10	IlhaGde	1	-0,333	-0,2	0,5	1	1	-0,323	-0,331	-0,177	0											
11	Paraty	1	-0,333	-0,2	0,778	1	1	0,283	0,151	0,238	1	0										
12	Ubatuba	1	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0									
13	Caucaia	1	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0								
14	RbGde	1	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0	0							
15	Sorocaba	1	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0	0	0						
16	7Barras	1	0,714	0,506	0,901	1	1	0,689	0,594	0,578	1	1	1	1	1	1	0					
17	Buri	1	0,6	0,311	0,744	1	1	0,445	0,287	0,250	1	1	1	1	1	1	1	0				
18	Pinhalão	0,980	0,571	0,25	0,041	0,9	0,5	0,209	0,016	-0,021	0,5	0,714	-1	-1	-1	-1	0,868	0,676	0			
19	WBrás	1	0,714	0,506	0,901	1	1	0,689	0,594	0,566	1	1	1	1	1	1	1	1	0,868	0		
20	Morretes	1	0,2	0,067	0,667	1	1	0,312	0,118	0,085	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	0
21	Foz	1	0,333	0,236	0,818	1	1	0,522	0,394	0,339	1	1	1	1	1	1	1	1	0,714	1	1	0

Tabela 3.13.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par de todas as localidades excluindo as localidades de AL, para o conjunto de dados de 600pb, com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidades abreviadas correspondem a StaTeresa: Santa Teresa (ES); DMartins: Domingos Martins (ES), Itabapoana: São Francisco de Itabapoana (RJ), Macacu: Cachoeiras de Macacu (RJ), IlhaGde: Ilha Grande (RJ); Caucaia: Caucaia do Alto (SP), RbGde: Ribeirão Grande (SP), 7Barras: Sete Barras (SP), WBrás: Wenceslau Brás (PR), Foz: Foz do Iguaçu (PR).

600	sem AL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Itabuna	0																			
2	StaTeresa	-0,034	0																		
3	Vitória	0,667	0,310	0																	
4	DMartins	0,647	0,5	0,906	0																
5	Itabapoana	0,2	0,067	0,667	1	0															
6	Garrafão	0,521	0,373	0,143	0,627	0,312	0														
7	Guapimirim	0,464	0,353	-0,031	0,544	0,118	0,106	0													
8	Macacu	0,489	0,376	-0,040	0,557	0,085	0,156	0,089	0												
9	IlhaGde	-0,333	-0,2	0,5	1	1	-0,323	-0,331	-0,177	0											
10	Paraty	-0,333	-0,2	0,778	1	1	0,283	0,151	0,238	1	0										
11	Ubatuba	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0									
12	Caucaia	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0								
13	RbGde	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0	0							
14	Sorocaba	0	-0,2	-1	1	1	-0,229	-0,616	-0,710	1	1	0	0	0	0						
15	7Barras	0,714	0,506	0,901	1	1	0,689	0,594	0,578	1	1	1	1	1	1	0					
16	Buri	0,6	0,311	0,744	1	1	0,445	0,287	0,250	1	1	1	1	1	1	1	0				
17	Pinhalão	0,571	0,25	0,041	0,9	0,5	0,209	0,016	-0,021	0,5	0,714	-1	-1	-1	-1	0,868	0,676	0			
18	WBrás	0,714	0,506	0,901	1	1	0,689	0,594	0,566	1	1	1	1	1	1	1	1	0,868	0		
19	Morretes	0,2	0,067	0,667	1	1	0,312	0,118	0,085	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	0	
20	Foz	0,333	0,236	0,818	1	1	0,522	0,394	0,339	1	1	1	1	1	1	1	1	0,714	1	1	0

Tabela 3.14.: Matriz dos valores de Fst para comparações par-a-par das localidades cujas distâncias menores de 50km são agrupadas para o conjunto de dados de 600pb, com valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Localidades abreviadas correspondem a Itabapoana: São Francisco de Itabapoana (R.J). Localidades agrupadas correspondem a ES (3): Santa Teresa, Vitória e Domingos Martins (ES); GGMacacu(5): Garrafão, Guapimirim, e Cachoeiras de Macacu (R.J); Picinguaba(6): Paraty (RJ) e Ubatuba (SP); RbGde7 (9): Ribeirão Grande e Sete Barras (SP); e PR(12): Wenceslau Brás e Pinhalão (PR).

600	Locas. unidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Ibateguara	0													
2	Itabuna	0.897	0												
3	ES	0.829	-0.062	0											
4	Itabapoana	1	0.2	-0.024	0										
5	GGMacacu	0.91	0.46	0.239	0.062	0									
6	Ilha Grande	1	-0.333	-0.556	1	-0.337	0								
7	Picinguaba	0.952	0.143	-0.138	0	-0.128	-1	0							
8	Caucaia	1	0	-0.355	1	-0.73	1	-1	0						
9	RbGde7	0.945	0.547	0.312	0.333	0.357	0.333	0.333	0	0					
10	Sorocaba	1	0	-0.355	1	-0.73	1	-1	0	0					
11	Buri	1	0.6	0.222	1	0.238	1	0.5	1	0.25	1	0			
12	PR	0.926	0.506	0.25	0.083	0.176	0.083	0.109	-0.571	0.376	-0.571	0.339	0		
13	Morretes	1	0.2	-0.024	1	0.062	1	0	1	-0.2	1	1	0.083	0	
14	Foz do Iguaçu	1	0.333	0.176	1	0.338	1	0.333	1	0.5	1	1	-0.222	1	0

3.2.3. Tempos de divergência

Os valores de verossimilhança calculados no pacote PHYLIP são $-\ln L = 2331.71023$ para a árvore sem relógio molecular imposto e $-\ln L = 2367.8402$ com essa restrição ($LRT = 72,2599$), calculados apenas para o conjunto de dados de 600pb. O teste de χ^2 indica que não há diferenças significativas entre as duas verossimilhanças, portanto relógio molecular pode ser assumido ($gl = 65$, $P = 0,251$). Dessa forma, dado que a diferença média aritmética entre *D. virginiana* para com as outras espécies de *Didelphis* usadas é de 45 substituições, ou seja, 0,075 substituições/sítio, temos que em cada ramo há 0,0375 substituições. Isso, ao longo de 3Maa, resulta em uma taxa de mutação de 1,25%/Maa/sítio. Este é, portanto, o valor de μ utilizado neste estudo.

As estimativas de $E[TACMR]$ e θ entre as três réplicas feitas para todas comparações par-a-par entre os quadrantes de latlong, na maioria, não diferiram muito entre si. Os gráficos representando a sobreposição das três funções para θ está apresentado na figura A.1, em anexo. Adicionalmente, o desvio padrão entre as três réplicas está apresentado acima da diagonal na tabela 3.17. Os valores do tempo de divergência estão na mesma tabela, abaixo da diagonal.

As separações mais antigas aparecem entre o quadrante A1, composto pelos indivíduos de AL, com todos os outros quadrantes, principalmente do ES até PR (nestes, variam de cerca de 624 a 772 mil anos; com o quadrante da BA, o tempo de divergência é de 530 mil anos – média de 648.702 ± 80.325). No outro extremo, de separações mais recentes, aparecem as comparações que envolvem os quadrantes E3 e E4, ambos do estado do PR principalmente quando se compara estes dois quadrantes entre si (cerca de 44 mil anos). A média do tempo de divergência entre os quadrantes excluindo AL é de 141.536 ± 59.550 anos. A média das comparações da BA com todos os outros quadrantes (menos AL) é de 159.033 ± 37.152 . Excluindo AL e BA, a média é de 132.788 ± 68.175 .

3.2.4. Subamostras

Ao selecionar ao acaso 100 réplicas com tamanhos $n = 5, 10, 20$ e 50 das populações de Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ), o comportamento das estimativas de D de Tajima e F de Fu são bastante distintos entre cada tamanho de subamostra (Fig. 3.12). Quanto maior o tamanho da subamostra, os valores para ambas estimativas se tornam mais negativos e mais frequentes. No caso de D de Tajima, a variância também é menor quanto maior o tamanho da subamostra. A população total das três localidades juntas ($n = 90$), cujos indivíduos foram utilizados em todas as análises filogeográficas, tem valor observado para D de Tajima de $-0,903$ ($P = 0,194$), e para F de Fu de $-20,393$ ($P < 0,0001$). Estes estão indicados por uma seta na Fig. 3.12. Em relação ao comportamento da probabilidade dos valores de D e F (Fig. 3.13), em ambos os casos com o aumento do tamanho da subamostra, a curva se comporta mais similarmente a um crescimento exponencial, chegando a basicamente probabilidades assintóticas com tamanho de $n = 50$.

A análise de diferenciação entre os fragmentos (Tabela 3.18) mostra um valor médio de F_{st} de $0,343 \pm 0,139$, que pode ser considerado relativamente alto levando em conta a proximidade geográfica dos fragmentos. As únicas comparações que não são significativas são para a maioria do fragmento 9 (município de Cachoeiras de Macacu), algumas dos fragmentos 2 e 19 (município de Guapimirim) e a comparação do fragmento 5 (Cachoeiras de Macacu) com 18 (Guapimirim). Como não é o intuito deste trabalho discutir a fragmentação dentro dessas três localidades, a única comparação

Tabela 3.15.: Matriz dos valores de Fst para as comparações par-a-par dos quadrantes como definidos na Fig.2.7, apresentando valores significativos em negrito para $P < 0,05$. Em (A) valores para latitude, (B) para longitude, e (C) para os quadrantes unindo latitude e longitude (latlong). Apresenta-se também os valores de Fst para os grupos definidos pelo PC1 da latitude e longitude (diagonal) para 354pb (D) e 600pb (E). Nestes dois casos, e ao contrário dos quadrantes, a ordem numérica crescente reflete a distribuição do sul ao nordeste brasileiro.

	A	B	D	E
A	0			
B	0,897	0		
D	0,899	0,407	0	
E	0,936	0,364	0,091	0

(a)

	1	2	3	4
1	0			
2	0,717	0		
3	0,587	0,178	0	
4	0,528	0,207	0,322	0

(b)

	A1	B1	D2	D3	D4	E3	E4
A1	0						
B1	0,897	0					
D2	0,9	0,402	0				
D3	0,944	0,606	0,182	0			
D4	0,926	0,506	0,163	0,281	0		
E3	1	0,2	0,018	0,03	0,083	0	
E4	1	0,333	0,3	0,515	-0,222	1	0

(c)

	1	2	3	4	5
1	0				
2	0,286	0			
3	0,557	0,074	0		
4	0,448	0,114	0,098	0	
5	1	0,879	0,910	0,872	0

(d)

	1	2	3	4
1	0			
2	0,085	0		
3	0,163	0,133	0	
4	0,911	0,910	0,849	0

(e)

Tabela 3.16.: Resultados dos testes de neutralidade D de Tajima e F de Fu e Li com seus valores de probabilidade (P), sendo em negrito os valores significativos a $P < 0,05$. As duas primeiras linhas se referem ao resultado para toda a amostra de *D. aurita*, para 354 e 600pb. Após estas linhas, mostra-se os resultados dos quadrantes de latlong, e após do PC1 da latitude e longitude (diagonal), ambos excluindo os indivíduos de AL. Quadrantes com – indicam que a estimativa não pôde ser calculada, devido à ausência de polimorfismos, ou menos de duas (F de Fu) ou quatro seqüências (D de Tajima).

	D de Tajima	P	F de Fu	P
<i>D. aurita</i> 354	-1.499	0,03	-23.827	<0,0001
<i>D. aurita</i> 600	-1,839	0,005	-26,421	<0,0001
354 Latlong				
B1	–	–	1,386	0,46
D2	-1,241	0,08	-24,989	<0,0001
D3	1,107	0,86	0,789	0,63
D4	0,957	0,81	0,804	0,65
E3	–	–	–	–
E4	–	–	–	–
600 Latlong				
B1	–	–	0,693	0,35
C2	–	–	–	–
D2	-1,279	0,08	-17,265	<0,0001
D3	1,107	0,86	0,788	0,63
D4	1,459	0,96	1,688	0,75
E3	–	–	–	–
E4	–	–	–	–
354 Diagonal				
1	–	–	–	–
2	-0,287	0,448	-1,653	0,142
3	-0,862	0,219	-12,553	<0,0001
4	0,063	0,557	-1,799	0,084
600 Diagonal				
1	-0,618	0,307	-3,505	0,017
2	-0,851	0,204	-19,862	<0,0001
3	0,726	0,803	-0,786	0,32

Tabela 3.17.: Tempo de divergência (em anos) calculado entre os quadrantes de latlong para o conjunto de dados de 600pb abaixo da diagonal, e os desvios padrão considerando as três réplicas para a estimativa de θ . Taxa de mutação μ calculada como sendo 1,25% por sítio por milhão de anos.

	A1	B1	D2	D3	D4	E3	E4
A1	–	47.571	18.648	15.778	29.547	43.651	31.380
B1	530.515	–	4.713	11.247	11.556	9.832	9.866
D2	771.756	218.597	–	10.526	5.496	3.711	6.597
D3	636.555	153.463	210.785	–	7.201	6.969	5.250
D4	634.171	164.235	207.301	116.881	–	2.177	3.368
E3	623.877	120.403	209.408	72.435	89.997	–	7.415
E4	695.336	138.468	209.684	85.077	82.026	44.290	–

Figura 3.12.: Frequência absoluta dos valores de D de Tajima e F de Fu em 100 réplicas de subamostras ($n = 5, 10, 20$ e 50) sorteadas ao acaso da população total ($n = 90$) das localidades de Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ). A seta indica o valor de D de Tajima e F de Fu observados considerando a população total.

que se deve chamar atenção é entre Garrafão e o fragmento 2, não significativa, sendo que esses dois locais são separados pela cidade de Guapimirim.

3.3. Dados morfológicos e moleculares

Comparando as distâncias morfológicas (distância D^2) com as distâncias genéticas (Tabela 3.19), as únicas comparações significativas a $P < 0,05$ são as das fêmeas (dados originais e sem tamanho) com os quadrantes de latlong para o conjunto de dados de 354pb. Essa correlação também aparece em 600pb, mas apenas marginalmente significativa.

Tabela 3.18.: Valores de Fst para cada um dos fragmentos presentes nas localidades de Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ), com valores significativos a $P < 0,05$ em negrito

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Garrafão	0								
2	Rosimeri	0,167	0							
3	Frag 9	0,130	-0,086	0						
4	Frag 5	0,516	0,299	0,5	0					
5	Frag 4	0,357	0,192	0,195	0,523	0				
6	Frag 2	0,079	0,197	0,130	0,498	0,294	0			
7	Frag 19	0,309	0,02137	0,0149	0,559	0,204	0,334	0		
8	Frag 18	0,488	0,304	0,348	0,25	0,505	0,475	0,503	0	
9	Frag 13	0,266	0,067	0,0407	0,454	0,155	0,279	-0,005	0,443	0

Tabela 3.19.: Valores de correlação (r) e probabilidade (P) do teste de Mantel comparando as distâncias morfológicas e moleculares para os grupos definidos pelos grids de latitude, longitude e latlong. Na morfologia, fêmeas (F) e machos (M) com os dados originais e sem tamanho (Y) são usados. No marcador molecular cytB, os conjuntos de dados de 354 (à esquerda) e 600pb (à direita) são usados. Valores de $P < 0,05$ aparecem em negrito. Em P, – significa que o teste de Mantel não pôde ser calculado (matrizes de 3x3), e portanto apenas a correlação de Pearson é apresentada.

	r	P	r	P
Latitude	354		600	
Originais F	0,374	0,381	0,996	–
Y F	0,338	0,365	0,999	–
Originais M	0,210	0,322	0,926	–
Y M	-0,105	0,505	0,999	–
Longitude	354		600	
Originais F	0,683	0,085	0,694	0,170
Y F	0,690	0,086	0,674	0,206
Originais M	0,510	0,252	0,455	0,252
Y M	0,425	0,245	0,327	0,329
Latlong	354		600	
Originais F	0,687	0,034	0,681	0,079
Y F	0,737	0,024	0,678	0,080
Originais M	-0,120	0,413	-0,188	0,322
Y M	-0,083	0,425	-0,217	0,337

Figura 3.13.: Valores de probabilidade em função das estimativas de D de Tajima (acima) e F de Fu (abaixo) considerando tamanhos de subamostras ($n = 5, 10, 20$ e 50) sorteadas ao acaso da população total ($n = 90$) das localidades de Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ).

4. Discussão

4.1. Variação geográfica

4.1.1. Medidas cranianas

Resumindo os primeiros resultados de variação geográfica craniana, temos que: [1] no menor nível hierárquico, considerando as comparações entre localidades, apenas as fêmeas apresentam correlação positiva e significativa com a distância geográfica (Fig. 3.1); [2] no nível hierárquico seguinte, de quadrantes, a associação geográfica das fêmeas provavelmente está estruturada em termos de longitude, e machos passam a mostrar correlação positiva e significativa com longitude (Tabela 3.1); e [3] o melhor critério agrupador aparece para os machos, com a estruturação imposta sob o critério do PC1 da latitude com longitude (diagonal) (Tabela 3.3).

Então, em um primeiro momento, apenas as fêmeas mostram associação com a geografia provavelmente devido à estruturação longitudinal, apesar de a variação geográfica não explicar tanto a variação total encontrada no crânio (Tabela 3.3). Isso significa de forma grosseira que dentre as populações da BA; de MG, ES e RJ; SP e oeste do PR; e leste do PR há alguma distinção razoavelmente grande para ser refletida no alto valor da correlação de Pearson ($r = 0,922$ e $0,939$ para dados com e sem tamanho, respectivamente). Quando se une os estados de SP, RJ e ES; o oeste e leste do PR; e grande parte das localidades de MG e BA, não há diferenciação significativa. Isso indica que rearranjar a variação de determinados estados estruturados longitudinalmente apaga o sinal da diferenciação. Porém, apenas com esses resultados, não é possível saber em quais.

Os machos, que antes não apresentavam nenhuma associação geográfica, passam a mostrar significância no teste de Mantel para longitude, e também latitude, mas apenas dos dados sem tamanho; mas não para latlong. Os quadrantes de latlong separam, de forma também grosseira, cada estado brasileiro. Portanto, há incrementos na distinção do crânio entre as faixas longitudinais, mas quando considerados os quadrantes de latlong, provavelmente há mais variação dentro de cada estado de forma a não permitir associação do aumento de variação no crânio com o aumento da distância geográfica.

Nesse momento, os resultados provenientes da classificação de grupos através do PC1 da latitude e longitude (diagonal) ajudam a clarear o que está ocorrendo com a variação geográfica de *D. aurita*. Isso porque em grande parte os agrupamentos formados não impõem como critério que populações morfologicamente distintas estejam também separadas geograficamente (Fig. 2.4). Assim, a diferenciação das medidas (Tabela 3.5 e Fig. 3.3) mostram para os machos que há muitas diferenças significativas entre os grupos definidos por este critério e, através do teste de Tukey (Tabela A.4.2), percebe-se que essas diferenças provêm de distinções entre os indivíduos da BA (grupo 8), mas também entre indivíduos dos estados de SP (grupos 2, 3 e 4), RJ (grupo 5) e também PR e Argentina (grupo 1). Isso indica que dentro de localidades próximas existe certa diferenciação entre as populações dos machos de gambá que, cada qual da sua forma, se reflete nas correlações da latitude e longitude, mas não pode ser recuperada em latlong.

Essa diferenciação ao longo da diagonal mostra ser, no caso dos machos, o melhor critério discriminante, como visto nas porcentagens originais e obtidas por *jackknife* mais similares (Tabela 3.3). Essa mesma tabela mostra que a variação geográfica não afeta drasticamente as diferenciações dentro de populações de *D. aurita*. Ao mesmo tempo, como o grau de diferenciação em questão é intraespecífico, não se esperava porcentagens de classificação correta altas, como as obtidas em diferenças entre espécies, por exemplo. Retornando aos machos, a separação das localidades próximas ao ecótono da Floresta Atlântica com o cerrado *latu sensu* só é significativa para este sexo (Tabela 3.5). Portanto, a diferenciação vista nos estados abaixo da BA pode ter alguma relação com a diferença dos habitats, mais próximos ou distantes do ecótono. Uma possível explicação para esta influência estar sendo vista apenas nos machos vem dos resultados do trabalho de Mendel et al. (2008). Os machos se movem mais em relação às fêmeas (Loretto and Vieira, 2005), o que nos faria esperar o oposto, isto é, ausência de diferenciação devido ao alto fluxo gênico. Mas, como Mendel et al. (2008) demonstram, essa maior mobilidade faz com que eles sejam mais afetados por fatores ecológicos estocásticos. Isso significa que os machos respondem mais a alterações no habitat, gerando diferenças que refletem mais as condições do local onde viveram. Ou seja, se estão numa área de ecótono com uma disponibilidade de recursos menor do que numa área de mata contínua, o desenvolvimento do animal, que se reflete no desenvolvimento do crânio, reflete melhor essa diferença ecológica atual. Isso não é visto nas fêmeas que, apesar da menor mobilidade que nos faria esperar maior estruturação geográfica, regulam a dinâmica populacional num ciclo retroativo negativo entre a densidade e a biomassa (que se reflete no tamanho do crânio) (Mendel et al., 2008). Como num estudo realizado em dez anos as populações se mantiveram estáveis (Kajin, 2008), isso pode significar que, ao longo de um tempo maior, as populações das fêmeas não reflitam diferenças locais.

Esta hipótese para o caso das fêmeas poderia também explicar o porquê da sua associação longitudinal, que provém na realidade de apenas uma grande diferença dos indivíduos da BA (grupo 8, e todos na longitude 1, mas não na mesma latitude) em relação aos outros grupos. Essa diferenciação se baseia em isolamento por distância, que só aparece quando uma espécie possui ampla distribuição e, dentro dela, apresenta uma variação clinal em cujos extremos do gradiente as populações podem se diferenciar. Como o crânio das fêmeas não refletem variações locais, a única diferença significativa aparece em um efeito mais antigo e estável ao longo do tempo, como é o esperado por isolamento por distância. Ou, como também se pode imaginar, essa diferença da BA com o resto da distribuição vem de uma quebra histórica, ainda mais antiga.

Esta é, inclusive, a única distinção que aparece tanto em machos como em fêmeas, dos indivíduos da BA em relação ao resto da distribuição. Isso indica que há uma quebra na distribuição morfológica do gambá, recuperada para fêmeas pelo teste de Mantel no maior nível hierárquico, e provavelmente apagada nos machos devido às diferenciações encontradas também abaixo do estado da BA. Uma nota relevante aqui é que, apesar de a BA ser representada por apenas duas localidades, essas foram bem amostradas ($n=10$ para fêmeas e $n=20$ para machos), e portanto as diferenças encontradas têm poder estatístico. Como os resultados concordam entre os sexos, é possível que essa quebra provenha de um evento ainda mais antigo, e não seja apenas devido à isolamento por distância.

Os resultados discutidos até o momento mostram que tentar descrever a variação geográfica em termos de latitudes e longitudes pode não ser exatamente um critério adequado para casos como o da Floresta Atlântica. Levando em conta que a floresta

se distribui basicamente numa diagonal ao longo da costa brasileira, considerar apenas a variação geográfica em termos de latitude e longitude significa muitas vezes repetir uma separação ao longo da distribuição da floresta, ou agrupar populações biológicas distintas, mas próximas geograficamente. Em outras palavras, e tomando o exemplo dos indivíduos da BA, tanto na latitude quanto na longitude este será o quadrante mais distinto do resto da amostra. Até esse ponto, o inconveniente é apenas a redundância da informação e potencial atribuição a uma correlação à latitude ou longitude, quando na realidade a diferenciação é apenas do extremo da diagonal com o restante dos grupos. Por outro lado, quando há diferenciação entre populações muito próximas geograficamente, como é o caso dos machos, e que acabam sendo classificados dentro de um mesmo quadrante, um sinal de associação geográfica que existe acaba sendo apagado na correlação de uma escala espacial maior.

O segundo tópico que merece ser discutido em relação à variação geográfica craniana é que a variação nas fêmeas é mais influenciada pelo controle da variação de tamanho, visto nas tabelas 3.3 e 3.4. Isso indica que a distinção dos crânios da BA em relação ao resto da distribuição provavelmente é uma variação de tamanho, sendo que na BA os crânios são maiores (Fig. 3.4). A distinção do grupo da BA nos machos também existe, apesar de não tão evidentemente quanto nas fêmeas. Hershkovitz (1969), resumindo variação geográfica nos neotrópicos, coloca esse tipo de variação como uma regra dentro de mamíferos, pela qual do sul para o norte e do oeste para leste os crânios aumentam de tamanho (não sendo influenciados em termos de altitude).

4.1.2. CytB

Em relação à variação geográfica do cytB temos inicialmente que: [1] *D. aurita* apresenta alta diversidade haplotípica, mas baixa diversidade nucleotídica (Tabela 3.6); [2] as árvores filogenéticas mostram que a divergência entre *Didelphis* e seu gênero irmão *Philander* são pequenas (Figs. 3.6 e 3.9); [3] o haplótipo de AL é relativamente bastante divergente de todos os outros haplótipos da espécie, sendo que nestes últimos não há nenhuma estruturação aparente (Figs. 3.8 e 3.9); [4] existe uma correlação alta e significativa entre distância genética e geográfica, mas ela reduz drasticamente quando o haplótipo de AL é retirado (Figs. 3.10 e 3.11); [5] nos testes de associação geográfica com os quadrantes, correlações positivas e significativas também aparecem para longitude e latlong e, novamente, quando retirado o haplótipo de AL, o valor de r diminui (Tabela 3.7); [6] de forma geral, existe maior diversidade entre os grupos classificados por todos os critérios (localidades, localidades unidas, latitude, longitude e latlong) quando comparada à diversidade dentro dos grupos mas, retirando o haplótipo de AL, maior parte da diversidade passa a estar apenas dentro dos grupos (Tabela 3.8); [7] os valores de F_{st} são em média bastante altos quando comparando as localidades de AL com o restante das localidades, mas não mostram incrementos significativos com o aumento da distância geográfica (Tabelas 3.9 a 3.14); [8] valores significativos de F_{st} aparecem na maioria dos casos dentro e entre as localidades de Santa Teresa, Vitória e Domingos Martins (ES) e Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ) (Tabelas 3.9 a 3.14); [9] reunindo localidades com distâncias menores que 50km, o grupo do PR (Wenceslau Brás e Pinhalão) passa a apresentar diferenças significativas em novas comparações (Tabelas 3.11 e 3.14); [10] apenas com a melhor amostragem de Ilha Grande (RJ) no conjunto de dados de 354pb aparecem valores de F_{st} significativos em algumas das comparações (Tabelas 3.9 a 3.11); e [11] considerando F_{st} entre quadrantes (Tabela 3.15A a C) não só valores de diferenciação

altos aparecem para AL, mas também para a BA.

A questão do parafiletismo de *Philander* (Figs. 3.6 e 3.7) muito provavelmente provém de uma deficiência amostral da espécie *P. frenata*, representada por um indivíduo apenas. Portanto, é um artefato da árvore estimada neste estudo, sendo que possivelmente esta espécie formaria um grupo monofilético e irmão de *P. opossum*. Independentemente dessa discussão, o que importa para o presente trabalho é que a divergência entre os dois gêneros é pequena, como já mostrado em diversos estudos (*e.g.* Patton et al. (1996); Palma and Spotorno (1999); Jansa and Voss (2000)). A divergência dentro de *Didelphis* é ainda menor, como também mostram os trabalhos de Patton et al. (1996) – 6,1 a 11,7% (K-2p) e Patton and Costa (2003) – 3,04 a 9,46% (K-2p). Levando em conta apenas *D. aurita*, não só as árvores da espécie mostram isso (Figs. 3.8 e 3.9), mas também a tabela 3.6. Apesar da baixa diversidade nucleotídica, o número de haplótipos é grande, refletindo na árvore com diversos ramos curtos com baixo suporte, diversas politomias, assim como a composição de haplótipos provenientes de localidades bastante distantes dentro de um mesmo clado. Esse tipo de topologia é conhecido como árvore em estrela, e no geral indica uma linhagem não estruturada geograficamente, mas também sinal de expansão demográfica recente.

Mesmo dentro deste baixo grau de diversidade, os filogramas mostram que o haplótipo de AL claramente se destaca dos outros haplótipos de *D. aurita*. A maior proximidade do primeiro haplótipo com o clado de *D. marsupialis* (Fig. 3.9) não é tão inesperada. Por muito tempo não haviam registros de *Didelphis* em AL. Apenas recentemente alguns foram encontrados e coletados (como já notam Cerqueira and Tribe (2008)), mas não se sabe com clareza se estes indivíduos são mais similares à espécie da Floresta Atlântica ou Amazônica. De qualquer forma, este haplótipo foi tratado nas análises junto com os outros *D. aurita*, mas em muitas delas ele também foi excluído. Considerando que ele seja um *D. aurita*, pode-se imaginar que existe uma estruturação norte-sul de *D. aurita* com uma quebra, digamos, no Rio São Francisco. No entanto, deve-se notar que o correspondente ao “clado sul” ocupa uma extensão vasta, compreendendo os indivíduos desde a BA até PR. Portanto, apesar de haver uma quebra na distribuição do gambá, há de se considerar que em toda a parte sul não aparece estruturação geográfica, como visto acima.

Prosseguindo com o teste de Mantel para verificar associação geográfica, como é de se esperar, a influência do haplótipo de AL é grande. Quando se exclui esse haplótipo, a correlação decresce bastante. Apesar disso, ainda há associação significativa das distâncias genética e geográfica, o que indica algum grau de diferenciação entre localidades. Através da comparação via teste de Mantel para o nível hierárquico seguinte (quadrantes), pode-se refinar qual fator dentre variação latitudinal, longitudinal ou entre quadrantes influencia esta associação.

A separação longitudinal de forma geral une os estados de AL e BA; ES, RJ e também MG (representada apenas pelo único indivíduo de Marliéria e apenas no conjunto de 354pb); deixando SP e PR sozinhos. Como a separação dos quadrantes de latlong recupera esta mesma classificação, com a única diferença da quebra das localidades de PR em três quadrantes distintos, e da separação de AL e BA, provavelmente a correlação positiva e significativa da longitude é em grande parte a responsável pela correlação também positiva e significativa observada em latlong (Tabela 3.7). A latitude deve também influenciar essa correlação, mas só aparece significativa nos dados com 600pb incluindo AL. A conclusão que se pode fazer desta análise é de que a associação da variação genética com a distância geográfica vêm em grande parte da variação longitudinal na distribuição de *D. aurita*, e também aparece na distribuição ao sul do

São Francisco com valores de r razoavelmente altos (0,759 –354 e 0,877 –600, ambos com $P < 0,05$). Apesar disso, quando analisando as porcentagens de variação dentro e entre populações abaixo do São Francisco (Tabela 3.8), a longitude ainda mostra maior variância dentro dos grupos. O contraste aqui é que mesmo tendo alta variância dentro de cada faixa longitudinal, existe alguma estruturação ao longo deste eixo para fazer o teste de Mantel aparecer significativo. Os resultados de F_{st} foram realizados com o intuito de mostrar em quais das localidades aparecem essas diferenciações observadas, ou a ausência da diferenciação como reflexo de fluxo gênico. Antes disso, e a propósito, a diferença entre os dados de 354 e 600pb nos resultados de AMOVA (Tabela 3.8), sendo em 600pb valores de porcentagem sempre menores entre populações (e por consequência maiores dentro de populações) com AL incluso, provém da menor frequência do haplótipo de AL neste conjunto de dados ($n = 2$, enquanto que em 354, $n = 4$). Retirando o haplótipo de AL, a ausência dos haplótipos de Marliéria e menor frequência do haplótipo de Ilha Grande provoca novamente menores porcentagens entre populações.

A maioria dos resultados filogeográficos foram apresentados levando em conta todas as localidades e também localidades com distâncias menores do que 50km unidas. Agrupar localidades próximas foi feita com a intenção de incrementar o poder estatístico para, principalmente, o cálculo de F_{st} . Como visto, diferenciações que já apareciam significativas nas tabelas 3.9 e 3.12 aparecem resumidas nas tabelas 3.11 e 3.14, respectivamente, mas novas comparações se mostram significativas. A mais relevante é do grupo de PR, que passa a ter diferença significativa com AL. Com este resultado, poder-se-ia sugerir algum suporte à hipótese de isolamento por distância, contudo, os valores de F_{st} são muito similares entre as localidades (ou grupos) significativas, independente da distância geográfica com AL. Além disso, a localidade mais distante de AL, Foz do Iguaçu (PR), não apresenta diferenciação significativa.

Por outro lado, quando comparando os conjuntos de dados de 354 e 600, temos que a diferença principal entre eles é a inclusão em 354pb de dois indivíduos de Murici (AL), um de Marliéria (MG) e dois indivíduos a mais de Ilha Grande (RJ) – há também outros indivíduos de Cachoeiras de Macacu (RJ), mas esta localidade já é bem amostrada para o conjunto de 600pb. Apesar de os dois primeiros casos provirem de localidades não representadas para os 600pb, devido ao baixo número amostral, a significância em muitas das comparações continua não aparecendo e portanto não acrescentam muito no refinamento das relações entre as populações de *D. aurita*. Apenas os dois novos indivíduos de Ilha Grande passam a se mostrar significativamente diferenciados em relação a algumas localidades. Esse resultado é interessante no sentido de mostrar que populações isoladas em ilhas apresentam diferenças em relação a localidades continentais relativamente próximas. No entanto, outros resultados devem ser considerados antes de continuar essa discussão.

Como já dito, a maioria das diferenciações significativas aparecem entre as localidades de Santa Teresa, Vitória e Domingos Martins (ES); e Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ). Coincidentemente, essas são também as melhores amostradas. Além disso, particularmente as localidades do RJ possuem a maioria dos polimorfismos, haplótipos e haplótipos únicos encontrados na espécie (Tabela 3.6, representados pelo quadrante D2). Sabe-se que a estimativa de F_{st} é influenciada pela frequência de haplótipos únicos (Neigel, 2002). Por isso, os resultados desta análise estão refletindo “diferenciações” basicamente destas localidades bem representadas, que acontecem de possuir alta diversidade haplotípica. Por causa disso, e agravando a situação, se o critério de agrupamento inclui num mesmo grupo populações biológicas distintas, mas

próximas geograficamente, a diferenciação entre estes grupos fica apagada pela alta diversidade de populações vizinhas que foram bem amostradas. Isso acaba se refletindo nos resultados de F_{st} mesmo considerando um nível hierárquico maior, de quadrantes (Tabela 3.15 A e C). A maioria das comparações significativas, principalmente para latlong (Tabela 3.15C) são entre os grupos que envolvem essas localidades (D, 2 e D2). No entanto, e apesar disso, a longitude (Tabela 3.15B) é significativa em todas suas comparações, com valores bastante altos para as longitudes 1 (AL e BA) e 2 (ES e RJ), reduzindo gradativamente para as longitudes 3 (SP e extremo leste do PR) e 4 (PR). Não se pode distinguir, entretanto, se essa diferenciação vem apenas de AL, ou se a BA também contribui para as diferenças entre longitudes. Isso porque nos resultados em que os dois estados estão separados (quadrantes de latlong), a influência do desbalanço das amostras não permite que se saiba se os valores de F_{st} para quadrantes com n baixo são confiáveis. Ainda assim, dentro dos valores significativos, o quadrante B1, correspondente à BA, mostra uma segunda ordem de diferenciação, não tão alta como a de AL, mas moderadamente alta.

Para entender de outra forma a mesma distribuição da diversidade genética, mais uma vez o PC1 da latitude e longitude veio a contribuir para este estudo. Através do teste de Mantel (Tabela 3.7), a correlação da variação ao longo da diagonal se mostra alta, positiva e significativa (0,835 –354 e 0,899 –600, em ambos casos com $P < 0,05$). Note que os valores não reduzem após retirar os haplótipos de AL (0,899 –354, sendo que para 600pb apenas a correlação de Pearson pôde ser calculada). Considerando por sua vez os resultados de AMOVA (Tabela 3.8), quando ainda incluindo AL o comportamento das proporções de variância é similar aos resultados das localidades e quadrantes, reafirmando que os haplótipos de AL contribuem bastante para diferenças entre populações. Por outro lado, quando AL é excluído, existe uma diferença drástica entre a porcentagem de variação dentro das populações definidas pela diagonal, em comparação com os outros critérios de agrupamento. Quase 90% da variação total está dentro dos grupos, enquanto que pelos outros critérios, está em torno de 70%.

Prosseguindo com os resultados de F_{st} para a diagonal (Tabela 3.15 D e E), os valores de diferenciação entre o grupo de AL (grupo 5 e 4, respectivamente para 354 e 600pb) continua sendo o mais alto (0,887±0,020 –354 e 0,890±0,036). Contudo, agora praticamente todas as comparações são significativas, permitindo que se afirme que há incrementos da distância genética significativos com o aumento da distância geográfica, mesmo considerando a altíssima variância dentro das populações. Em outras palavras, ao mesmo tempo que pode-se ver a alta diversidade dentro de cada grupo, também diferenças entre grupos aparecem. Um outro detalhe que aparece também nos resultados de F_{st} (Tabela 3.15D) é que olhando para os valores médios das comparações significativas entre grupos do sul do São Francisco, o que anteriormente aparecia em torno de 0,317±0,121 –354 e 0,357±0,179 –600 agora reduz para 0,211±0,231. Na realidade, este valor médio provém de apenas uma comparação, a de Foz do Iguaçu (grupo 1) com Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (grupo 3), com valor de F_{st} de 0,557, enquanto que entre as outras comparações o valor médio é de 0,096±0,020. O último valor médio reflete melhor que de fato há diferenciações significativas entre as populações ao sul do São Francisco, mas elas não são tão altas como antes apareciam. Além disso, em nenhuma comparação anterior Foz do Iguaçu havia aparecido significativa. Assim, esta população pode ser geneticamente diferenciada de outras populações, diferenciação essa que não pode ser vista quando uma estruturação inadequada imposta *a priori* a esconde, unida ao desbalanço amostral. Esses resultados fecham o quadro de isolamento por distância nesta espécie, como esperado pelos incrementos significativos

na diferenciação entre populações com o aumento da distância geográfica.

Como já dito, a diferença do critério dos quadrantes para o método de PC1 é de uma estruturação que permite diferenciação de populações independente da proximidade geográfica. Dentro da amplitude geográfica da Floresta Atlântica, um critério como a latitude não reflete tanto o gradiente climático por trás como refletiria numa comparação entre o hemisfério norte e sul, por exemplo. Sem uma estruturação adequada que reflita o gradiente climático, observa-se uma ausência de correlação com este fator, mas não necessariamente porque a espécie não responda ao clima. Similarmente, o isolamento por distância visto agora nos dados genéticos só pôde aparecer como esperado com o critério do PC1 da latitude e longitude. Dessa forma, e similarmente aos resultados cranianos, o critério de separação de quadrantes não foi fino o suficiente para detectar esse fenômeno. Mesmo que houvesse sido adotado um ângulo menor para a divisão dos quadrantes, o risco que se corre é de que, dada a distribuição das amostras moleculares, a variação iria ser fragmentada ainda mais e o número amostral de cada grupo igualmente reduzido, incorrendo ainda mais num problema de falta de suporte estatístico para as análises.

4.1.3. *D. aurita*

No nível morfológico, temos então que as fêmeas possuem correlação com a longitude, sendo que ela é basicamente devido à diferença de um dos extremo da diagonal da distribuição da floresta, isto é, da BA. Os machos, por sua vez, mostram essa mesma diferenciação, porém também possuem diferenças dentro da distribuição sul à BA, possivelmente relacionada à presença do ecótono entre Floresta Atlântica e cerrado *latu sensu*. Fêmeas e machos, a propósito, se diferenciam em termos de tamanho de crânio, sendo maiores na BA.

No nível molecular, temos que existe uma diferença clara entre o haplótipo de AL, podendo corresponder inclusive à espécie irmã de *D. aurita*, *D. marsupialis*. Essa quebra na distribuição ao norte e sul do Rio São Francisco aparece nas árvores filogenética e nas análises de AMOVA pela clara distinção deste haplótipo, que mostram também uma falta de estruturação geográfica no clado sul. Conduzindo os testes de Mantel, recupera-se a distinção do haplótipo de AL, mas associação geográfica aparece significativa na distribuição sul e, assim como na morfologia, tem grande influência da separação longitudinal do gambá na Floresta Atlântica. Os resultados de *Fst* não ajudam a esclarecer quais localidades, ou grupos de localidades, são responsáveis por essa correlação longitudinal mas, analisando a diferenciação em um nível hierárquico maior, de quadrantes, além da alta distinção apresentada por AL, um sinal de diferenciação para o estado da BA também aparece. Além disso, pouco mais pode ser inferido com o *Fst* a partir dos critérios de localidades e quadrantes. Contudo, através do critério da diagonal, percebe-se que há incrementos significativos do valor de *Fst* de AL a PR, apontando um potencial extremo sul com a significância de Foz do Iguaçu (PR), e também que há alguma estruturação (com baixo nível de diferenciação) ao sul da BA. Em suma, ao longo da distribuição genética de *D. aurita*, temos o extremo nordeste em AL, claramente distinto de todo o sul do Rio São Francisco. Além disso, possivelmente existe também uma quebra no estado da BA. Mais ao sul, há pequenas diferenciações entre populações dos estados do sudeste e sul, mas com nenhuma descontinuidade marcada. Por fim, com a diferenciação significativa de Foz do Iguaçu, pode-se afirmar que há efeito de isolamento por distância no gambá quando considerada toda a distribuição da floresta.

A separação norte-sul da Floresta Atlântica já foi encontrada para diversos taxa de mamíferos (*e.g.* Patton and Costa (2003); Moraes-Barros et al. (2006)), sendo que em muitos dos casos o norte da floresta assemelha-se mais à populações amazônicas do que com as do sul da própria Floresta Atlântica. A hipótese para explicar tal fenômeno é de que já houve ligação histórica entre as duas florestas (*e.g.* Costa (2003)). O local onde há a quebra na distribuição de espécies da Floresta Atlântica varia, sendo que na maior parte dos casos o Rio São Francisco é apontado como o divisor de terras. Isso não implica necessariamente que o rio em si seja a barreira geográfica (pelo menos não para todos os taxa), mas o fato é que ele separa a distribuição de muitos organismos.

Os dados moleculares e também a morfologia mostraram certa congruência de uma segunda quebra, possivelmente ao sul da BA. Essa congruência pode ser observada na correlação dos dados genéticos e morfológicos (Tabela 3.19), que são significativas apenas nas fêmeas para longitude, sendo que devemos entender a partir disso a distinção entre o extremo nordeste da distribuição (*i.e.*, da BA). A razão pela qual apenas esta correlação é significativa vem do fato de o critério de quadrantes esconder a também presente estruturação longitudinal dos machos, por causa das diferenciações de menor ordem devido ao efeito do ecótono. Assim, como mostrado na primeira seção deste capítulo, a distinção dos machos na BA também existe e apareceria em um critério de agrupamento que permitisse outras ordens de diferenciação. O teste de Mantel não pôde ser feito entre os dados morfológicos e genéticos para o critério da diagonal simplesmente porque os grupos definidos não correspondem às mesmas populações biológicas. Sendo assim, a utilização de ambos critérios, de quadrantes e do PC1 da latitude e longitude, só vem a complementar um ao outro, de forma a revelar a história biogeográfica de uma espécie em diferentes níveis, sob diferentes ópticas. Lembrando que essa complementaridade só foi tão importante para casos como esse, em que a distribuição da espécie acontece ao longo de uma costa que percorre a diagonal de latitudes e longitudes, e em que apesar de ser uma distribuição grande, quase continental, critérios como a latitude não refletem absolutamente o gradiente climático existente por trás.

Todo o resto da distribuição sul à BA, por outro lado, não possui diferenças morfológicas e genéticas marcadas como as apresentadas anteriormente. Os valores de F_{st} mais confiáveis, provenientes do critério de agrupamento da diagonal, mostram diferenciação significativa média de $0,096 \pm 0,020$. Mesmo considerando que há diferenciações, devido à magnitude da extensão geográfica pode-se inferir que há fluxo gênico, apesar de não ser irrestrito.

4.2. História demográfica de *D. aurita*

Os ramos curtos com baixo suporte, as diversas politomias e haplótipos compartilhados entre localidades abaixo do estado de AL muitas vezes distantes geograficamente fazem crer que *D. aurita* não é estruturada geograficamente, ou que possui sinal de expansão demográfica nessas populações. A maior porcentagem das variâncias dentro destas populações suporta a idéia de ausência de estruturação (Tabela 3.8). Em um primeiro momento, os resultados de F_{st} não mostram isolamento por distância (Tabelas 3.9 a 3.14, e também 3.15A a C). Os testes de neutralidade mostram valores negativos e significativos para a espécie tanto no conjunto de dados de 354pb quanto 600pb (Tabela 3.16). A união destes resultados suporta duas das três previsões da Hipótese de Refúgios para as populações ao sul do São Francisco.

A terceira previsão diz respeito ao tempo de divergência entre as linhagens. Por isso, apenas os grupos dos quadrantes de latlong abaixo do São Francisco serão considerados, uma vez que o sinal de expansão provém destas populações. Com uma taxa de mutação de 1,25%/Maa/sítio, a divergência entre as populações está em torno de 141.536 ± 59.550 anos. Mesmo que discutíssemos as debilidades das estimativas de tempo, não é possível associar essa magnitude de tempo de divergência à última máxima glacial, esperada em aproximadamente 20.000 anos. Se tivéssemos considerado μ de 2%, ainda assim a diferença estaria em torno de uma ordem de grandeza do esperado (resultados não mostrados). Pois bem, dentre as três previsões, a única que separa a Hipótese de Refúgios das outras hipóteses é o tempo. Mesmo com todos os outros sinais esperados por refúgios, o tempo de divergência é de centenas de milhares de anos, e não dezenas de milhares de anos. As outras evidências de refúgios refletem de fato o que se espera para refúgios?

Para entrar no mérito desta questão, devemos olhar melhor para os dados. Mas antes disso, reavaliar os resultados anteriores também é importante. As evidências apresentadas no início desta seção suportariam as previsões da hipótese, com exceção do tempo. Se tivéssemos parado o estudo por aqui, haveriam duas opções: ou a estimativa de tempo seria dúbia levando à conclusão de que as evidências levam a crer que refúgios foram importantes na história do gambá; ou houve uma expansão demográfica relacionada a outro momento do Pleistoceno. Note que até o momento, nenhuma informação sobre a variação geográfica precisaria ser usada.

Reverendo a variação geográfica sob a óptica do PC1 da latitude e longitude, revela-se que há diferenciações significativas entre os grupos ao sul de AL, isto é, as populações são estruturadas. Aparecem também sinais de isolamento por distância, com uma segunda quebra na BA (esta já aparente na tabela 3.15C), e um possível extremo sul em Foz do Iguaçu (PR). Se a espécie apresenta isolamento por distância, como os sinais de expansão demográfica ainda estariam presentes?

Olhando agora os resultados das três localidades melhor amostradas neste estudo, Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ), o *Fst* entre os fragmentos (Tabela 3.18) é de, em média, $0,343 \pm 0,139$. Levando em consideração os valores obtidos para as comparações das populações ao sul da BA ($0,096 \pm 0,020$ pelo critério da diagonal), esse valor é altíssimo – lembrando que a maior distância entre os fragmentos é de 17km (Kajin, 2008). Dessa forma, todas as comparações de *Fst* que não as pelo critério da diagonal (Tabelas 3.9 a 3.15C) estão tendenciadas pelo grau de diferenciação que existe dentro dessas três localidades. Isso já pôde ser visto na discussão da seção anterior, em que diferenciações significativas aparecem basicamente nas comparações que envolvem essas três localidades, devido à influência do excesso de haplótipos únicos que esconde a significância de outras comparações. Além disso, as outras comparações flutuaram em termos de significância quando se uniu localidades em grupos (por exemplo, a significância que Wenceslau Brás e Pinhalão apareceram apenas quando juntas no grupo “PR”), ou seja, quando se alterou a estruturação da diversidade genética. Ainda mais, algumas comparações só se mostraram significativas quando mais indivíduos eram acrescentados (como no caso de Ilha Grande, sendo que para o caso de Marliéria, um indivíduo não foi suficiente para obter significância estatística). Isso mostra que a estimativa de *Fst* é altamente influenciada pelo desbalanço nos tamanhos de amostra, pela mínima representatividade de cada localidade, e pela estrutura populacional assumida. Mais uma vez, impor uma estruturação inadequada, unindo populações biológicas distintas em um mesmo grupo, faz parecer que a divergência entre dois quadrantes é grande, quando na verdade é apenas um reflexo da distinção

na composição haplotípica de cada quadrante. Em casos como este, no qual três localidades com quase 100 indivíduos analisados mostram diferenciação altíssima mesmo sendo geograficamente próximos, a interpretação sobre o *Fst* só pode ser enganosa.

A razão pela qual aparece tamanha diferenciação dentro dessas populações foi explicada por Kajin (2008) devido ao fato desses fragmentos comporem uma metapopulação. Isto é, são populações distintas, mas há movimentos ocasionais de alguns indivíduos entre elas. Para *D. aurita*, claramente a capacidade de dispersão não seria o fator limitante. Assim como provavelmente também não são as cidades – Garrafão e o fragmento 2 são separados pela cidade de Guapimirim e não apresentam diferenciação significativa (Tabela 3.18). Outra hipótese levantada por Kajin (2008) é de que o gambá pode ser um tipo de “população espacialmente estendida” (Freckleton and Watkinson, 2002), que significa que é uma população praticamente contínua distribuída em áreas com habitats adequados à espécie, porém com qualidades variadas. *D. aurita* é uma espécie generalista e oportunista, o que a permite usar diferentes tipo de habitat, independente de sua qualidade. Na realidade, Pardini et al. (2005) e Olifiers et al. (2005) mostraram que a presença de *D. aurita* aumenta quanto maior a perturbação encontrada em fragmentos da Floresta Atlântica. Aliada ao fato de ter uma alta capacidade de dispersão, e possuir um tempo de geração relativamente curto, isso significa que a espécie possui tamanhos efetivos de população grandes, o que vem de encontro à baixa diversidade nucleotídica encontrada neste estudo, assim como o baixo grau de diferenciação em toda a extensão ao sul da BA. Por estas razões, apesar de mostrar isolamento por distância na distribuição de AL a PR, ao sul da BA, *D. aurita* se comporta como uma população panmítica, apresentando baixo grau de estruturação. E, uma das possíveis explicações para a diferenciação observada nas localidades do RJ é de que ao longo da fragmentação da floresta, um processo de amostragem de uma população ampla compôs cada fragmento visto hoje.

Por outro lado, a vantagem de possuir estas três localidades do RJ muito bem amostradas foi de que pôde-se investigar como as estimativas de *D* de Tajima e *F* de Fu foram afetadas pelo tamanho da amostra. Considerando os resultados observado com todos os indivíduos dessas três localidades na amostra total (Tabela 3.16), a espécie mostrou sinal de expansão mas, mais uma vez, basicamente relacionada ao quadrante D2, no qual essas localidades estão presentes. Levando em conta o critério da diagonal, novamente essas localidades apresentam sinal de expansão demográfica, apesar de que apenas para *F* de Fu e apesar de o grupo 1 para o conjunto de dados de 600pb (Foz do Iguaçu a Ilha Grande) ter mostrado significância pela primeira vez.

Quando se observa as diferenças nas estimativas para os dois testes levando em conta as subamostras de $n = 5, 10, 20$ e 50 indivíduos sorteados dentre os 90 das três localidades (Fig. 3.12), fica claro que quanto mais próximo do tamanho de amostra total, mais freqüente e mais negativo ficam os valores para as duas estimativas. O teste *D* de Tajima é mais conservador, mostrando um valor observado para essas três localidades ($-0,903$, indicado pela seta) intermediário entre a distribuição das subamostras de 20 e 50 , sem dar uma probabilidade significativa ($P = 0,194$). O teste *F* de Fu estimou o valor observado no extremo mais negativo da distribuição da subamostra de $n = 50$, com significância altíssima ($-20,393$, $P < 0,0001$). A diferença entre os dois testes de neutralidade é de que *F* de Fu é ainda mais sensível à presença de haplótipos únicos, se tornando mais negativo quanto mais haplótipos únicos (Fu, 1997). Isso pode ser visto também em como as probabilidades se comportam com o aumento do tamanho da subamostra (Fig. 3.13). Ambos mostram valores altamente significativos para praticamente todas as réplica de $n = 50$, mas não só o crescimento

da função de D de Tajima é mais lento, como também a significância de F de F_u se concentra, a partir de $n = 10$, basicamente abaixo de $P < 0,05$. Mas, quando dentro de uma amostra grande como a de toda a espécie, ambos D de Tajima e F de F_u conseguem capturar que existe um excesso de haplótipos únicos, dando o sinal de expansão demográfica.

Mas o que, além de expansão demográfica, provocaria valores negativos nestas estimativas? Uma das possíveis explicações seria a existência de seleção natural, o que não foi testado neste trabalho. Entretanto, a outra explicação é justamente uma estruturação inadequada, em que se reúne populações biologicamente distintas em um mesmo grupo. Para esta possibilidade, fica claro que houve influência deste fator. A diferenciação presente nos resultados de F_{st} sob o critério de quadrantes (Tabela 3.15A a C) em comparação à da diagonal (Tabela 3.15D e E) mostraram que há populações distintas apesar de geograficamente próximas (Fig. 2.8). O próprio F_{st} entre as três localidades (Tabela 3.18) mostrou que há diferenciação em uma escala espacial muito pequena. A evidência final é o aparecimento de significância para F de F_u quando usando o critério da diagonal para o grupo 1. Considerando um critério de agrupamento diferente, pode-se ver significância onde antes não havia o sinal.

4.3. Teste da Hipótese de Refúgios

Apesar de em um primeiro momento as evidências filogeográficas apontarem para as assinaturas esperadas por refúgios, analisando os dados com mais cautela pôde-se ver que nenhuma delas é realmente confiável para atestar a importância dessa hipótese na explicação da origem da diversidade em *D. aurita*. O veredito final é dado a partir da única previsão que separa esta das outras hipóteses de diversificação: o tempo. Os eventos de divergência entre as populações definidas pelos quadrantes de latlong datam de um tempo com uma ordem de grandeza maior do que o esperado pelos refúgios. Dessa forma, os refúgios não foram determinantes no processo de diversificação do gambá na Floresta Atlântica.

Essa conclusão não significa que os refúgios não foram importantes para criar a alta diversidade encontrada nos trópicos. Mas este trabalho mostra que algumas características biológicas dos organismos podem determinar se um evento como refúgios poderia afetar o destino evolutivo das linhagens ou não. A primeira delas é o tamanho efetivo da população. Populações com tamanho efetivo pequeno, que em geral são os organismos de maior porte e menor tempo de geração, correriam um risco maior de extinção com retração florestal do que uma população amplamente distribuída, e principalmente presente em grandes quantidades. Em relação a esse fator, pode-se inclusive fazer uma crítica em relação ao trabalho de Lessa et al. (2003), que compara sinais de expansão em mamíferos da América do Norte e América do Sul, sendo que eles encontram os sinais apenas nos primeiros. A crítica se relaciona apenas à distinção em tamanhos populacionais dos organismos utilizados na comparação. Para a América do Sul, apenas pequenos mamíferos não voadores (roedores e marsupiais) de uma mesma região amazônica foram utilizados. Para a América do Norte, organismos pequenos mas também grandes (como *Ursus americanus*), com distribuição mais ampla na costa oeste do continente, pertenciam à amostra. É fácil de imaginar que para uma população de ursos é mais provável que o efeito das glaciações, principalmente no hemisfério norte, tenham sido mais determinantes do que para um roedor amazônico.

Outro fator que influencia no efeito de refúgios é a própria capacidade de dispersão.

Se o animal consegue se locomover entre refúgios, as áreas florestais não são, *strictu sensu*, um refúgio. Aliado a isso, o hábito do organismo também determina o efeito de uma glaciação sobre sua sobrevivência. Se o clima está mais seco, mais isso não é estritamente limitante para o animal forragear, reproduzir, etc., não há por que supor que os refúgios teriam isolado populações deste organismo. Isso não quer dizer que não deva ter havido uma taxa de mortalidade maior durante um período glacial, nem que algum isolamento não possa ter sido provocado, muito menos que não tenha havido algum rearranjo das populações no espaço. Mas, pensando na biologia de, por exemplo, um gambá, não é impossível imaginar que ele tenha conseguido se locomover entre áreas florestais fragmentadas, mesmo que cercadas por áreas mais secas, principalmente se o que ocorreu foi apenas uma mudança de uma floresta antes ombrófila densa para uma seca semi-decídua (como sugere Mayle et al. (2004)).

Esperamos neste trabalho que o efeito da última máxima glacial teria afetado a diferenciação dentro de uma espécie, e isso não foi constatado. Considerando que o tempo de geração de *D. aurita* é relativamente curto, isso faria com que dentro de 10.000 anos houvesse pelo menos 10.000 gerações. Nessa escala, é possível que algum grau de diferenciação entre populações houvesse surgido, mas parece não ter sido o caso. *D. aurita* possui tamanho efetivo populacional grande, boa capacidade de dispersão e hábito generalista. Mesmo que em termos de número de gerações pudesse ter aparecido isolamento, aparentemente os outros fatores contrabalançam isso. Dessa forma, mesmo que refúgios tenham promovido diversificação durante o Pleistoceno para algumas espécies, as glaciações não afetaram necessariamente toda a diversidade encontrada hoje nos trópicos.

5. Conclusões

A quebra da distribuição morfológica e molecular na espécie *D. aurita* aparece no estado da BA, havendo também uma pista de que mais ao norte haja outra quebra, no estado de AL, podendo esta inclusive corresponder à espécie irmã do gambá, *D. marsupialis*. Quando considerando o critério de agrupamento de quadrantes para os dados cranianos, essa quebra pôde ser revelada apenas para fêmeas, mas não para os machos. Isso porque machos apresentam também diferenciações de menor ordem ao longo da distribuição sul à BA, provavelmente relacionada à presença do ecótono entre a Floresta Atlântica e o cerrado *latu sensu*. Similarmente, os dados moleculares mostraram claramente a quebra da distribuição do gambá no nordeste e que há pequenas diferenciações ao sul da BA. Essas pequenas diferenciações só apareceram sob o critério do PC1 da latitude e longitude, que permite agrupamentos mais adequados de populações biológicas distintas, mesmo que geograficamente próximas. Sendo assim, a descrição da variação geográfica de *D. aurita* mostrou em ambos níveis morfológico e molecular que há isolamento por distância, com um salto na diferenciação na BA; mas que ao sul da BA, apesar de pequenas diferenciações, as populações se comportam como uma grande população panmítica.

A ausência de estruturação geográfica ao sul da BA, como observada nas árvores filogenéticas, na AMOVA, e na análise de diferenciação de F_{st} , unida aos valores significativos e negativos dos testes de neutralidade que indicariam expansão demográfica recente, deram dois importantes indícios das previsões da Hipótese de Refúgios. Entretanto, o tempo de divergência é a única previsão que claramente distingue as diferentes hipóteses de diversificação. Por mais que se considere os problemas associados às estimativas de tempo, no caso deste trabalho não se pode atribuir que as diferenciações entre as populações tenham sido influenciadas por refúgios, uma vez que os tempos aqui estimados são pelo menos uma ordem acima da última máxima glacial, que presumivelmente deveria ter deixado uma assinatura clara, dada sua intensidade.

Além disso, explorando mais a fundo o que promove a falta de significância nas análises de F_{st} e a significância dos valores negativos dos testes de neutralidade, pôde-se ver que os resultados destas análises foram tendenciadas por basicamente três localidades que foram bem amostradas. Garrafão, Guapimirim e Cachoeiras de Macacu (RJ), representadas por quase 100 indivíduos, apresentam o maior número de polimorfismos, haplótipos e haplótipos únicos. Desbalanços amostrais, baixa representatividade das localidades, e uma estruturação que reúne populações biologicamente distintas em um mesmo grupo influenciam nos resultados destas análises. A importância de entender a variação geográfica e a biologia da espécie estudada se mostraram cruciais para poder discernir entre uma explicação ou outra. Outros marcadores moleculares também ajudariam em entender melhor a história biogeográfica em questão, e tanto marcadores nucleares, que mostrariam uma história mais antiga que os mitocondriais, como microsátélites, que esclareceriam o papel da fragmentação antrópica recente.

As populações de gambá possuem tamanho efetivo grande, de forma que mutações neutras podem ter acumulado por efeito de deriva genética. No processo de fragmentação, um sorteio aleatório que ficou em cada fragmento pode explicar parte das

diferenciações observadas entre os fragmentos das localidades do RJ. Apesar da alta diversidade haplotípica, o gambá mostrou baixa diversidade nucleotídica. Assim, na escala do ES até o PR, assim como também mostraram as análises morfológicas, as populações se comportam como um grupo só.

Sendo assim, *D. aurita* mostrou a influência de isolamento por distância do nordeste para o sul da costa brasileira. Contudo, ao sul da BA a espécie se comportou como uma grande população panmítica. Dentro dessa grande população panmítica, há estruturas geográficas locais e de menor ordem com tempos de divergência muito mais antigos que a última máxima glacial. Portanto, em uma espécie que possui tamanha capacidade de dispersão, com grande tamanho efetivo de população e hábito generalista, os refúgios não se mostraram determinantes para promover diversificação entre as populações desta espécie.

A. Anexos

A.1. Gazetteer: amostras morfológicas

Localidades na América do Sul de *Didelphis aurita*

O primeiro número corresponde ao encontrado na Fig. 2.2. A abreviação que segue nomeou as populações consideradas sob o critério de localidades (ver texto). Latitude e longitude, respectivamente, dada em hexadecimais entre colchetes.

Abreviações para **museus**, como usadas por B. Lemos: British Museum of Natural History (BM); National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (NMNH); American Museum of Natural History (AMNH); Field Museum of Natural History (FMNH); Universidade Federal da Paraíba (UFPB); Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); S. Mendes Museu de Biologia Mello Leitão, Santa Teresa (MBML); Laboratório de Vertebrados, Universidade Federal do Rio de Janeiro (LabVert); Coleção Adriano Lúcio Peracchi (ALP), depositada no Laboratório de Mastozoologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP); Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN); Museo de La Plata (MLP). Abreviações para **sexo**: macho (M), fêmea (F).

1. **ILH** [-14,47 -39,02] Ilhéus (BA) FMNH 63757 (M); MNRJ 11307 (M), 11309 (M), 11314 (M), 11317 (M), 11318 (M), 11319 (M), 11321 (F), 11323 (M), 11324 (F), 11325 (M), 11327 (F), 11328 (M), 11330 (F), 11419 (F), 11424 (M), 11426 (F), 11430 (M), 11435 (M), 11437 (M), 11438 (M), 11441 (M), 11445 (M), 11446 (M), 11447 (M), 11448 (F), 11450 (M)
2. **SJ** [-15,15 -39,3] São José (BA); UFPB 466 (F), 465 (F)
3. **PS** [-16,26 -39,05] Porto Seguro (BA) UFPB 596 (F)
4. **SMT** [-18,44 -39,51] São Mateus (ES) MNRJ 28925 (F)
5. **STE** [-19,56 -40,36] Santa Tereza (ES) MBML 374 (F), 181 (F), 197 (F); MNRJ 5718 (F), 5720 (M), 20947 (M); MZUSP 6204 (F)
6. **CAM** [-20,07 -40,18] Serra (ES) MNRJ 8297 (F); [-20,09 -40,17] Campinho (ES) MNRJ 11671 (M), 23758 (M)
7. **VIT** [-20,17 -40,2] Vitória (ES) UFMG 825 (M); [-20,2 -40,2] Vila Velha (ES) MNRJ 20946 (M), 20948 (M)
8. **PEC** [-18,33 -42,33] Peçanha (MG) UFMG 633 (M)
9. **GOV** [-18,51 -41,56] Governador Valadares (MG) UFMG 950 (F), 968 (M)
10. **ITB** [-19,38 -43,12] Itabira (MG) UFMG 679 (F)
11. **PRD** [-19,4 -42,33] Parque do Rio Doce (MG) UFMG 421 (M), 434 (M)

12. **CAR** [-19,46 -41,17] Caratinga (MG) UFMG 625 (M), 663 (F), 671 (M), 719 (F), 897 (M)
13. **SG** [-19,5 -43,24] São Gonçalo Rio Abaixo (Faz. Cascata) (MG) UFMG 656 (F), 662 (F), 677 (M), 691 (M), 694 (M), 705 (M)
14. **BVM** [-19,52 -43,05] Bela Vista de Minas (MG) UFMG 616 (M), 621 (M)
15. **SDP** [-19,58 -42,55] São Domingos do Prata (MG) UFMG 620 (M)
16. **CDC** [-20,15 -43,48] Itabirito (MG) UFMG 706 (F); [-20,19 -43,4] Cachoeira do Campo (MG) UFMG 760 (F), 799 (M); [-20,23 -43,3] Ouro Preto (MG) MNRJ 20946 (M); UFMG 631 (M)
17. **PAS** [-20,43 -46,37] Passos (MG) MNRJ 22962 (M); MZUSP 13734 (M), 13749 (M)
18. **VIS** [-21,01 -42,5] Visconde do Rio Branco (MG) UFMG 817 (F)
19. **PRA** [-21,03 -44,05] Prados (MG) UFMG 419 (M)
20. **JF** [-21,45 -43,2] Juiz de Fora (MG) LabVert BL 01 (M)); MNRJ 20938 (F), 20939 (M), 20940 (F), 20941 (M)
21. **VOG** [-21,46 -42,32] Volta Grande (MG) MNRJ 3851 (M), 3871 (F)
22. **POC** [-21,5 -46,33] Poços de Caldas (MG) MNRJ 23748 (M)
23. **ALP** [-21,52 -42,4] Alem Paraiba (MG) MNRJ 3850 (M), 3852 (M), 3853 (M), 3855 (M), 3859 (M), 3865 (M), 5641 (M), 5700 (F), 5732 (M), 5744 (M), 7721 (F), 7722 (F), 20942 (F), 20943 (F)
24. **SJT** [-21,95 -43,416] São Jose das Três Ilhas (MG) ALP 2177 (M)
25. **STS** [-22,15 -45,4] Santa Rita Sapucaí (MG) UFMG 727 (F)
26. **PDS** [-21,37 -41,03] Paraiba do Sul (RJ) AMNH 133034 (M)
27. **SU** [-22,02 -42,4] Sumidouro (RJ) LabVert LBCE 98 (F), LBCE 98 (F), SU 176 (F)
28. **GL** [-22,14 -42,03] Macaé (RJ) LabVert GL 21 (F)
29. **FU** [-22,25 -42,02] Casimiro de Abreu (RJ) LabVert FU 06 (F); MNRJ 23721 (M), 30423 (M)
30. **TER** [-22,26 -42,58] Teresópolis (RJ) MNRJ 7149 (F), 7150 (M), 7151 (F), 7152 (M), 7153 (M), 7154 (M), 7155 (M), 7156 (M), 7157 (F), 7160 (M), 7163 (F), 7164 (F), 7165 (M), 7166 (F), 7167 (M), 7169 (M), 7171 (F), 7172 (M), 7175 (F), 7177 (M), 7180 (M); ZS 1937/188 (F); [-22,28 -42,59] Magé (RJ) LabVert CRB 832 (M), LBCE 325 (M); MNRJ 42795 (F)
31. **PET** [-22,31 -43,1] Petropolis (RJ) LabVert JdM 01 (F)
32. **OST** [-22,32 -41,57] Rio das Ostras (RJ) MNRJ 25677 (M)
33. **TIN** [-22,45 -43,26] Nova Iguaçu (RJ) MNRJ 28825 (M); [-22,45 -43,26] Tinguá, Nova Iguaçu (RJ) LabVert TN 37 (M), TN 38 (F)

34. **DQC** [-22,47 -43,19] Duque de Caxias (RJ) MNRJ 3793 (F), 5793 (F), 5795 (F), 5796 (M), 5808 (M), 5811 (M), 5812 (F), 5856 (F); [-22,55 -43,21] Jacareaguá (RJ) LabVert EDH 69 (M), EDH 77 (F), EDH 78 (F), EDH 80 (F)
35. **MAN** [-22,5 -44,05] São João Marcos (RJ) MNRJ 3856 (M); [-22,57 -44,02] Mangaratiba (RJ) MNRJ 3854 (M), 3858 (F), 5739 (M), 20950 (F), 24935 (M)
36. **ITG** [-22,52 -43,47] Itaguaí (RJ) ALP 1157 (M), 1158 (M), 1474 (M), 1556 (F)
37. **TIJ** [-22,53 -43,12] Floresta da Tijuca (RJ) AMNH 132989 (F); MNRJ 5614 (M), 5615 (F), 5616 (M), 5688 (M), 5740 (F), 7614 (M), 10482 (M), 10483 (M), 10485 (M), 10486 (F), 10486 (F), 10488 (M), 10490 (F), 10491 (M), 10494 (M), 10503 (F), 33425 (M); [-22,54 -43,14] Quinta da Boa Vista (RJ) MNRJ 1179 (F)
38. **MAR** [-22,55 -42,49] Maricá (RJ) LabVert MC 185 (F), MC 270 (F), MC 281 (M), MC 340 (F), MC 340i (F), MC 340ii (M); MNRJ 27827 (F), 28896 (M)
39. **IF** [-22,57 -43,13] Ilha do Fundão (RJ) LabVert IF 02 (F), IF 20i (F), IF 20ii (M), IF 20v (M)
40. **ERM** [-22,95 -44,033] Estrada Rio-Mangaratiba (RJ) MNRJ 3860 (M), 3863 (M), 30276 (M)
41. **GAV** [-22,9975 -43,285] Gavea (RJ) AMNH 132994 (M), 132996 (M), 133010 (M)
42. **MAM** [-23,01 -44,31] Mambucaba (RJ) MNRJ 42776 (M), 43966 (F), 47776 (M)
43. **ITV** [-20,22 -47,48] Ituverava (SP) MZUSP 2989 (M), 2990 (M); [-20,54 -47,49] Cândia (SP) MZUSP 13775 (M), 2991 (M)
44. **LIN** [-21,45 -49,45] Lins (SP) MZUSP 6164 (M)
45. **BOR** [-22,1 -48,45] Boraceia (SP) MZUSP 9643 (M), 9644 (F), 9650 (F), 9651 (F), 9706 (M), 10359 (F), 10359 (F), 12856 (M), 12858 (M), 12859 (M), 12878 (M), 16576 (M)
46. **CAG** [-22,29 -49,56] Casa Grande (SP) MZUSP 10138 (F), 10139 (M), 12857 (F), 12874 (F), 12875 (M), 12877 (F), 16438 (M)
47. **CRZ** [-22,34 -44,57] Cruzeiro (SP) AMNH 18990 (F); BM 1,2,7,55 (M), 1,2,7,55 (M), 1,2,7,56 (M), 1,2,7,57 (M), 1,2,7,61 (F), 1,2,7,62 (M)
48. **PIQ** [-22,37 -45,1] Piquete (SP) BM 1,6,6,90 (F)
49. **CRG** [-22,39 -45,26] Caragatatuba (SP) MZUSP 9786 (F)
50. **SFX** [-22,54 -45,58] Serra da Mantiqueira (SP) MZUSP 6546 (M)
51. **CAS** [-22,54 -47,05] Campinas (SP) MZUSP 10000 (M), 10002 (F), 10003 (F)
52. **TAU** [-23,02 -45,34] Taubaté (SP) MNRJ 23732 (F), 23733 (M)
53. **PIR** [-23,24 -47] Pirapora (Bairro do Ichu) (SP) MZUSP 16528 (M)
54. **UBA** [-23,26 -45,04] Ubatuba (SP) MNRJ 24443 (F); MZUSP 1809 (F)
55. **AFU** [-23,32 -46,37] São Paulo (SP) MZUSP 12881 (F), 16431 (M), 16601 (M)

56. **SRO** [-23,32 -47,08] São Roque (SP) MZUSP 16430 (F), 24820 (F), 24821 (M), 24822 (F), 24824 (M), 24825 (M), 24826 (M)
57. **COT** [-23,35 -46,55] Cotia (SP) MZUSP 3016 (M), 9646 (M), 9647 (F), 9648 (M), 9652 (F), 9653 (F), 9657 (F), 9666 (M), 9667 (M), 9694 (F), 9697 (F), 9699 (M), 9700 (M), 9701 (M), 9702 (F), 9703 (M), 9709 (M), 9911 (M), 9923 (M), 10045 (M), 10047 (F), 10050 (M), 10051 (M), 10052 (F)
58. **ITP** [-23,36 -48,03] Itapitininga (SP) MZUSP 16565 (M)
59. **ITO** [-23,42 -49,29] Itaporanga (SP) MZUSP 17320 (M), 17365 (M), 17365 (M), 17368 (M), 17371 (F), 17372 (F), 17373 (F), 17374 (F), 17375 (F), 19369 (M), 19374 (M), 24816 (M), 24817 (M)
60. **GUA** [-23,45 -45,55] Guaratuba (SP) MZUSP 10036 (F); NMNH 461984 (F)
61. **BER** [-23,51 -46,09] Bertioiga (SP) MZUSP 10053 (M), 9663 (F)
62. **INT** [-24,17 -48,25] Fazenda Intervales (SP) MZUSP 12882 (F), 27246 (M), 27247 (M), 27249 (M)
63. **ROC** [-24,19 -47,38] Rocha (SP) FMNH 94277 (M), 94278 (F), 94279 (M), 94280 (M), 94282 (M); [-24,19 -47,38] Morretinho (SP) FMNH 94283 (M)
64. **PM** [-24,22 -47,5] Primeiro Morro (SP) FMNH 94269 (M), 94273 (M)); [-24,22 -47,49] Barra do Rio Juguia (SP) FMNH 92956 (M); [-24,23 -47,55] Quadro Penteado (SP) FMNH 94284 (M)
65. **CAN** [-25,01 -47,57] Cananeia (SP) MZUSP 3906 (F)
66. **IDC** [-25,08 -47,58] Ilha do Cardoso (SP) FMNH 141581 (F)
67. **SDM** [-25 -48], Serra do Mar (PR) BM 3,7,1,106 (M); ZS 1901/116 (F)
68. **SDB** [-25,42 -49,34] Serra do Bananal (PR) ZS 1938/237 (M), 1938/238 (F), 1938/241 (F), 1938/242 (M), 1938/250 (M)
69. **JOE** [-26,18 -48,5] Humboldt (SC) BM 14,5,9,21 (M), 14,5,9,22 (M); [-26,2 -48,49] Joenvile (SC) BM 22,5,29,13 (F); FMNH 33599 (F); MZUSP 1680 (M), 1681 (M)
70. **CHC** [-26,26 -49,14] Colônia Hansa - Corupá (SC) BM 28,10,11,55 (M), 28,10,11,54 (F)
71. **PUI** [-25,34 -54,34] Rio Iguazu, 60 km Puerto Iguazu (MIS) MACN 51.56 (F), 51.65 (M)
72. **DES** [-25,47 -54,03] Deseado (MIS) MACN 15432 (M)
73. **ELD** [-26,15 -54,25] El Dorado (MIS) MLP EM2772 (F)
74. **MIS** [-27 -55], Rio Uruguai, 30 km Puerto Bemberg (MIS) MACN 49320 (F), 49345 (M), 49349 (M), 49392 (M), 49412 (M), 49454 (M)

A.2. Amostras moleculares

Amostras dos 194 indivíduos utilizados nas análises do marcador molecular *cytB* com: identificação do haplótipo para o banco de dados de 354 e 600pb; identificação da instituição proveniente (origem); número de campo ou acesso no Genbank (ID); sexo; município; observações; e estado ou país para os casos não brasileiros (Est/P). Para as seqüências obtidas de J. Patton e M. Kajin, um asterisco segue a origem. Para as obtidas através do Genbank, o artigo de origem é referido apenas pelo primeiro autor, sendo: Patton et al. (1996), Steiner and Catzeflis (2003), Nunes-Santos et al. (2006), e Janke et al. (1994). Linhas horizontais separam as espécies, sendo que após a primeira seguem os nove indivíduos de *Philander opossum*, então oito *D. virginiana*, oito *D. albiventris* e, por último, 30 *D. marsupialis*. Refira-se à Fig. 2.6 para o mapa de distribuição das amostras.

A ordem de apresentação dos indivíduos nesta tabela seguiu a classificação dos haplótipos para o conjunto de dados de 354pb. Assim, amostras sem haplótipo identificado pertencem ao haplótipo imediatamente acima referido. Por sua vez, para o conjunto de dados de 600pb, quando nenhum haplótipo é mencionado corresponde necessariamente ao mesmo haplótipo na coluna de 354pb, sendo que quaisquer mudanças aparecem indicadas (- indica que o indivíduo foi excluído no banco de 600pb, ou seja, possui dados faltantes). Perceba que em alguns casos apenas o número do haplótipo muda, sem alterar a composição do mesmo.

Abreviações para **museus**: Royal Ontario Museum (ROM), National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (USNM), Museum of Vertebrate Zoology (MVZ), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP); **sexo**: macho (M), fêmea (F); **origem**: Parque Nacional (PN), Parque Estadual (PE), Estação Biológica (EB), e Floresta Nacional (FN); e **países**: Canadá (Can), Estados Unidos (EUA), México (Mex), Costa Rica (CstR), Panamá (Pana), Equador (Equ), Venezuela (Venez), Guiana (Gui), e Guiana Francesa (GuiFr).

Tabela A.1.:

354	600	Origem	ID	Sexo	Município	Observação	Est/P
H1		UFPE	DAM 136		Ibateguara	Usina Serra Grande	AL
		UFPE	DAM 138		Ibateguara	Usina Serra Grande	AL
	-	UFPB	BC 30		Murici	Fazenda Bananeira	AL
	-	UFPB	BC32		Murici	Fazenda Retiro	AL
H2		MVZ*	EDH29		Itabuna		BA
	H4	MVZ*	ML119		Santa Tereza		ES
	H4	MVZ*	EDH39		Santa Tereza		ES
	H4	MVZ*	ML123		Santa Tereza		ES
	H11	UERJ	SOB 10	F	Guapimirim	PN Serra dos Órgãos	RJ
	H11	UFRJ*	FS11-84	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
H3		MVZ	ML 106	F	Itabuna		BA
	H8	UFES	LGA984		Domingos Martins	PE Pedra Azula	ES
	H8	UFES	LGA985		Domingos Martins	PE Pedra Azula	ES
	H8	UFES	LGA986		Domingos Martins	PE Pedra Azula	ES

Continua na próxima página

Tabela A.1 – Continuação

354	600	Origem	ID	Sexo	Município	Observação	Est/P
H4	-	MVZ	LPC 94	F	Marliéria		MG
H5		UFES	LGA1016		Vitória	Reserva Fonte Grande	ES
		UFES	LGA1022		Vitória	Reserva Fonte Grande	ES
		UFES	LGA1024		Vitória	Reserva Fonte Grande	ES
		UFES	LGA1026		Vitória	Reserva Fonte Grande	ES
	H12	UFRJ*	DI90		Garrafão		RJ
	H12	UFRJ*	DI4701		Garrafão		RJ
	H12	UFRJ*	DID22		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DID104		Garrafão		RJ
	H12	UFRJ*	DID4874		Garrafão		RJ
	H12	UFRJ*	FS4-67	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS5-24	M	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS5-34	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS5-41	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS5-76	M	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-15	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-16	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-24	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-30	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-32	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-34	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-53	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS15-19	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		UFRJ*	FS15-33	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		UFRJ*	FS18-02	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		UFRJ	FS 11-01	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	-	UFRJ	FS 11-07	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H12	UFRJ	FS 11-08	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 11-10	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H23	UFRJ	FS 11-13	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	-	UFRJ	FS 11-14	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H23	UFRJ	FS 11-15	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H23	UFRJ	FS 11-18	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	-	UFRJ	FS 11-21	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H27	UFRJ	FS 11-44	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H27	UFRJ	FS 11-45	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 11-50	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 11-74	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 11-79	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H27	UFRJ	FS 11-81	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 11-85	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 11-88	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 12-20	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 9	RJ
		UFRJ	FS 12-47	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	-	UFRJ	FS 12-48	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 14-04	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 14-07	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H33	UFRJ	FS 14-09	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 14-10	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 14-16	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	-	UFRJ	FS 14-19	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H29	UFRJ	FS 15-17	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		UFRJ	FS 15-18	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		IBUSP	LTS 001	F	Caucaia do Alto		SP
		IBUSP	AB31	F	Ribeirão Grande		SP
		UERJ	PSP 27	M	Ubatuba	PE S. Mar, Picinguaba	SP

Continua na próxima página

Tabela A.1 – Continuação

354	600	Origem	ID	Sexo	Município	Observação	Est/P
H6	H38	UFES	LPC 807	M	Sorocaba	FN Ipanema	SP
		IBUSP	II - M010	F	Pinhalão		PR
		IBUSP	II - M012	F	Pinhalão		PR
		IBUSP	II - M030	M	Pinhalão		PR
	H10	UFES	LGA1027		Vitória	Reserva Fonte Grande	ES
		UFRJ	LG 167	F	Paraty	Trindade	RJ
		UFRJ	IG 25		Ilha Grande	Vila Dois Rios	RJ
		UFRJ*	DI67		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DI71		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DI76		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DID2		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DID21		Garrafão		RJ
		UFRJ*	DID69		Garrafão		RJ
		UFRJ*	FS4-29	F	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS4-62	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-10	F	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-23	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-29	F	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS11-57	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ*	FS11-58	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ*	FS11-86	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H26	UFRJ	FS 11-43	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 11-77	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 12-27	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 9	RJ
	H32	UFRJ	FS 14-01	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFES	LGA 92		Santa Tereza	EB Santa Lúcia	ES
		UFES	LGA 142		Santa Tereza	EB Santa Lúcia	ES
		UFES	LGA184		Santa Tereza	EB Santa Lúcia	ES
	H8	UERJ	PSP 56	M	São Fco. de Itabapoana	Mata do carvão	RJ
	H9	UERJ	IG 21		Ilha Grande	Vila Dois Rios	RJ
		UFRJ	LGP 43	M	Ilha Grande	Vila Dois Rios	RJ
	H10	UFRJ*	FS4-65	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-09	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS8-65	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
	H11	UFRJ*	FS7-06	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-16	F	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS7-28	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
	H12	UFRJ*	FS7-32	M	Guapimirim	Fragmento 2	RJ
		UFRJ*	FS8-06	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-07	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
	H13	UFRJ*	FS8-52	M	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
		UFRJ*	FS8-02	M	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-23	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-27		Guapimirim	Fragmento 4	RJ
		UFRJ*	FS8-42	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
	H14	UFRJ*	FS8-14	M	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
	H15	UFRJ*	FS8-70	F	Guapimirim	Fragmento 4	RJ
	H16	UFRJ*	FS8-82	F	Guapimirim	Fragmento 13	RJ
	H17	UFRJ	FS 11-04	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
	H18	UFRJ	FS 11-17	M	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
		UFRJ	FS 15-20	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 19	RJ
		UFRJ	FS 15-28	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 18	RJ
		UFRJ	FS 16-18	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 5	RJ
		UFRJ	FS 16-21	F	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 5	RJ
		UFRJ	FS 16-32	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 5	RJ
	H19	UFRJ	FS 11-35	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ

Continua na próxima página

Tabela A.1 – Continuação

354	600	Origem	ID	Sexo	Município	Observação	Est/P
	H30	UFRJ	FS 11-78	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
H20	H28	UFRJ	FS 11-48	F	Cachoeiras de Macacu	Sítio Rosimeri	RJ
H21	H31	UFRJ	FS 12-07	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 9	RJ
H22	H34	UFRJ	FS 15-24	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 18	RJ
H23	-	UFRJ	FS 16-30	M	Cachoeiras de Macacu	Fragmento 5	RJ
H24	H35	MVZ*	MAM238		Sete Barras		PR
	H35	MVZ*	MAM239		Sete Barras		PR
H25	H36	IBUSP	ITM 471	F	Buri		SP
	H36	IBUSP	ITM 477	M	Buri		SP
H26	H37	MVZ*	MAM234		Morretes		PR
H27	H39	IBUSP	IIM-257	F	Wenceslau Brás		PR
	H39	IBUSP	IIM-258	F	Wenceslau Brás		PR
	H40	UFES	LPC 864	M	Foz de Iguaçu	PN Foz de Iguaçu	PR
H28	H41	Patton	POU34678		Flora, Rio Juruá	subsp canus	AM
H29	H42	Patton	POU34679		Garrafão	subsp frenata	RJ
H30	H43	Steiner	AJ487009		Trinité		GuiFr
H31	-	Nunes	DQ236271		Mamirauá		AM
	-	Nunes	DQ236275		Mamirauá		AM
H32	-	Nunes	DQ236272		Mamirauá		AM
H33	-	Nunes	DQ236273		Mamirauá		AM
H34	-	Nunes	DQ236274		Mamirauá		AM
H35	-	Nunes	DQ236276		Mamirauá		AM
H36	H44	Janke	Z29573		Berkeley	Califórnia	EUA
H37	H45	ROM*	ASK2367		San Angelo	Texas	EUA
	H45	ROM*	FN30300		Labna	Yucatán	Mex
	H45	ROM*	FN30774		El Refugio	Campeche	Mex
	H45	ROM*	FN32626		Kohunlich	Quintana Roo	Mex
	H45	ROM*	FN33111		Frontera Comalapa	Chiapas	Mex
H38	H46	ROM*	ASK2590		Constitución	Campeche	Mex
	H46	ROM*	FN32516		Walsingham	Ontario	Can
H39	H47	Steiner	AJ487004		Petit Saut		GuiFr
H40	H48	Patton	DAU34667		Araguá	Rancho Grande	Venez
H41	H49	MZUSP	DAM 115	M	Caracol	PN Serra das Confusões	PI
H42	H50	MZUSP	DAM 117	M	Caracol	PN Serra das Confusões	PI
H43	H51	UERJ	CD 216	F	Lençóis	Chapada Diamantina	BA
	H51	UERJ	CD 179	M	Lençóis	Chapada Diamantina	BA
	H52	UFES	LPC 272	F	Crato	Chapada Araripe	CE
	H52	UFES	LPC 281	M	Crato	Chapada Araripe	CE
H44	H53	Patton	DMU34665		Porongaba	Rio Juruá	AC
	H53	MPEG*	MNFS1182		Porongaba	Rio Juruá	AC
H45	H54	IBUSP	ESTR1583		Palmeirante		TO
	-	UFES	LPC 719		Peixe		TO
H46	H55	INPA*	CS1		Marabá	FN Tapirapé-Aquiri	PA
H47	H56	ROM*	F37201		Pompeya Sur	Napo, PN Yasuni	Equ
H48	H57	ROM*	F37381		Pompeya Sur	Napo, PN Yasuni	Equ
H49	H58	ROM*	F38187		Ojo de Agua	Chiriqui	Pana
	H58	USNM*	FMG2573		Punta Alegre	Bocas del Toro	Pana
H50	H59	ROM*	FAR75		Monteverde	Puntarenas	CstR
H51	H60	USNM*	FMG2634		Isla Popa	Bocas del Toro	Pana
	H60	USNM*	FMG2678		Isla Popa	Bocas del Toro	Pana
H52	H61	ROM*	FN29211		Constitución	Campeche	Mex
	H61	ROM*	FN30003		Jonuta	Tabasco	Mex
	H61	ROM*	FN30222		Chekubul	Campeche	Mex
	H62	ROM*	FN30669		X-Kanha	Campeche	Mex
	H61	ROM*	FN30864		El Refugio	Campeche	Mex
	H61	ROM*	FN32627		Kohunlich	Quintana Roo	Mex

Continua na próxima página

Tabela A.1 – Continuação

354	600	Origem	ID	Sexo	Município	Observação	Est/P
	H61	ROM*	FN32731		Escarcega	Campeche	Mex
H53	H63	ROM*	FN33112		Frontera Comalapa	Chiapas	Mex
H54	H64	ROM*	FN34599		Mapenna Creek	East Berbice-Corentyne	Gui
	H64	ROM*	FN35021		Baramita	Barima-Waini	Gui
H55	H65	ROM*	FN35048		Baramita	Barima-Waini	Gui
H56	H66	MVZ*	JLP15654		Seringal Condor	Rio Juruá	AM
	H68	MPEG*	JUR467		Arabidi	Rio Juruá	AM
	H68	MPEG*	JUR468		Ilhazinha	Rio Juruá	AM
H57	H67	MVZ*	JLP15751		Barro Vermelho	Rio Juruá	AM
H58	H69	MPEG*	MNFS1160		Porongaba	Rio Juruá	AC
H59	H70	INPA*	VCSV69		Estrada Piçarreira	PN Pico da Neblina	AM
	H70	INPA*	VCSV70		Estrada Piçarreira	PN Pico da Neblina	AM

A.3. Sítios polimórficos

Tabela A.2.: Sítios polimórficos do conjunto de dados de 600pb para todos os haplótipos, incluindo os grupos externos. A identificação dos espécimens de cada haplótipo está apresentada na Tabela A.1.

[illegible]

Tabela A.2.: Sítios polimórficos 600 – Continuação

[illegible]

A.4. Teste de Tukey

A.4.1. Fêmeas

PC1_LN								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,798	-0,057	-0,524	-0,742	-1,216	-0,240	0,368
2	0,347		0,741	0,274	0,056	-0,418	0,558	1,166
3	1,000	0,609		-0,467	-0,684	-1,159	-0,182	0,426
4	0,453	0,991	0,832		-0,217	-0,692	0,284	0,893
5	0,347	1,000	0,637	0,996		-0,475	0,502	1,110
6	0,185	0,996	0,380	0,883	0,991		0,976	1,585
7	0,998	0,884	1,000	0,991	0,910	0,711		0,608
8	0,976	0,095	0,972	0,141	0,092	0,122	0,845	

GLS									YGLS								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-5,345	-0,024	-2,339	-4,430	-5,325	-0,664	6,056	1		-1,336	0,101	0,298	-0,691	0,990	0,509	3,926
2	0,117		5,321	3,006	0,915	0,020	4,681	11,401	2	0,822		1,437	1,634	0,645	2,325	1,845	5,262
3	1,000	0,242		-2,315	-4,406	-5,301	-0,640	6,080	3	1,000	0,856		0,197	-0,792	0,889	0,408	3,825
4	0,704	0,688	0,890		-2,091	-2,986	1,675	8,395	4	1,000	0,480	1,000		-0,989	0,692	0,211	3,628
5	0,230	1,000	0,414	0,901		-0,895	3,765	10,485	5	0,992	0,998	0,992	0,888		1,680	1,200	4,617
6	0,460	1,000	0,612	0,964	1,000		4,661	11,381	6	0,992	0,751	0,998	0,999	0,936		-0,481	2,936
7	1,000	0,437	1,000	0,985	0,651	0,829		6,720	7	0,999	0,644	1,000	1,000	0,929	1,000		3,417
8	0,057	0,000	0,130	0,000	0,000	0,009	0,073		8	0,001	0,000	0,006	0,000	0,000	0,485	0,030	

MAX									YMAX								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,866	-0,446	-0,626	-0,742	-1,136	-0,601	1,923	1		0,093	-0,385	0,005	0,149	0,327	-0,319	1,459
2	0,745		0,421	0,240	0,125	-0,269	0,265	2,789	2	1,000		-0,479	-0,088	0,056	0,233	-0,413	1,366
3	0,985	0,997		-0,180	-0,296	-0,690	-0,155	2,369	3	0,937	0,935		0,391	0,535	0,712	0,066	1,844
4	0,728	1,000	1,000		-0,116	-0,510	0,025	2,549	4	1,000	1,000	0,923		0,144	0,322	-0,325	1,454
5	0,817	1,000	1,000	1,000		-0,394	0,141	2,664	5	1,000	1,000	0,856	1,000		0,178	-0,469	1,310
6	0,761	1,000	0,989	0,998	1,000		0,535	3,058	6	0,997	1,000	0,883	0,998	1,000		-0,646	1,132
7	0,961	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998		2,524	7	0,989	0,974	1,000	0,978	0,932	0,954		1,778
8	0,012	0,000	0,004	0,000	0,000	0,978	1,000		8	0,002	0,020	0,000	0,000	0,018	0,514	0,001	

SM									YSM								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,143	-0,144	-0,169	-0,126	-0,051	0,100	0,666	1		0,117	-0,124	0,001	0,116	0,343	0,180	0,554
2	0,999		-0,001	-0,025	0,018	0,092	0,244	0,810	2	0,999		-0,240	-0,116	-0,001	0,226	0,063	0,437
3	0,998	1,000		-0,024	0,018	0,093	0,244	0,810	3	0,999	0,978		0,124	0,239	0,466	0,304	0,677
4	0,978	1,000	1,000		0,043	0,118	0,269	0,835	4	1,000	0,999	0,998		0,115	0,342	0,179	0,553
5	0,999	1,000	1,000	1,000		0,075	0,226	0,792	5	0,999	1,000	0,970	0,998		0,227	0,064	0,438
6	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,151	0,717	6	0,938	0,998	0,840	0,957	0,998		-0,163	0,211
7	1,000	0,989	0,989	0,937	0,990	1,000		0,566	7	0,993	1,000	0,931	0,988	1,000	1,000		0,374
8	0,138	0,076	0,077	0,006	0,058	0,611	0,503		8	0,211	0,661	0,126	0,118	0,592	0,999	0,832	

CAN									YCAN								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-1,028	0,413	-0,428	-0,678	-1,136	0,310	0,895	1		-0,196	0,429	0,107	0,107	0,170	0,543	0,457
2	0,318		1,441	0,600	0,350	-0,108	1,338	1,923	2	0,995		0,625	0,303	0,302	0,366	0,739	0,652
3	0,975	0,094		-0,841	-1,092	-1,550	-0,104	0,481	3	0,585	0,365		-0,322	-0,323	-0,259	0,114	0,028
4	0,891	0,827	0,430		-0,250	-0,708	0,738	1,323	4	0,999	0,891	0,845		0,000	0,064	0,436	0,350
5	0,750	0,996	0,324	0,998		-0,458	0,988	1,573	5	1,000	0,953	0,935	1,000		0,064	0,437	0,350
6	0,571	1,000	0,302	0,959	0,998		1,446	2,031	6	1,000	0,986	0,997	1,000	1,000		0,373	0,286
7	0,998	0,176	1,000	0,665	0,492	0,513		0,585	7	0,433	0,186	1,000	0,594	0,767	0,986		-0,087
8	0,548	0,006	0,985	0,040	0,034	0,109	0,959		8	0,660	0,336	1,000	0,822	0,913	0,997	1,000	

	BAM									YBAM							
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,256	0,159	-0,119	-0,407	-1,096	0,166	1,217	1		0,514	0,231	0,376	0,298	-0,008	0,395	0,895
2	0,999		0,415	0,137	-0,151	-0,840	0,422	1,473	2	0,681		-0,283	-0,138	-0,217	-0,523	-0,120	0,381
3	1,000	0,991		-0,278	-0,566	-1,255	0,007	1,058	3	0,991	0,991		0,145	0,066	-0,240	0,163	0,664
4	1,000	1,000	0,997		-0,287	-0,977	0,285	1,336	4	0,647	1,000	0,999		-0,079	-0,385	0,018	0,519
5	0,976	1,000	0,932	0,994		-0,689	0,572	1,623	5	0,964	0,998	1,000	1,000		-0,306	0,097	0,597
6	0,577	0,936	0,543	0,779	0,974		1,262	2,313	6	1,000	0,960	0,999	0,986	0,998		0,403	0,903
7	1,000	0,992	1,000	0,997	0,936	0,647		1,051	7	0,910	1,000	1,000	1,000	1,000	0,992		0,500
8	0,131	0,073	0,432	0,026	0,017	0,027	0,469		8	0,076	0,957	0,545	0,589	0,608	0,586	0,853	

BPS									YBPS								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,144	-0,707	-0,722	-1,311	-1,422	-0,347	0,070	1		0,695	-0,668	-0,214	-0,620	-0,170	-0,149	-0,340
2	1,000		-0,563	-0,578	-1,167	-1,278	-0,203	0,214	2	0,610		-1,363	-0,909	-1,315	-0,864	-0,843	-1,035
3	0,806	0,979		-0,015	-0,604	-0,715	0,360	0,777	3	0,541	0,034		0,454	0,048	0,499	0,520	0,328
4	0,502	0,918	1,000		-0,589	-0,700	0,375	0,792	4	0,994	0,142	0,886		-0,406	0,045	0,066	-0,125
5	0,112	0,395	0,957	0,861		-0,111	0,964	1,381	5	0,659	0,027	1,000	0,902		0,451	0,472	0,280
6	0,435	0,782	0,983	0,981	1,000		1,075	1,492	6	1,000	0,854	0,988	1,000	0,995		0,021	-0,170
7	0,998	1,000	0,999	0,994	0,679	0,905		0,417	7	1,000	0,543	0,939	1,000	0,951	1,000		-0,191
8	1,000	1,000	0,898	0,723	0,216	0,632	0,997		8	0,989	0,269	0,996	1,000	0,998	1,000	1,000	

POC								YPOC									
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8		
1		0,027	0,015	-0,354	-0,113	-0,315	-0,285	-0,349	1		0,149	0,025	-0,276	-0,002	-0,136	-0,250	-0,401
2	1,000		-0,011	-0,380	-0,140	-0,342	-0,312	-0,376	2	0,987		-0,124	-0,425	-0,151	-0,285	-0,400	-0,551
3	1,000	1,000		-0,369	-0,128	-0,331	-0,301	-0,365	3	1,000	0,998		-0,301	-0,027	-0,161	-0,275	-0,426
4	0,090	0,242	0,265		0,241	0,038	0,068	0,004	4	0,278	0,087	0,462		0,274	0,140	0,026	-0,126
5	0,997	0,996	0,997	0,711		-0,203	-0,173	-0,237	5	1,000	0,990	1,000	0,481		-0,134	-0,249	-0,400
6	0,883	0,929	0,913	1,000	0,996		0,030	-0,034	6	0,999	0,964	0,998	0,999	1,000		-0,115	-0,266
7	0,769	0,788	0,821	1,000	0,986	1,000		-0,064	7	0,831	0,429	0,845	1,000	0,873	1,000		-0,151
8	0,536	0,585	0,627	1,000	0,924	1,000	1,000		8	0,275	0,080	0,345	0,993	0,355	0,977	0,995	

ROS								YROS									
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8		
1		-1,257	0,047	-0,506	-0,977	-1,808	0,252	0,117	1		-0,102	0,130	0,227	0,078	-0,122	0,596	-0,416
2	0,581		1,304	0,751	0,280	-0,551	1,509	1,374	2	1,000		0,232	0,329	0,179	-0,020	0,698	-0,314
3	1,000	0,683		-0,553	-1,024	-1,855	0,205	0,070	3	1,000	1,000		0,097	-0,052	-0,252	0,467	-0,546
4	0,967	0,922	0,984		-0,471	-1,302	0,758	0,623	4	0,996	0,991	1,000		-0,149	-0,349	0,369	-0,643
5	0,779	1,000	0,849	0,990		-0,831	1,229	1,094	5	1,000	1,000	1,000	1,000		-0,200	0,519	-0,494
6	0,480	1,000	0,592	0,880	0,994		2,060	1,925	6	1,000	1,000	1,000	0,999	1,000		0,718	-0,294
7	1,000	0,527	1,000	0,933	0,712	0,569		-0,135	7	0,893	0,867	0,984	0,986	0,961	0,973		-1,012
8	1,000	0,647	1,000	0,977	0,819	0,653	1,000		8	0,984	0,999	0,962	0,770	0,970	1,000	0,513	

GBN									YGBN								
1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
1		-0,974	-0,099	-0,594	-0,654	-1,468	-0,927	-0,529	1		-0,116	-0,031	-0,072	0,122	-0,205	-0,702	-0,928
2	0,528		0,874	0,379	0,320	-0,494	0,047	0,445	2	1,000		0,085	0,044	0,238	-0,090	-0,586	-0,812
3	1,000	0,787		-0,495	-0,554	-1,368	-0,828	-0,430	3	1,000	1,000		-0,041	0,153	-0,174	-0,671	-0,897
4	0,713	0,991	0,956		-0,059	-0,873	-0,333	0,065	4	1,000	1,000	1,000		0,194	-0,134	-0,630	-0,856
5	0,860	0,999	0,970	1,000		-0,814	-0,274	0,124	5	1,000	0,996	1,000	0,995		-0,328	-0,824	-1,050
6	0,361	0,999	0,603	0,928	0,969		0,540	0,938	6	1,000	1,000	1,000	1,000	0,997		-0,497	-0,722
7	0,630	1,000	0,847	0,997	1,000	0,998		0,398	7	0,338	0,712	0,554	0,350	0,211	0,975		-0,226
8	0,972	0,995	0,996	1,000	1,000	0,946	0,998		8	0,065	0,293	0,182	0,056	0,036	0,832	0,999	

NAS								YNAS									
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-3,106	0,662	-1,469	-1,364	-2,798	-0,241	1,752	1		-1,098	0,695	-0,118	0,586	0,435	0,333	0,654
2	0,096		3,768	1,637	1,742	0,309	2,865	4,858	2	0,651		1,793	0,980	1,684	1,533	1,431	1,752
3	0,998	0,054		-2,131	-2,026	-3,460	-0,903	1,090	3	0,927	0,179		-0,813	-0,109	-0,260	-0,362	-0,041
4	0,579	0,728	0,378		0,106	-1,328	1,228	3,221	4	1,000	0,661	0,828		0,705	0,553	0,451	0,772
5	0,892	0,821	0,682	1,000		-1,434	1,123	3,116	5	0,974	0,182	1,000	0,870		-0,151	-0,253	0,068
6	0,560	1,000	0,421	0,991	0,992		2,557	4,550	6	1,000	0,793	1,000	0,999	1,000		-0,102	0,219
7	1,000	0,330	0,997	0,937	0,984	0,850		1,993	7	1,000	0,492	1,000	0,995	1,000	1,000		0,321
8	0,792	0,004	0,990	0,040	0,168	0,186	0,797		8	0,973	0,227	1,000	0,891	1,000	1,000	1,000	

SMI									YSMI								
1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
1		0,026	-0,330	-0,048	-0,144	-0,946	-0,310	0,414	1		0,233	-0,317	0,087	0,046	-0,643	-0,252	0,322
2	1,000		-0,356	-0,074	-0,170	-0,972	-0,336	0,388	2	0,996		-0,549	-0,146	-0,187	-0,876	-0,485	0,089
3	0,954	0,978		0,282	0,186	-0,616	0,020	0,744	3	0,955	0,777		0,403	0,363	-0,326	0,065	0,639
4	1,000	1,000	0,978		-0,096	-0,898	-0,262	0,462	4	1,000	1,000	0,834		-0,041	-0,730	-0,338	0,236
5	1,000	1,000	0,999	1,000		-0,802	-0,166	0,558	5	1,000	0,999	0,960	1,000		-0,689	-0,298	0,276
6	0,358	0,571	0,907	0,521	0,759		0,636	1,360	6	0,786	0,658	0,997	0,730	0,853		0,391	0,965
7	0,983	0,986	1,000	0,989	1,000	0,930		0,724	7	0,994	0,882	1,000	0,944	0,989	0,995		0,574
8	0,920	0,968	0,491	0,793	0,764	0,161	0,554		8	0,975	1,000	0,644	0,993	0,993	0,551	0,777	

A.4.2. Machos

PC1_LN								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0,394	-0,368	0,202	-0,429	0,072	-0,299	0,581
2	0,926		-0,762	-0,192	-0,823	-0,322	-0,693	0,187
3	0,919	0,073		0,570	-0,061	0,440	0,069	0,949
4	0,998	0,997	0,310		-0,631	-0,130	-0,501	0,379
5	0,855	0,085	1,000	0,325		0,501	0,129	1,010
6	1,000	0,937	0,601	1,000	0,493		-0,371	0,509
7	0,984	0,237	1,000	0,611	1,000	0,877		0,880
8	0,568	0,998	0,008	0,890	0,006	0,504	0,060	

GLS									YGLS								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		3,254	-2,049	3,724	-0,176	3,038	0,257	7,539	1		0,246	1,305	2,228	3,654	2,654	3,044	2,918
2	0,948		-5,303	0,471	-3,430	-0,215	-2,997	4,286	2	1,000		1,060	1,982	3,408	2,408	2,798	2,672
3	0,994	0,305		5,773	1,873	5,087	2,306	9,588	3	0,902	0,937		0,923	2,349	1,349	1,739	1,613
4	0,885	1,000	0,156		-3,900	-0,686	-3,467	3,815	4	0,431	0,370	0,961		1,426	0,426	0,816	0,690
5	1,000	0,884	0,992	0,769		3,214	0,433	7,715	5	0,010	0,013	0,136	0,813		-1,000	-0,610	-0,736
6	0,937	1,000	0,248	1,000	0,839		-2,781	4,501	6	0,127	0,157	0,724	1,000	0,942		0,390	0,264
7	1,000	0,939	0,978	0,849	1,000	0,946		7,282	7	0,106	0,082	0,548	0,989	0,999	1,000		-0,126
8	0,108	0,725	0,001	0,805	0,033	0,504	0,100		8	0,104	0,135	0,632	0,997	0,994	1,000	1,000	

MAX									YMAX								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		1,464	0,001	-0,153	-0,377	0,566	0,160	1,612	1		0,967	0,533	-0,391	0,211	0,472	0,603	0,840
2	0,218		-1,463	-1,617	-1,841	-0,899	-1,304	0,148	2	0,352		-0,434	-1,358	-0,756	-0,495	-0,364	-0,127
3	1,000	0,054		-0,154	-0,379	0,564	0,159	1,611	3	0,891	0,928		-0,924	-0,322	-0,061	0,070	0,307
4	1,000	0,025	1,000		-0,225	0,718	0,313	1,765	4	0,985	0,005	0,121		0,602	0,864	0,994	1,232
5	0,998	0,014	0,994	1,000		0,943	0,537	1,990	5	1,000	0,538	0,985	0,766		0,261	0,392	0,629
6	0,966	0,632	0,912	0,821	0,471		-0,405	1,047	6	0,933	0,886	1,000	0,234	0,995		0,131	0,368
7	1,000	0,219	1,000	0,999	0,975	0,993		1,452	7	0,872	0,983	1,000	0,140	0,976	1,000		0,237
8	0,093	1,000	0,024	0,020	0,002	0,361	0,140		8	0,487	1,000	0,990	0,034	0,699	0,967	0,999	

SM									YSM								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		0,335	-0,176	-0,044	-0,155	0,089	0,239	0,687	1		0,207	-0,041	-0,100	-0,008	0,067	0,356	0,487
2	0,959		-0,511	-0,379	-0,490	-0,246	-0,096	0,352	2	0,997		-0,248	-0,307	-0,215	-0,140	0,149	0,280
3	0,999	0,454		0,132	0,021	0,265	0,416	0,863	3	1,000	0,969		-0,060	0,033	0,108	0,397	0,528
4	1,000	0,817	0,999		-0,111	0,133	0,283	0,731	4	1,000	0,914	1,000		0,092	0,168	0,456	0,587
5	0,999	0,637	1,000	1,000		0,244	0,395	0,842	5	1,000	0,992	1,000	1,000		0,076	0,364	0,495
6	1,000	0,981	0,944	1,000	0,972		0,150	0,598	6	1,000	0,999	1,000	0,997	1,000		0,288	0,420
7	0,994	1,000	0,734	0,962	0,847	0,999		0,447	7	0,931	0,999	0,736	0,612	0,870	0,944		0,131
8	0,280	0,916	0,015	0,130	0,029	0,229	0,760		8	0,671	0,968	0,364	0,322	0,498	0,633	1,000	

CAN									YCAN								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		0,850	-0,695	0,493	-0,640	0,016	-0,404	1,395	1		0,162	0,001	0,102	0,122	-0,112	0,182	0,289
2	0,899		-1,545	-0,358	-1,490	-0,835	-1,254	0,544	2	0,999		-0,161	-0,060	-0,039	-0,273	0,020	0,128
3	0,943	0,072		1,187	0,055	0,710	0,290	2,089	3	1,000	0,998		0,101	0,122	-0,113	0,181	0,289
4	0,994	0,998	0,273		-1,133	-0,477	-0,897	0,902	4	1,000	1,000	1,000		0,021	-0,213	0,080	0,188
5	0,969	0,178	1,000	0,487		0,655	0,236	2,035	5	1,000	1,000	1,000	1,000		-0,234	0,059	0,167
6	1,000	0,799	0,830	0,986	0,905		-0,420	1,379	6	1,000	0,960	1,000	0,988	0,974		0,293	0,401
7	0,999	0,380	0,999	0,748	1,000	0,995		1,799	7	0,999	1,000	0,996	1,000	1,000	0,944		0,108
8	0,337	0,985	0,003	0,777	0,006	0,143	0,055		8	0,973	1,000	0,940	0,997	0,998	0,704	1,000	

BAM									YBAM								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		0,789	0,422	0,010	-0,964	-0,005	-0,067	1,336	1		0,445	0,767	-0,150	-0,616	-0,079	0,220	0,799
2	0,719		-0,368	-0,779	-1,754	-0,795	-0,856	0,546	2	0,955		0,322	-0,595	-1,061	-0,524	-0,225	0,354
3	0,980	0,982		-0,412	-1,386	-0,427	-0,488	0,914	3	0,422	0,976		-0,918	-1,383	-0,847	-0,548	0,032
4	1,000	0,507	0,955		-0,974	-0,015	-0,077	1,326	4	1,000	0,626	0,063		-0,466	0,071	0,370	0,950
5	0,391	0,001	0,008	0,271		0,959	0,897	2,300	5	0,732	0,062	0,000	0,885		0,537	0,836	1,415
6	1,000	0,501	0,933	1,000	0,169		-0,061	1,341	6	1,000	0,778	0,087	1,000	0,677		0,299	0,879
7	1,000	0,476	0,923	1,000	0,426	1,000		1,403	7	0,999	0,998	0,721	0,961	0,284	0,988		0,580
8	0,070	0,917	0,280	0,038	0,000	0,011	0,030		8	0,427	0,979	1,000	0,131	0,001	0,110	0,764	

BPS									YBPS								
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		-0,763	-0,392	-1,318	-1,260	-0,795	-0,821	-0,055	1		-1,001	-0,131	-1,439	-1,024	-0,839	-0,604	-0,444
2	0,606		0,371	-0,555	-0,497	-0,031	-0,058	0,709	2	0,088		0,870	-0,438	-0,023	0,161	0,397	0,556
3	0,972	0,960		-0,926	-0,868	-0,402	-0,429	0,338	3	1,000	0,052		-1,308	-0,892	-0,708	-0,473	-0,313
4	0,028	0,754	0,085		0,058	0,523	0,497	1,263	4	0,001	0,812	0,000		0,416	0,600	0,835	0,995
5	0,031	0,891	0,165	1,000		0,465	0,439	1,205	5	0,045	1,000	0,036	0,880		0,184	0,419	0,579
6	0,408	1,000	0,904	0,789	0,848		-0,026	0,740	6	0,142	0,999	0,128	0,426	0,998		0,235	0,395
7	0,515	1,000	0,922	0,864	0,942	1,000		0,766	7	0,687	0,915	0,744	0,106	0,893	0,994		0,160
8	1,000	0,585	0,977	0,016	0,017	0,349	0,487		8	0,896	0,674	0,962	0,033	0,536	0,861	1,000	

POC								YPOC									
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8		
1		0,192	0,035	-0,389	-0,249	-0,122	-0,022	-0,049	1		0,163	0,061	-0,404	-0,221	-0,128	0,000	-0,092
2	0,951		-0,157	-0,581	-0,441	-0,314	-0,213	-0,240	2	0,979		-0,102	-0,567	-0,384	-0,291	-0,164	-0,256
3	1,000	0,949		-0,424	-0,284	-0,157	-0,056	-0,083	3	1,000	0,996		-0,465	-0,282	-0,189	-0,062	-0,154
4	0,267	0,001	0,029		0,140	0,267	0,368	0,341	4	0,214	0,001	0,009		0,183	0,276	0,404	0,312
5	0,777	0,074	0,429	0,981		0,127	0,228	0,200	5	0,863	0,178	0,426	0,917		0,093	0,220	0,128
6	0,993	0,357	0,921	0,527	0,980		0,100	0,073	6	0,990	0,447	0,804	0,473	0,997		0,128	0,036
7	1,000	0,854	1,000	0,182	0,814	0,997		-0,027	7	1,000	0,959	1,000	0,095	0,833	0,987		-0,092
8	1,000	0,781	0,999	0,316	0,864	0,999	1,000		8	0,999	0,713	0,955	0,425	0,987	1,000	0,999	

ROS									YROS								
1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
1		-0,271	-1,776	-0,444	-1,803	-0,792	-1,770	0,592	1		-1,326	-0,933	-0,984	-0,855	-0,997	-1,114	-0,941
2	1,000		-1,505	-0,173	-1,532	-0,522	-1,499	0,863	2	0,017		0,392	0,342	0,471	0,328	0,212	0,385
3	0,351	0,414		1,332	-0,027	0,983	0,005	2,368	3	0,158	0,923		-0,050	0,079	-0,064	-0,181	-0,008
4	1,000	1,000	0,517		-1,359	-0,349	-1,326	1,036	4	0,167	0,967	1,000		0,129	-0,014	-0,130	0,043
5	0,369	0,522	1,000	0,637		1,010	0,033	2,395	5	0,289	0,884	1,000	1,000		-0,143	-0,259	-0,087
6	0,974	0,997	0,809	1,000	0,824		-0,978	1,384	6	0,087	0,976	1,000	1,000	1,000		-0,116	0,056
7	0,478	0,542	1,000	0,646	1,000	0,895		2,362	7	0,088	0,999	0,999	1,000	0,996	1,000		0,173
8	0,997	0,962	0,024	0,889	0,030	0,505	0,067		8	0,195	0,962	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

GBN									YGBN								
1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
1		1,283	-0,444	1,040	-0,811	0,442	-0,518	0,451	1		0,517	0,106	0,677	-0,210	0,317	-0,099	-0,569
2	0,459		-1,727	-0,243	-2,094	-0,841	-1,802	-0,832	2	0,809		-0,411	0,160	-0,727	-0,200	-0,615	-1,086
3	0,995	0,018		1,484	-0,367	0,886	-0,074	0,895	3	1,000	0,828		0,571	-0,316	0,211	-0,205	-0,675
4	0,695	1,000	0,051		-1,851	-0,598	-1,558	-0,589	4	0,475	0,999	0,396		-0,887	-0,360	-0,776	-1,246
5	0,874	0,005	0,996	0,017		1,253	0,293	1,262	5	0,998	0,268	0,949	0,063		0,526	0,111	-0,360
6	0,994	0,762	0,563	0,942	0,178		-0,961	0,009	6	0,971	0,997	0,992	0,905	0,515		-0,415	-0,886
7	0,992	0,030	1,000	0,075	1,000	0,623		0,969	7	1,000	0,481	0,997	0,146	1,000	0,849		-0,471
8	0,996	0,837	0,671	0,966	0,267	1,000	0,704		8	0,675	0,013	0,252	0,001	0,925	0,029	0,815	

	NAS									YNAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1		1,795	-1,577	1,344	0,320	1,064	-0,570	3,280	1		0,347	0,090	0,642	2,330	0,798	0,759	0,972
2	0,933		-3,372	-0,451	-1,475	-0,731	-2,365	1,485	2	1,000		-0,257	0,295	1,984	0,452	0,413	0,625
3	0,946	0,104		2,921	1,897	2,641	1,007	4,857	3	1,000	1,000		0,552	2,240	0,709	0,669	0,882
4	0,984	1,000	0,192		-1,024	-0,280	-1,914	1,936	4	0,988	1,000	0,982		1,688	0,156	0,117	0,330
5	1,000	0,958	0,765	0,994		0,744	-0,890	2,960	5	0,023	0,065	0,005	0,163		-1,532	-1,571	-1,359
6	0,994	0,999	0,260	1,000	0,998		-1,634	2,216	6	0,937	0,997	0,912	1,000	0,153		-0,039	0,173
7	1,000	0,640	0,993	0,812	0,998	0,904		3,850	7	0,974	0,999	0,962	1,000	0,283	1,000		0,212
8	0,304	0,960	0,002	0,831	0,283	0,588	0,095		8	0,881	0,985	0,845	1,000	0,401	1,000	1,000	

SMI								YSMI									
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8		
1		0,707	0,476	0,020	0,096	0,248	0,282	1,162	1		0,591	0,615	-0,035	0,241	0,227	0,396	0,970
2	0,359		-0,231	-0,687	-0,611	-0,459	-0,425	0,455	2	0,568		0,023	-0,626	-0,350	-0,364	-0,195	0,379
3	0,749	0,988		-0,455	-0,380	-0,227	-0,194	0,687	3	0,400	1,000		-0,649	-0,373	-0,388	-0,218	0,356
4	1,000	0,171	0,612		0,075	0,228	0,261	1,142	4	1,000	0,246	0,139		0,276	0,261	0,431	1,005
5	1,000	0,410	0,828	1,000		0,152	0,186	1,066	5	0,993	0,921	0,822	0,974		-0,014	0,155	0,729
6	0,990	0,698	0,982	0,989	0,999		0,034	0,914	6	0,993	0,871	0,721	0,972	1,000		0,169	0,744
7	0,989	0,821	0,996	0,982	0,998	1,000		0,880	7	0,916	0,997	0,991	0,753	0,999	0,998		0,574
8	0,004	0,785	0,162	0,002	0,003	0,010	0,060		8	0,029	0,893	0,870	0,008	0,118	0,064	0,492	

A.5. Estimativas de θ

Figura A.1.: Estimativas do parâmetro θ ($4Ne\mu$) calculados através do programa MDIV. Três réplicas por cada comparação entre os quadrantes de latlong do conjunto de dados de 600pb foram realizadas; quando apenas uma cor é vista, indica a sobreposição das curvas. Escala para o eixo Y em todos os casos corresponde a, no máximo, 0,025 de probabilidade posterior, e no eixo X, 20 para o valor de θ .

A.6. Shirai and Marroig

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 LRH: L.T. SHIRAI AND G. MARROIG
2 RRH: EVOLUTIONARY CONSTRAINT AND FREEDOM
3 TITLE: EVOLUTIONARY CONSTRAINT AND FREEDOM: A COMPARISON
4 BETWEEN NEOTROPICAL MARSUPIALS AND MONKEYS SKULL
5 MODULARITY
6 AUTHOR’S NAMES: LEILA T. SHIRAI AND GABRIEL MARROIG
7 AUTHOR’S AFFILIATIONS: *Laboratório de Evolução de Mamíferos,*
8 *Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências,*
9 *Universidade de São Paulo. CP 11.461 CEP 05422-970, São Paulo, SP, Brazil.*
10 *gmarroig@usp.br*
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Modularity is emerging as a central concept in evolutionary biology bridging on developmental, genetic, morphological, biochemical and physiological studies. While the morphological integration and modularity theories have explicit expectations about the relationship between evolutionary freedom and constraints, they have rarely been tested empirically. One possible approach is to use the multivariate response to selection equation to simulate the behavior of Eutheria and Metharia skulls in terms of their evolvability. We relate these results to classical approaches based on morphological integration indexes and modularity tests based on a priori functional/developmental hypotheses. The overall integration in eutherians is smaller in comparison to marsupials but primates present skull modules more clearly delimited. Yet, correlation patterns are similar among and within the two groups. Marsupials modularity is strongly influenced by within-groups size variation to a degree that evolutionary freedom is basically constrained to responses aligned with size variation. Conversely, while primates still have a good portion of the total variation based on size, their enhanced modularity allows a broader spectrum of responses, more similar to the selection gradients applied. After removing size variation, both groups become much more similar in terms of modularity patterns and consequently in their evolutionary responses to the selection vectors.

KEYWORDS: Development, morphological integration, mammals, selection, lines of least evolutionary resistance

“It seemed evident (...) that character changes occurring in evolution of species could not be considered to be independent of each other and that studies which did

51 *not consider their dependency ignored a significant aspect of change.”* (Olson and
52 Miller 1958, pp. 1)

53
54 The ensemble of morphological parts that relates through ontogeny and together
55 performs a function is called “complex morphological structure”. Numerous fields
56 of Biology, especially Developmental and Evolutionary Biology, have been showing
57 that complex morphological structures are built as modules which, along with other
58 interacting modules, result in the final form of the organism (Needham 1933; Berg
59 1960; Riedl 1977; Cheverud 1982, 1996; Wagner 1996; von Dassow and Munro
60 1999; Ancel and Fontana 2000; Marroig and Cheverud 2001; Klingenberg et al.,
61 2004; Schlosser and Wagner, 2004; Tanay et al., 2004). Thus, most (if not all)
62 multicellular organisms have complex morphological structures at several levels and
63 at distinct ontogenetic stages. They are organized as interacting modules and are
64 expressed as functional units in the phenotype. Moreover, at the genetic level, they
65 result from epistasis, pleiotropy and linkage disequilibrium among genes (Cheverud
66 1982; Wagner and Altenberg 1996). Hence, the degree of association (or
67 correlation) between phenotypic parts must reflect the degree of association of these
68 developmental or functional units. Following this logic, Olson and Miller (1958)
69 introduced the concept of morphological integration.

70 The morphological integration concept implies that structures are connected
71 in the phenotype and that they evolve at least to some degree as a unit. As Berg
72 (1960) noticed, the presence of correlations between the dimensions of some part of
73 the organism and the absence of correlations of these dimensions with others parts
74 indicate the independence of certain developmental processes with respect to other
75 processes within the organism. One important contribution of Olson and Miller’s

work (1958) was then to propose from the morphological integration concept a new approach to assess units (in modern terms, modules) by analysis of correlation among phenotypic parts. Correlations are, nevertheless, a mathematical measure of association between variables that does not address their cause. Olson and Miller (1958) thus further expand the method as to formally test for potential biological sources of association like shared developmental path or common function.

The concept of morphological integration, though with extensive support, did not have a profound impact in evolutionary literature. It was only in Quantitative Genetics that morphological integration was further explored (see reviews in Cheverud 1995; Chernoff and Magwene 1999), and only recently attempts have been made to address the role of morphologically integrated units in a phylogenetic context (e.g, Smith 1996; Marroig and Cheverud 2001). While these studies describe integration patterns and compare them among groups they still do not address the consequences of a modular architecture in an evolutionary context. Does the pattern and magnitude of integration affect the direction, magnitude and pace of evolution? Does it act as a constraint to evolvability?

Morphological integration studies are usually performed on correlation matrices, with several well established analytical tools to compare patterns and magnitude of integration and modularity among populations (Cheverud et al. 1989). While obvious challenges still remain, such as methods that would allow us to detect the number of modules and their hierarchical nature without a priori hypotheses about the system, there is a good collection of methods to test modularity hypotheses and to compare patterns and magnitude of integration between groups. However, while the morphological integration theory has explicit expectations about the relationships between modularity and the potential evolvability and constraints for

1
2
3 101 evolutionary change in any population (Wagner and Altenberg 1996), those
4
5 102 expectations have rarely been tested empirically. We think one possible reason for
6
7
8 103 this is the lack of analytical tools to compare patterns and magnitude of integration
9
10 104 between groups that explicitly relate those to the Quantitative Genetics toolbox of
11
12 105 evolutionary equations and framework. One necessary step to bridge this gap is to
13
14 106 use analytical tools suited for variance/covariance (or V/CV) matrices. Here we
15
16 107 adapted the Random Skewers method (RS), used to compare V/CV matrices patterns
17
18 108 (Cheverud and Marroig 2007), to study the relationship between morphological
19
20 109 integration patterns and magnitude with evolvability and constraints in two
21
22 110 phylogenetically distant mammalian groups, marsupials and primates.
23
24
25
26

27 111 The RS approach is based on the multivariate response to selection equation
28
29 112 (Lande 1979; Cheverud and Marroig 2007). Random selection gradients are
30
31 113 simulated and multiplied by the V/CV matrices in order to obtain simulated
32
33 114 evolutionary responses that can then be compared between populations. The
34
35 115 orientation of these responses, the magnitude and similarity with the selection
36
37 116 gradient applied or with the lines of least evolutionary resistance (sensu Schluter
38
39 117 1996, to be called LLER for simplicity) can be very informative about the
40
41 118 evolutionary properties of the matrices compared.
42
43
44

45 119 Therefore, the aim of this study is to compare the pattern and the magnitude
46
47 120 of phenotypic morphological integration and to explore how they affect evolutionary
48
49 121 freedom in two mammalian groups: Metatheria, represented by one of the five
50
51 122 marsupial orders (Didelphimorphia); and Eutheria, represented by New World
52
53 123 Monkeys (NWM). Because the predominance of allometric relationships upon
54
55 124 cranial integration may hide weaker integrated units (Riska 1986; Zelditch 1988;
56
57 125 Magwene 2001), the impact of changes in size in the two groups is compared. Size,
58
59
60

126 in fact, is usually captured in a Principal Component Analysis as the first
127 eigenvectors. This also implies that most variations in the cranium are due to
128 changes in these allometric relationships, defining them as the LLER (see for
129 example Marroig and Cheverud 2005). Therefore, the potential of evolutionary
130 change through this line, as opposed to the selection gradient, is explored.

131 Furthermore, we reanalyze how correlation and V/CV matrices of each group
132 behave without the variation due to size in order to assess how the integration
133 patterns and magnitudes change, and also which is the potential of evolutionary
134 change of this residual variation.

135 The most significant difference between Metatheria (marsupials) and
136 Eutheria (placentals) relates to their reproduction. While marsupials are born after a
137 short gestation, the morphogenesis of placentals occurs mostly inside the uterus. The
138 consequence is that the newborn marsupial is at an embryonic stage of development
139 when compared to a placental neonate (altricial state), presenting the structures
140 which enable it to reach the teat, attach to it and suck the milk (Smith 1996, 1997).

141 The relevance of this reproductive distinction for the present study is that the
142 differentiation of head organs occurs at different times and rates. Our hypothesis is
143 that this developmental contrast will be reflected in the integration patterns and
144 magnitude of the two groups.

145 Several morphological integration studies used the cranium as a complex
146 morphological structure. This is a common structure used in mammalian studies
147 because it offers unique advantages. Besides having high developmental complexity,
148 including 22 bones and their interactions, the cranium covers the head organs and
149 participates in various vital functions, consequently reflecting relevant biological
150 processes (Cheverud 1982, 1995). Furthermore, it presents common developmental

151 patterns among all mammals, enabling comparative studies among them (Moore
152 1981; Smith 1997).

153 In order to compare the two groups, the integration patterns of Didelphidae
154 must be described. Didelphidae is the richest family in the order Didelphimorphia,
155 and the order is the third richest among Neotropical mammals, containing 87 species
156 in 17 genera (Gardner 2005). They are distributed through all Neotropics, with only
157 one species in North America (*Didelphis virginiana* Kerr 1792). They are found in
158 diverse habitats (except at high altitudes), exhibit a wide range of body size (14g to
159 3,201g), and feed on small invertebrates and vertebrates, leaves, fruits and gums
160 (Eisenberg 1989; Julien-Laferrière and Atramentowics 1990; Santori et al. 1995;
161 Emmons and Feer 1997).

163 MATERIALS AND METHODS

165 *Samples*

166 Eleven species of six genera in the family Didelphidae were included in this study
167 and a total of 750 skulls were measured as follows: *Caluromys derbianus* (5), *C.*
168 *lanatus* (17), *C. philander* (100), *Chironectes minimus* (51), *Didelphis albiventris*
169 (68), *D. aurita* (114), *D. marsupialis* (71), *Lutreolina crassicaudata* (45),
170 *Metachirus nudicaudatus* (104), *Philander frenatus* (101) e *P. opossum* (74); from
171 the collections of the American Museum of Natural History (AMNH), Field
172 Museum of Natural History (FMNH), Museu Nacional da Universidade Federal do
173 Rio de Janeiro (MNRJ), Museum of Vertebrate Zoology (MVZ), Museu de Zoologia
174 da Universidade de São Paulo (MZUSP) and Museu da Universidade Federal de

175 Santa Catarina (MUFSC). A complete list of measured specimens may be obtained
176 from the authors upon request.

177 Taxonomic limits for the species were obtained from the following studies:

178 Gardner (2005) for *C. derbianus*, *C. lanatus*, *C. philander*, *C. minimus*, *L.*
179 *crassicaudata* and *M. nudicaudatus*; Lemos and Cerqueira (2002) for *D. albiventris*;
180 Cerqueira (1985) for *D. aurita* and *D. marsupialis*; and Patton and da Silva (1997)
181 for *P. frenatus* and *P. opossum*. The phylogenetic relationship (*Metachirus*
182 (*Chironectes* (*Lutreolina* (*Didelphis*, *Philander*))))), with *Caluromys* as an outer,
183 more basal group to this monophyletic group, is robust and found in many studies
184 (e.g Kirsh and Palma 1995, DNA hybridization data; Voss and Jansa 2003,
185 combined matrix of nuclear marker Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein –
186 IRBP and morphological data; Cardillo et al. 2004, supertree of 107 other studies;
187 Steiner et al. 2005, mitochondrial markers cytochrome B and 12s rDNA, and nuclear
188 markers IRBP and Trans-ThyRetin – TTR). The hypothesis adopted in this study
189 (Palma and Spotorno 1999, mitochondrial 12s rRNA) agrees to the relationship
190 above, except that *Metachirus* forms a monophyletic group with genus *Marmosops*.

191 As for the NWM, with all the analysis for the 16 genera (*Alouatta*, *Aotus*,
192 *Ateles*, *Brachyteles*, *Cacajao*, *Callicebus*, *Callimico*, *Callithrix*, *Cebuella*, *Cebus*,
193 *Chiropotes*, *Lagothrix*, *Leontopithecus*, *Pithecia*, *Saimiri* and *Saguinus*) already
194 detailed elsewhere (Marroig and Cheverud 2001, 2005), we will use only three
195 genera, representing the three distinct general patterns found in NWM (*Alouatta*,
196 *Pithecia* and *Saguinus*). For the calculation of the morphological integration index
197 and simulations, on the other hand, all genera are presented.

198

199 *Landmarks, Measurements, and Homology*

200 The first step of any comparative study is to build a homology hypothesis over the
201 characters in question. The comparison between NWM and marsupials is no
202 exception. However, due to the shared developmental paths and highly conserved
203 head bones (Moore 1981), the landmarks used were mainly the same as in Marroig
204 and Cheverud (2001). The only difference relates to the orbits; marsupials do not
205 have closed orbits, resulting in the exclusion of the landmark FM (fronto-malare)
206 and the correspondent distances associated with it. The final set of 35 measurements
207 is presented in Table 1.

208

209 [TABLE 1]

210

211 The genus *Metachirus* presents the temporal region of the squamosal
212 expanded rostrally, covering the sphenoidal area. Thus, the sutures among parietal,
213 frontal and alisphenoid (PT) and among temporal, alisphenoid and parietal (TSP)
214 does not exist. Considering as the homology criterion the presence of two of the
215 three bones, given that they share the same developmental origin (cells of paraxial
216 mesoderm, Moore 1981) then, PT landmark was defined as the suture among
217 parietal, frontal and temporal, whereas TSP as the suture among temporal,
218 alisphenoid and frontal. PT is, then, placed distally in relation to TSP, the inverse
219 position relative to other genera (see Fig. 1b).

220 Measurements were taken as the Euclidean distances among the 33
221 landmarks defined in the intersection among sutures considered to reflect important
222 functional and developmental processes of the group in question (Fig. 1, Table A1).
223 They were recorded as three-dimensional coordinates using a Microscribe 3DX
224 digitizer (Microscribe, IL.) and some specimens with a Polhemus 3Draw digitizer

(Colchester, VT). Because variation within a specimen, i.e. asymmetry between the right and left sides of the skull, is not of interest in this study, measurements present in both sides were treated as their average. Whenever one side of the skull was damaged, the other was considered as the mean. All measures are in millimeters.

[FIGURE 1]

Exploratory Analysis of Data

All analyses were performed with SYSTAT 11 (SYSTAT Inc., Richmond, CA, 2004). Repeatability, normality, and outlier analysis were done to check the quality of the collected data. Repeatability is a measure of the proportion of variance related to individual differences rather than measurement error (Falconer and Mackay 1996). It requires the landmarks to be recorded twice so that the smaller the difference between two measurements of the same specimen, given the variance of all specimens, the greater the repeatability (which varies from 0 to 1). Normality relates to the distribution of values of each measurement, analyzed with Lilliefors test. Finally, outlier analysis indicates any discrepant values of individual specimens that can potentially contaminate all analysis.

Correlation Matrices and Morphological Integration Tests

Variation within each genus (species, sex, geography, and their possible interaction) was explored by univariate (ANOVA) and multivariate (Wilks' Lambda, Pillai Trace and Hotelling-Lawley Trace) tests. Tests were considered significant at $P < 0.05$. Age was largely controlled by measuring only adult specimens; adulthood being defined as a cranium with totally erupted and functional dentition.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

250 Pooled within species correlation matrices were estimated for each genus
251 (hereof called raw matrices) using the General Linear Model, controlling sources of
252 variation for each genus as appropriate. These matrices were then compared to
253 theoretical matrices based on hypotheses of shared developmental and/or functional
254 units (Table 1) to test whether these hypothesized regions correspond to real
255 modules within the cranium. The construction of theoretical matrices follows a
256 simple idea: if two traits belong to the same hypothesized region, they receive the
257 number 1 (integrated group, avg +); otherwise, a 0 (non-integrated group, avg -) is
258 given. By correlating it to the observed matrix, the region's relevance to the
259 modularity of the skull is accessed. Statistical significance for matrices comparisons
260 was given by Mantel test (9999 permutations). Notice that this approach is
261 equivalent to a t-test where the averages of integrated (avg +) and non-integrated
262 (avg -) traits are compared, but using Mantel test a proper significance can be
263 calculate since the non-independence of traits is accounted for.

264 Nine hypotheses of morphological integration were constructed and are
265 based on previous studies of mammalian development and function (Lillegraven
266 1975; Moore 1981; Cheverud 1982; Clark and Smith 1993; Szalay 1994; Smith
267 1996, 1997, 2001). The face and neurocranium regions are distinct regions
268 (Cheverud 1982; Zelditch et al. 1990; Marroig and Cheverud 2001), differentiated
269 from cells of the neural crest and paraxial mesoderm respectively (Moore 1981).
270 Metatheria and Eutheria show distinct differentiation timing for these two regions.
271 Marsupials present later development of the neurocranium, allowing accelerated
272 growth of the face at earlier stages (Smith 1996, 1997). Conversely, as Smith (1996,
273 1997) additionally shows, placentals have a late facial development, and the
274 neurocranium is basically ready in the newborns. The neuroface hypothesis,

corresponding to the sum of neurocranium and face regions, tests for a general effect of this two growth patterns. Face and neurocranium were further divided in five sub-regions: cranial vault (neurocranium), cranial base (neurocranium), oral (face), nasal (face), and zygomatic (face). Table 1 details the correspondent function and developmental origin for each measurement. An overall matrix was also constructed (total hypothesis) summing all five sub-regions to test for integration in the cranium as a whole. Whenever a cell entry in the hypothetical matrix presents a value greater than one, it is reduced to one.

283

284 *Size and Residual Matrices*

Size is a potentially important factor contributing to the pattern and level of correlation among traits (Zelditch 1988), usually influencing each trait to different extents (allometry). Therefore, size could be a confounding factor when testing morphological integration hypotheses given that some traits or even regions of the skull can be more strongly associated with overall size than others. The residual correlation matrices (hereof called residual matrices) were calculated by removing the effect of correlations with general size from the original correlations. General size here is used in the sense of Wright's (1968) path analyses (see Bookstein et al. 1985) and for each matrix a single-factor model is fitted. A size-related eigenvector (**V**) is obtained from each raw matrix using the Principal Component method. The residual matrix (**R**) is obtained from the following relationship:

$$296 \quad \mathbf{R} = \mathbf{P} - \mathbf{V}'\mathbf{V}$$

where **P** is the original phenotypic correlation (raw) matrix and **V'** denotes the transposed size-related vector (**V**). The residual matrices are then compared to the same nine theoretical matrices to test if there is any further, non-allometric

300 morphological integration in the cranium. It is expected that both the pattern and the
301 magnitude of integration change. The same procedure was applied upon the V/CV
302 matrices to obtain residual matrices for the simulation approach (see below).

303 Principal Component Analysis (PCA) was also done to obtain the first
304 eigenvectors of the raw matrices and the percentage of variation explained by the
305 PC1. Eigenvectors were considered as size if all are positive or if negative, only
306 slightly negative.

307 The role that size plays in each group, both within didelphids and between
308 Neotropical marsupials and monkeys, can be compared by the percentage of
309 variation explained by the PC1 and also by correlating the eigenvectors among
310 genera. It is important here to have an idea of how well the eigenvectors have been
311 estimated. We used an autocorrelation procedure to estimate repeatability as the
312 average correlation of 100 eigenvector re-samples compared to the observed one.
313 The samples were produced by bootstrapping the original data (measurements) to
314 obtain 100 matrices, controlling for sources of variation for each genus as
315 appropriate. Each of these 100 bootstrapped matrices was subjected to a PCA and
316 the first eigenvectors obtained were then correlated to the observed eigenvectors of
317 each genus.

318 The significance of a correlation among eigenvectors is obtained simply by
319 calculating the correlation of any fixed vector with 1000 random (drawn from a
320 uniform distribution) 35-element vectors, producing a distribution of correlation
321 values expected by chance only. This broken-stick model shows that any correlation
322 of 35-elements vectors above 0.35 is significant at 0.01 level, and above 0.45 at
323 0.001 level.

324 Zelditch et al. (2004), however, argue that comparisons of size eigenvectors
325 will present high correlations due to the fact that all elements of both vectors are
326 positive. We agree that the significance for the comparisons of any two size-related
327 vectors can have a different hypothesis testing. So, instead of asking whether or not
328 any two vectors are more similar than expected by chance alone, in the particular
329 case of any two size-related vectors, we can test instead if the observed correlation is
330 higher than the expectation under a broken-stick model of a 1,000 all size-based
331 vectors. Accordingly, 1,000 random size vectors were simulated by obtaining
332 random positive numbers from a uniform distribution and then each one of these
333 simulated vectors was correlated to a fixed size vector. The maximum expected
334 correlation (corr_{max}) was considered as the mean of this distribution plus two times
335 the standard deviation, comprising a 95% confidence interval. If our observed
336 correlation between any two genera size vectors were higher than this corr_{max} number
337 it was deemed significant.

339 *Correlation among Genera*

340 Matrix correlations for each pair of didelphid genera were calculated both for the
341 raw and the residual matrices. Correlation matrices were compared among taxa
342 using element-wise matrix correlation (Sneath and Sokal 1973) followed by Mantel
343 test for significance. It is important to note that matrix correlation values can be
344 considerably lower than the maximum population value of one due to sampling
345 error. Matrix repeatabilities were then calculated for raw and residual matrices. We
346 used different methods since residual matrices are more sensitive to smaller sample
347 sizes. The procedure for the raw matrices, based on least squares calculations, is
348 described in Cheverud (1996). For the residual matrices, 100 residual matrices were

349 produced with the same procedure used for repeatability calculation of eigenvectors.
350 We bootstrap the original data (with sources of variation controlled), producing 100
351 new raw matrices and then extracted from them the first eigenvector. The 100
352 bootstrapped residual matrices were then correlated to the observed residual matrix,
353 with Mantel test for significance (9999 permutations).

354 Historical constraints might also contribute to the patterns of integration of
355 each genus. To have an idea of this influence on the correlation similarity patterns, a
356 genetic distance matrix among didelphid marsupials (Palma and Spotorno 1999) was
357 correlated to the above similarity matrix among genera, using the adjusted values.

358

359 *Morphological Integration Index and Modularity Ratios*

360 The average coefficient of determination (r^2) was used to quantify the overall level
361 of integration on the raw matrices (Cheverud et al. 1989, to be called r^2 for
362 simplicity), that is, the magnitude of integration in each genus. A high r^2 means a
363 tightly integrated cranium as a whole. Yet, notice that it does not necessarily reflect
364 the integration of modules within the cranium, as reflected in the morphological
365 integration hypotheses test. To help evaluate the impact of the morphological
366 integration hypotheses, the magnitude of the correlation is calculated as the average
367 of correlation values of both related (one) and unrelated (zero) traits, i.e., integrated
368 and non-integrated measurements. They will be presented as the average magnitude,
369 avg (+) and avg (-), respectively, or as the ratio avg (+) / avg (-) and they give us an
370 idea of how much a given module is visible against the background variation in all
371 the rest of correlations. This same measure could not, however, be applied to
372 residual correlation matrices, since negative values are often found for the average
373 of the non-integrated traits. Since it is not possible to add a constant to both

categories because that would alter the ratio itself, we therefore transformed the absolute differences between avg (+) and avg (-) using the exponential transformation $y = e^x$, where y is the transformed average (either – or + category), x is the original observed average and e is the base of the natural logarithm. While this does not solve the problem of estimating in percentage how large the correlation within modules are in regard to those outside the modules, this gave us a ratio easily comparable among modules and between original and residual matrices.

The same is true for the calculation of the morphological integration index r^2 , also influenced by the negative and close to zero values of residual matrices. In this case, the coefficient of variation of the V/CV matrices eigenvalues, excluding the first eigenvector, were used as an integration index (to be called ICV, see Marroig et al, submitted for more details). In order to compare it to the r^2 value, the ICV index was calculated for the raw matrices of all genera and correlated to the r^2 index ($r = 0.975$, $P < 0.00001$), showing that ICV reflects the same pattern of overall integration.

Evolutionary Constraint and Freedom: Simulated Selection Vectors

So as to explore the impact of the overall level of integration in the cranium over the evolutionary properties of each taxon, the integration indexes were correlated with the results of a simulation of evolutionary responses to selection involving the respective V/CV matrices (Cheverud and Marroig 2007). This approach is based on the multivariate response to selection equation. The evolutionary response of a set of quantitative traits is described by the equation $\Delta \mathbf{z} = \mathbf{G}\boldsymbol{\beta}$, where $\Delta \mathbf{z}$ is the vector of differences in means between generations, $\boldsymbol{\beta}$ is the selection gradient vector, and $\mathbf{G}$ is the additive genetic V/CV matrix or G-matrix (Lande 1979). Here, the phenotypic

V/CV will be used as a surrogate for the G-matrix (see Arnold and Phillips 1999; Marroig and Cheverud 2001; Stepan et al. 2002 for details). Raw V/CV matrices for marsupials were estimated in the same way as the correlation matrices, controlling the same effects for each genus as appropriate, as well as the residual V/CV matrices, as already mentioned above.

We subjected each V/CV matrix to 1,000 random selection vectors and obtained the respective simulated evolutionary response vectors. The simulated sample of 1,000 selection vectors (β) was obtained from a uniform distribution random number generator. The numbers for each cell in the vector can vary from -1 to +1, which means that the selection vectors are combinations of positive and negative elements simulating positive selection upon some traits and negative selection upon others. Each vector is then normalized to have a length of one and multiplied by the V/CV matrices to obtain the response vectors Δz (see more details of the RS method in Cheverud and Marroig 2007).

The absolute number (from 0 to 1,000) of these response vectors aligned with the first, second and third principal components of each V/CV matrix (PC1 or p_{max} , PC2 and PC3, respectively) were counted. Only vectors correlation equal to or higher than 0.7 were considered as a count in the alignment of the simulated evolutionary responses with the PCs. The number of evolutionary responses aligned with the sum of all 3 PCs gave us an idea of how much the constraints embodied in the pattern and magnitude of the phenotypic matrices would bias the potential evolution of the mammalian lineages compared here. In fact, if we divide the absolute number of simulated responses aligned with the first 3 PCs by the total number of random selection vectors applied (1,000) we can think of this ratio as a measure of constraints.

Another important comparison is between the simulated selection vectors β itself and the observed simulated evolutionary responses (Δz). The number of responses to selection significantly aligned with β was counted. Here we used a more relaxed criteria of alignment (but still above the 99% confidence interval) counting those vector correlations above the expectation range of correlations occurring among 35-element vectors by chance alone ($-0.45 < r < 0.45$). This number can be thought as a measure of evolutionary freedom, here defined as the ability to respond in the direction that selection pushes the population in the multiple axes of the morphospace. This measure is not exactly the evolvability as precisely defined recently by Hansen and Houle (2008), but the ratio between evolvability and respondability (see Fig. 1 in Hansen and Houle 2008). Accordingly, if we divide this absolute number by the total number of responses (1,000) we can think of this index as a measure of morphological evolutionary freedom.

The residual V/CV matrices were also subjected to the random selection vectors with the purpose of analyzing how the constraint and freedom indexes change after extracting the variation due to size.

RESULTS

Data: Measurements and Matrices

All specimens with missing values were removed from the analysis. Thus, sample sizes were reduced to: *Caluromys* (110), *Chironectes* (30), *Didelphis* (215), *Lutreolina* (39), *Metachirus* (99), and *Philander* (139). All measurements were normally distributed and presented high repeatability, with a mean of 0.986 ± 0.064 . General linear models applied to control sources of variation within each genus were

as follows: *Caluromys*, species; *Didelphis*, species, sex and sex by species;
Metachirus, sex and geography (divided in Amazonian and Atlantic Forest biomes);
Philander, species and sex; and none for *Chironectes* and *Lutreolina*.

Morphological Integration, Correlation among Genera and Effect of Size

The correlation of the raw matrices of each genus with the nine hypotheses of
morphological integration, as well as the modularity ratio (avg + / avg -), are
presented in Table 2a. We also present the exponential transformation modularity
ratio for the raw matrices in the same table (2b), used to compare to the residual
matrices ratio. Table 3 presents the morphological integration tests results and the
modularity ratios for the residual matrices. Only positive and significant correlations
in the Mantel's tests should be considered since they indicate the positive
association between the hypotheses tested and the pattern of correlation within and
between modules. Negative values are not considered because they correspond to
the opposite of integration (disintegration). The magnitude of and differences
between integrated (avg +) and non-integrated (avg -) are presented in the additional
material (Table A2).

Note that in the raw correlations only the face and its sub-regions (oral and
nasal) present positive and significant values for the marsupials. The nasal region
presents the highest ratio (average = 1.60, while the average of all other didelphid
ratios, excluding the face, is 1.00). If size is removed (Table 3), total integration
appears, as well as in the neurocranium region (now with the same average ratio as
the face) and its sub-regions. The neuroface hypothesis shows integration in the raw
matrices only in *Caluromys*, *Chironectes* and *Didelphis*. After size is extracted from
the raw matrices, all genera show significant integration.

474

475 [TABLE 2 AND TABLE 3]

476

477 *Metachirus* is the only genus that did not change its integration pattern after
478 removing size (except for the change in the neuroface hypothesis, significant in
479 residual matrices). It also shows the lowest effect of size in the variation of the
480 cranium (35.9%, Table 4). Excluding *Metachirus*, the average per cent contribution
481 of the variation explained by the PC1 for remaining didelphids is 56%. Values for
482 each genus, as well as the eigenvectors are presented in Table 4.

483

484 [TABLE 4]

485

486 Table 5a reports Didelphidae similarity matrix for raw matrices (observed,
487 below the diagonal and adjusted, above), with matrix repeatabilities in the diagonal.
488 Table 5b shows the same for residual matrices. All matrix correlations reported in
489 Tables 5a and 5b are highly significant ($P < 0.001$). The calculation of residual
490 matrices repeatabilities, based on Mantel procedure, also were highly significant (P
491 < 0.001). As a general pattern, all genera are highly similar to each other in the raw
492 matrices. After extracting size, the correlations decrease, especially in those
493 comparisons including the genus *Metachirus*.

494 The influence of historical constraints (phylogeny), as measured by the
495 correlation between the genetic distance matrix (Palma and Spotorno 1999) and the
496 adjusted correlation similarity matrix (Table 5a), was -0.632, significant with $P =$
497 0.0076. The negative value is expected, since the genetic distance matrix is based on
498 values of divergence among groups, while the correlation is a similarity matrix.

1
2
3 499
4
5
6 500
7
8 501
9
10 502
11
12
13 503
14
15 504
16
17 505
18
19 506
20
21 507
22
23 508
24
25 509
26
27 510
28
29 511
30
31 512
32
33 513
34
35
36
37 514
38
39 515
40
41 516
42
43 517
44
45 518
46
47 519
48
49 520
50
51 521
52
53 522
54
55 523
56
57
58
59
60

[TABLE 5]

The eigenvectors present high similarity when compared among genera (Table 6). The average expectation for the correlation of two size vectors is 0.755 with a SD of 0.048. Therefore the 95% upper limit is 0.851 and the 99% upper limit is 0.899 and accordingly all observed correlations were considered significant at $P < 0.05$ (Table 6). The highest similarity is shared by *Didelphis*, *Lutreolina* and *Philander*. The genus that presents lowest similarities is *Chironectes*, even though the correlations are still very high. All eigenvectors present high repeatabilities (Table 6, diagonal).

[TABLE 6]

Comparison with Neotropical Monkeys

The comparison of morphological integration patterns between Neotropical marsupials and monkeys (Table 2) shows that both have positive and significant correlation in the face for all genera (except *Philander*). Modular distinction, as measured by the ratio of avg (+) and avg (-), show that the sub-region that has the highest value in marsupials is the nasal (1.60), whereas in monkeys is the oral (1.67). Monkeys also present integration in the neurocranium region only after extracting size (Table 3), basically due to the cranial vault sub-region, now with the highest ratio of all genera (1.10). A difference between the two groups is that total integration only appears in marsupials in the residual correlations, whereas monkeys exhibit it in both raw and residual correlations.

It should be noted that Table 2a uses the ratio $\text{avg} + / \text{avg} -$ to reveal the modular distinctiveness in the cranium. While this is useful to understand how, in terms of percentage, each region is distinguishable, it erases the information of the magnitude of this distinctiveness. Thus, the use of integrated and non-integrated differences (Table A2) to calculate the ratios in the natural base presented in Table 2b not only allows observing a ratio comparable with the residual matrices (Table 3), but also better reflects how larger the magnitudes between groups are. Looking then at the absolute differences (Table A2) of all regions of both groups, NWM shows 2.78 times larger differences (average = 0.017 and 0.048 for Neotropical marsupials and monkeys), which shows how higher modular distinctiveness is in the placental group. Additionally, primates also present many modules in the cranium while marsupials only show consistently the oral and nasal region integrated.

Most correlations of the eigenvectors of Neotropical marsupials and monkeys were quite high and significant at the 0.01 level; considering 0.05 level, only the comparison between *Caluromys* and *Saguinus* is not significant (Table 6). The percentage of variation explained by the PC1 was in general higher for marsupials 52.4% and 31.1% for Neotropical monkeys (Table 4).

Table 7 presents the values of integration indexes for both raw and residual matrices and the random selection simulation results. In particular, the relation between the absolute number of responses aligned with p_{max} with r^2 for all didelphid and NWM genera are shown (Figs. 2a). Also, the absolute number of response vectors significantly correlated with the simulated selection gradient are presented, and similarly the relation of r^2 with the selection vectors is illustrated in Figure 2b. NWM present a substantial number of responses aligned with p_{max} (average = 498), but didelphids shows an even higher amount of responses (average = 777). Among

1
2
3 549 didelphids, *Metachirus* is the genus with the lowest number of responses aligned
4
5 550 with $p_{\max}$, as well as with the lowest r^2 . Conversely, it is the genus with larger
6
7
8 551 number of responses aligned with selection gradients among didelphids,
9
10 552 approaching the pattern exhibited by NWM. However, when looking at the
11
12 553 responses aligned with the first three PCs (Fig. 3c), and particularly PC2 (Table 7),
13
14 554 there is a clear distinction between *Metachirus* and primates.

15
16
17 555 The correlation between morphological integration index r^2 (in ln to linearize
18
19 556 the relationship) and the number of responses aligned with $p_{\max}$ (Fig. 2a) shows a
20
21 557 strong positive correlation (0.96 for Didelphidae, 0.74 for NWM, and 0.917 for both
22
23 558 groups together, all significant at $P < 0.01$). This result clearly indicates that stronger
24
25 559 overall morphological integration is associated with a larger number of responses
26
27 560 following the LLER. This trend is maintained if we consider the first three LLERs
28
29 561 ($p_{\max}$, PC2 and PC3) and correlate the number of responses aligned with these three
30
31 562 against the morphological integration index (Fig. 2c). In fact, 89% to almost 95% of
32
33 563 all responses are aligned with the first 3 PCs while in NWM this is only about 47%
34
35 564 to almost 79%. The correlation of r^2 with the responses to the selection gradient
36
37 565 (Fig. 2b, $r = -0.941$, $P < 0.01$) basically shows the inverse pattern, with the number of
38
39 566 responses aligned ranging from 29 % to 52% in didelphids and from 30% to 96% in
40
41 567 NWM. Notice that these percentages are the constraint index (first three PCs) and
42
43 568 the evolutionary freedom index (selection vectors), and they show how a more
44
45 569 constrained cranium follows basically the lines of the first three LLERs, and how the
46
47 570 less constrained crania responds more to the selection gradient applied.

48
49 571 After extracting size, the residual integration index ICV becomes more
50
51 572 similar between Neotropical marsupials and monkeys (Table 7, while the ICV for
52
53 573 raw matrices were double in marsupials, result not shown). Notice that the number

of responses aligned with PC2 increases for both cases, but the responses aligned with the selection gradient increase even more, and especially for primates. The relationship between the integration index ICV and the responses aligned with PC2 are also strongly correlated (0.937 , $P < 0.01$; Fig. 3a), as well as ICV with the selection gradient ($r = -0.956$, $P < 0.01$; Fig. 3b). Notice that now, in both cases (Figs. 3a and 3b) didelphids and NWM are not separated in two distinct areas of the graph as they were in figures 2a, 2b, and 2c.

[TABLE 7 AND FIGURES 2 AND 3]

DISCUSSION

An organism is built through a series of contingent factors (e.g epigenesis) in an organized way. Yet, it is determined by historical, physical, genetics and developmental constraints (Hall 1992; Schneider and Kay 1995; Bak and Paczuski 1995). A constraint should not be understood as an absolute obstacle to evolvability, as it may also generate new possibilities for evolutionary changes and, therefore, new paths for biological diversification (adaptive flexibility). Modularity seems, in this context, an important way of organizing biological information, built upon constrained interactions that permit not only internal coherence of the module (ensuring adequate robustness for a given function) but may also allow the emergence of units that become new building blocks of other hierarchical levels (Simon 1962; Riedl 1977; Schlosser and Wagner 2004). Having appropriate tools for investigating modules thus helps our understanding of the evolutionary processes and illuminates the question of how complex morphological structures evolve.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

598 Traditionally, morphological integration studies are performed upon
599 correlation matrices (Olson and Miller 1958; Cheverud et al. 1989). This is a sound
600 strategy because correlation matrices are “scale free” and directly comparable
601 among any group as long as trait homology exists. However, evolutionary processes
602 are dependent upon genetic and phenotypic variation and covariation among traits.
603 While both correlation and V/CV matrices are obviously mathematically related,
604 such variational information is not directly available from correlation matrices. We
605 here presented a collection of methods that allows one to study morphological
606 integration and modularity making use of both correlation and V/CV matrices. In
607 particular, the simulations based on the multivariate response to directional selection
608 is an heuristic approach to explore the relationship between morphological
609 integration and modularity with the evolutionary theory.

610

611 *Morphological Integration Patterns and Magnitude*

612 Marsupials show a strong integration in the face (average = 1.39), most probably
613 due to constraints during early ontogeny when the newborn basically develops
614 structures related to its lactation, so it can continue its development in the pouch
615 (Smith 1996). The predominance in the development of facial traits leaves the
616 differentiation of further neurosomatic structures to happen mainly after the embryo
617 is born, as noticed by several authors (e.g Renfree et al. 1982; Nelson 1992;
618 Saunders et al. 1989; Krause and Sanders 1994). As a consequence, organogenesis
619 and growth of the already dominating face continues and hinders the development of
620 other cranial features resulting, in the adult morphology, in their characteristic
621 prominent rostrum and a relatively small neurocranium with no evident integration
622 in our data.

Smith (1997, pp. 1672) shows that “over 80% of the characters identified as differentiating marsupials and placentals involve the relative timing [of differentiation] of cranial musculo-skeletal elements relative to the timing of the central nervous system and associated sense organs. The somatic elements that are particularly advanced [even to the earliest events in central nervous system differentiation] in marsupials include the onset of ossification of the premaxilla, maxilla, and dentary; the onset of organization of craniofacial musculature; and the differentiation of basicranial cartilage” (see also Table 1). Thus, what happens in the case of placentals is that they develop earlier the neurocranium structures, in the uterus, leaving the facial traits to be developed later and, especially, outside the mother. In a way, placentals have a more balanced development with predominance of early neural development and late facial development. Marsupials, due to their extremely short development time inside the mother and greater necessity for development of facial traits, end up having two ontogenetic periods (intra-uterine and after birth), the latter conditional to the former, so that both are dominated by the face, at expense of the neural development. Notice here that this developmental strategy is, in Smith’s words (2006, pp. 1185), “absolutely critical to the survival of the newborn”, i.e., quite a deterministic constraint. In later works, Smith and collaborators (Smith 2001; Vaglia and Smith 2003) show that in fact the marsupial face-neurocranium heterochrony can be pushed even back to the earliest events in embryonic differentiation. The migration of neural crest cells (that originates facial traits) occurs before the closure of the neural tube and also before the differentiation of the somites (that originates the paraxial mesoderm), supporting the early development of crest derivatives in relation to placentals. Therefore, the main contrast between marsupials and placentals relates to the developmental flexibility

648 allowed (or not, in the case of the marsupials) from the very first moment of each
649 organism's life which in turn impact upon the evolutionary freedom, as will be seen
650 below.

651 Most of Didelphidae integration in the face is dominated by the nasal region,
652 as shown by the highest ratio of all hypotheses (Table 2a). What is interesting is that
653 it could be expected that the oral region the one that would dominates the face, since
654 the requirement of the neonate is for feeding. Lactation in the pouch, however, does
655 not involve the structures used for mastication in the adult (represented by the oral
656 region), as also shown by the lack of significance in the zygomatic region (related to
657 the masseter) for all didelphids. Moreover, olfaction is a key function for the
658 neonate to reach the teat, supported by the well developed sensorial organs found in
659 the altricial neonate (Vaglia and Smith 2003). Another clear needed function from
660 the nasal region is respiration since while the neonate is suckling it cannot breathe
661 with the mouth. This is also reflected in the precocious ossification of the palatal
662 region (Clark and Smith 1993).

663 The only exception to this general trend is *Chironectes*, which shows both
664 nasal and oral regions integrated, the latter with the higher ratio in the facial group.
665 Note also that no marsupial genus present significance in the neurocranium and its
666 sub-regions (vault and base); and only *Caluromys*, *Chironectes* and *Didelphis* show
667 significance in the neuroface hypothesis, unexpected given that the shared face and
668 neurocranium growth should be apparent in all genera. Similarly, the total
669 hypothesis is not significant, suggesting that their modules are poorly distinguished
670 in the cranium as a whole.

671 Neotropical monkeys also show facial integration in the raw matrices, but
672 mostly on the oral region, probably related to the feeding specializations presented

by this group (Marroig and Cheverud 2001). The only exception is *Pithecia*, which shows integration in the nasal group, with a high distinctiveness of this region (Table 2a). The neurocranium and its subregions also present lack of integration, except for tamarins (*Saguinus*) that show significance on the vault, but then not in the face (see Marroig and Cheverud 2001 for a discussion of neural and facial integration differences within NWM). Primates also show significant integration for the neural-somatic and total integration hypotheses.

The other side of the coin in morphological integration analysis is the study of the magnitude of integration. Neotropical marsupials present three times higher overall integration ($r^2 = 0.29$, while in NWM $r^2 = 0.10$, Table 7) in the cranium. One interesting conclusion emerging from these results is that while marsupials presents an overall tighter integration with larger magnitudes of correlation among all traits in comparison with primates, they also present a much lesser modularized skull both by having fewer hypotheses significant in the integration tests as well as by having a smaller difference between integrated and non-integrated correlations (Table A2). In other words, marsupials present larger correlations magnitudes (especially in the face) but at same time differences within and between modules correlation values are smaller in a relative comparison with primates. In fact, this trend is also found in a broader comparison study comprising almost all Eutheria and Metatheria orders skulls (Porto et al., in press) and indicate that the evolution of morphological integration in mammals proceeded in a disintegration path, or parcellation (Wagner and Altenberg 1996), by reducing the overall level of integration but increasing correlation in traits that belong to different modules.

This same work included four Australian marsupial orders, compared to ten placental orders. The integration patterns are basically the same, but the overall

698 integration increases to four times higher when comparing marsupials to placentals.
699 Therefore, this is the general trend for Metatheria and Eutheria and confirms our
700 initial hypothesis that the developmental contrast reflects in the pattern and
701 magnitude of integration. Nevertheless, there are exceptions to this general trend, as
702 seen by genus *Metachirus*. In this case, probably parcellation also occurred, as
703 shown by the lowest integration index (r^2) among didelphids, leading to the
704 unchanged modularity pattern (Tables 2 and 3) and the smaller impact of size
705 variation (Tables 4 and 7). *Metachirus* in a sense is in the lower spectrum of
706 variation for marsupials and at the upper limit for NWM considering the magnitude
707 of integration (r^2).

708

709 *Correlation Similarity among Genera*

710 The highest adjusted correlations for the raw matrices (Table 5a) appear in
711 *Chironectes* and *Lutreolina* because of their lower repeatabilities due to lower
712 sample sizes. Considering the other genera, with better estimated matrices and thus
713 lower corrected values, the highest correlation appears between *Didelphis* and
714 *Philander* (0.993). For the residual matrices (Table 5b), on the other hand, the genus
715 with higher repeatability (*Didelphis*) showed higher corrected values. *Didelphis*,
716 *Lutreolina* and *Philander* present highest magnitudes in basically all integrated
717 regions of raw matrices (Table 2), the highest percentages of variation explained by
718 the PC1 (Table 4), and also the highest eigenvector similarity (Table 6). Therefore,
719 they show a similar effect after extracting size, even though the regions that are
720 integrated are not the same (Table 2). They also show high adjusted correlations
721 among themselves in raw and residual matrices (Table 5), and in both cases the
722 highest values are for *Didelphis* and *Philander*. All these similarities are also

723 reflected in the effect of historical constraints over morphological integration.
724 *Didelphis* and *Philander* comprise one the most supported monophyletic clades in
725 Didelphidae. Genetic divergences among these three genera are the lowest
726 (*Didelphis-Lutreolina* = 0.167, *Lutreolina-Philander* = 0.133, *Didelphis-Philander* =
727 0.085, average difference = 0.332 ± 0.169 , Palma and Spotorno 1999), leading to the
728 relatively high correlation of the genetic distance matrix with the similarity
729 correlation matrix (-0.632).

730 Therefore, the evolution of modularity in mammals as showed in the present
731 study and detailed elsewhere (Porto et al., in press) was not a history of changes in
732 correlation patterns (which would reduce the similarity among genera) but instead a
733 history of changes in the magnitudes of the morphological integration. Those
734 changes were more acute in traits belonging to different modules which suggest that,
735 from the genetic point of view, pleiotropic effects of genes has been suppressed
736 more frequently between modules while keeping within modules pleiotropy. This
737 might be accomplished by selection acting on epistatic variation in pleiotropy (see
738 Wagner et al. 2007; Pavlicev et al. 2008). But what are the consequences of such
739 morphological integration and modularity evolution described here to the
740 evolutionary properties and potential of those mammalian lineages? Before properly
741 addressing this question, we first turn to the effect that size plays in Neotropical
742 marsupials and monkeys crania.

743

744 *Effect of Size*

745 After controlling size variation, primates and marsupials presents a striking
746 similarity in the modularity patterns (Table 3). Furthermore, in almost all hypotheses
747 (except for the base) the average of the integrated set of correlations (avg +) was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

748 higher than the average of the non-integrated set (avg -) as indicated by the ratios
749 above one (Table 3 and Table A2). Overall, integration in total, neuroface, face,
750 neurocranium, and vault hypotheses all present significant values for most of the
751 genera (marsupials and primates). Two primates (*Alouatta* and *Pithecia*) and two
752 marsupials (*Lutreolina* and *Didelphis*) present integration in the oral region. Also,
753 the same five marsupials and the only primate genus (*Alouatta*) showing nasal
754 integration still present significant integration in this functional/developmental
755 group in the residual matrices. Finally, some genera present in the residual matrices
756 significant integration in the zygomatic group. Therefore, there is a remarkable
757 contrast between marsupials and primates in the modularity patterns of the original
758 matrices, but this contrast disappears when size variation is removed. These results
759 show that size indeed unequally affects traits association in the skull and that this
760 effect differs among marsupials and primates. Also, marsupials are highly
761 influenced by size variations, but when this factor is controlled for in the residual
762 matrices they behave similarly to NWM.

763 The contrast between Neotropical marsupials and primates can be
764 understood by looking at the PC1 results and its association with the reproductive
765 biology of these two mammalian groups. Although both present highly similar
766 eigenvectors, showing that size variation is similar between the groups (Table 6), the
767 proportional impact that PC1 has over the raw matrices is different. Marsupials
768 show 52.2% of their variation explained by the PC1 while NWM show 27.4%,
769 which is an evidence of the stronger effect of size over marsupials' cranial variation.
770 Therefore, more variation is extracted from the raw matrices in the case of
771 didelphids and consequently inter-trait correlations become lower in their matrices
772 as a whole.

Neotropical marsupials present almost three times higher overall integration (r^2), and this is reflected in higher magnitudes (avg +) in modules within the skull (Table A2). After extracting size variation, morphological integration indexes are now similar between marsupials and primates, again showing that size variation tax a heavier toll on the former. This might indicate that marsupials are less flexible in their integration patterns both from being more overally integrated and from being more affected by size. And these are probably a result of the constraint imposed by their reproduction strategy which promotes facial development in such a way as to hinder neural development. This idea was tested in the simulation approach (see below) and we found good evidence of the more constrained architecture and also evolvability in marsupials.

784

785 *Modularity, Evolutionary Constraint and Freedom*

Evolutionary freedom is defined here as the ability of directional selection to produce an evolutionary response closely aligned (in the same direction) with the selection direction. Conversely, evolutionary constraints are defined here as any limitation on the course or outcome of evolution (Arnold 1992) which usually translate in restriction on the direction, ratio and magnitude of evolutionary change. On the following discussion it is important to keep in mind that the morphological integration index is a measure related directly to the matrix itself (see Cheverud et al. 1989; Marroig and Cheverud 2001) while the number of responses aligned with $p_{\max}$ is a measure related to the interaction between selection and constraints embodied in the P-matrix (or G-matrix). Another way to look at this two measures is that the integration indexes capture a more theoretical aspect of integration (the magnitude of the overall relationship among traits) while the number of responses

798 aligned with $p_{\max}$ (or the first 3 PCs) based on the simulation approach captures a
799 more “realized” or empirical aspect of integration.

800 The relationship between the degree of integration r^2 and the number of
801 responses aligned with $p_{\max}$ (Fig. 2a) shows a strong positive correlation, illustrating
802 that a more integrated cranium will respond to a greater extent along the line defined
803 by $p_{\max}$. In fact, the high number of responses aligned with $p_{\max}$ in marsupials
804 (around 80% to 90%) is an extreme example of such relationship between
805 morphological integration and constraints through the first LLER ($p_{\max}$). This result
806 reinforces that marsupials are indeed highly constrained and that regardless of the
807 different directions pushed by selection (other than $p_{\max}$), on average 80% to 90% of
808 the evolutionary responses would still be aligned with $p_{\max}$. Therefore, it is clear that
809 constraints embodied in the V/CV matrices exert a strong influence on the
810 evolutionary path under selection. In fact, if we consider the first three PCs in
811 marsupials ($p_{\max}$, PC2 and PC3) the number of responses raises to 85% to almost
812 95% (Table 7). But this interpretation is just one side of the coin, the one that deals
813 with the strength of the constraints. What about the strength of selection to
814 circumvent the constraints?

815 Figure 2b shows the relationship between the degree of integration (r^2) and
816 the number of responses aligned with the selection gradient applied. Notice that a
817 more integrated cranium has fewer responses aligned with the selection pattern,
818 indicating that constraints are stronger and deflecting evolutionary responses away
819 from the optimal response to selection. This again clearly shows that being tightly
820 integrated means a constrained evolution, and especially along the first LLER. Less
821 integrated crania, such as in NWM, leave more variation available to respond along
822 lines similar to the selection vectors. These results are even more striking if we

1
2
3 823 consider that size in only a small fraction of the total available universe of the
4
5 824 morphospace. Considering that a dimension in the hyperspace can be calculated as
6
7
8 825 $(1/2)^{n-1}$, where n correspond to the number of dimensions (traits - in our case 35),
9
10 826 marsupials have around 80% of evolutionary responses aligned with size even
11
12 827 thought selection is *not* on size. Therefore, the degree of integration, as a result of a
13
14 828 historical reproductive constraint in mammals, acts as a constraint to evolvability
15
16
17 829 and favors divergence through changes in allometry. Our results suggest that
18
19 830 marsupial's diversification should be essentially a history of size diversification. At
20
21 831 last, but far from being the least important, after extracting the variation due to size,
22
23 832 Neotropical marsupials become indistinguishable from NWM, both in the responses
24
25 833 aligned to the second LLER (Fig. 3a) and also in the alignment to the selection
26
27 834 gradient (Fig. 3b). These two last figures show that the developmental constraint
28
29 835 acts with such predominance that the history of didelphids is probably mainly due to
30
31 836 changes in size, but this is so *not* because of a lack of variability (sensu Wagner and
32
33 837 Altenberg 1996). This is a very important point while considering evolutionary
34
35 838 constraints and freedom: it is through the background variability (that might be
36
37 839 constrained itself for historical reasons) that certain developmental constraints work
38
39 840 on, widening or restricting the possible outcomes of the life of an organism,
40
41 841 determining in a further step the amplitude of variation presented by the population.
42
43
44
45
46
47

48 Therefore, larger magnitudes of integration correspond to a smaller
49
50 843 evolutionary freedom and consequently populations tend to follow the first LLERs.
51
52 844 All these results are not surprising and are in fact quite intuitive and expected under
53
54 845 the morphological integration and modularity theory. However, while these
55
56 846 relationships between morphological integration, evolutionary freedom and
57
58 847 constraints are straightforward, so far they had not been so clearly demonstrated due
59
60

848 to the lack of methods to deal with V/CV matrices. The simulation approach
849 described here is relatively simple and can be used to gain insight on the
850 evolutionary constraint and freedom of any group of organisms where multivariate
851 modular systems are being studied, helping to bridge the gap existing between
852 traditional morphological integration/modularity studies with the quantitative
853 evolutionary genetics framework.

854

855 ACKNOWLEDGEMENTS

856 We would like to thank the following curators for access to specimens or to the
857 collection (museums names abbreviated as in text): B. Patterson (FMNH), J. Patton
858 (MVZ), J. Oliveira (MNUFRJ), M. de Vivo (MZUSP), M. Graipel (MUFSC), R.
859 Voss (AMNH). LS would like to thank A. Porto, V. de Conto, H. Sebastião, R.
860 Rossi, D. Damineli for helpful discussions; S. McClelland and V. Coroama for
861 english support. This work has been supported by a fellowship to L. Shirai
862 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 03/08707-4) and a
863 research fellowship to G. Marroig (Conselho Nacional de Desenvolvimento
864 Científico e Tecnológico and FAPESP 04/10346-2).

865

866 LITERATURE CITED

867 Ancel, L.W., and W. Fontana. 2000. Plasticity, evolvability, and modularity
868 in RNA. *J. Exp. Zool* 288:242-283.

869 Arnold, S.J. 1992. Constraints on phenotypic evolution. *Am. Nat.* 140:S85-
870 S107.

- 1
2
3 871 Arnold, S.J., and P.C. Phillips. 1999. Hierarchical comparisons of genetic
4
5
6 872 variance-covariance matrices II: coastal-inland divergence in the garter snake,
7
8 873 *Thamnophis elegans*. *Evolution* 53(5):1516-1527.
9
10
11 874 Bak, P., and M. Paczuski. 1995. Complexity, contingency, and criticality.
12
13 875 *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92:6689-6696.
14
15 876 Berg, R.L. 1960. The ecological significance of correlation pleiades.
16
17 877 *Evolution* 14(2):171-180.
18
19
20 878 Bookstein, F.L., B. Chernoff, R.L. Elder, J.M. Humphries Jr., G.R. Smith,
21
22 879 and R.E. Strauss. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. *Acad. Nat. Sci.*
23
24 880 *Phila., Spec. Publ.* 15.
25
26
27 881 Cardillo, M., O.R.P. Bininda-Emonds, E. Boakes, and A. Purvis. 2004. A
28
29 882 species-level phylogenetic supertree of marsupials. *J. Zool. (London)* 264:11-31.
30
31
32 883 Cerqueira, R. 1985. The distribution of *Didelphis* in South America
33
34 884 (Polyprotodontia, Didelphidae). *J. Biogeog.* 12:135-145.
35
36 885 Chernoff, B., and P.M. Magwene. 1999. Morphological integration: 40 years
37
38 886 later. Pp. 316-360 in E.C. Olson and R.L. Miller. *Morphological integration*. Univ.
39
40 887 of Chicago Press, Chicago.
41
42
43 888 Cheverud, J.M. 1982. Phenotypic, genetic and environmental morphological
44
45 889 integration in the cranium. *Evolution* 36(3):499-516.
46
47
48 890 _____. 1995. Morphological integration in the saddle-back tamarin (*Saguinus*
49
50 891 *fuscicollis*) cranium. *Am. Nat.* 145:63-89.
51
52
53 892 _____. 1996. Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-
54
55 893 top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (*S. fuscicollis*) tamarins. *J. Evol. Biol.* 9:5-
56
57 894 42.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

895 Cheverud, J.M., and G. Marroig. 2007. Comparing covariance matrices:
896 random skewers method compared to the common principal components model.
897 Gen. Mol. Biol. 30(2):461-469.

898 Cheverud, J.M., G.P. Wagner, and M. Dow. 1989. Methods for the
899 comparative analysis of variation patterns. Syst. Zool. 38:201-213.

900 Clark, C.T., and K.K. Smith. 1993. Cranial osteogenesis in *Monodelphis*
901 *domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropodidae). J. Morph. 215:119-
902 149.

903 Eisenberg, J.F. 1989. Mammals of the Neotropics. The Northern Neotropics:
904 Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. Vol. 1. Univ. of
905 Chicago Press, Chicago.

906 Emmons, L.H., and F. Feer. 1997. Neotropical rainforest mammals: a field
907 guide. 2nd ed. Univ. of Chicago Press, Chicago.

908 Falconer, D.S., and T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to quantitative
909 genetics. 4th ed. Univ. of Chicago Press, Chicago.

910 Gardner, A.L. 2005. Order Didelphimorphia. Pp. 3-18 in D.E. Wilson and D.
911 M. Reeder, eds. Mammal Species of the World. Vol. 1. 3rd ed. Johns Hopkins Univ.
912 Press, Baltimore.

913 Hall, B.K. 1992. Evolutionary developmental biology. Chapman and Hall,
914 London.

915 Hansen, T.F., and D. Houle. 2008. Measuring and comparing evolvability
916 and constraint in multivariate characters. J. Evol. Biol. 21(5):1201-1219.

917 Julien-Laferrière, D., and M. Atramentowics. 1990. Feeding and
918 reproduction of three didelphid marsupials in two neotropical forests (French
919 Guiana). Biotropica 22(4): 404-415.

- 920 Kirsch, J.A.W., and R.E. Palma. 1995. DNA/DNA hybridization studies of
921 carnivorous marsupials. V: a further estimate of relationships among opossums
922 (Marsupialia: Didelphidae). *Mammalia* 59(3):403-425.
- 923 Klingenberg, C.P., L.J. Leamy, and J.M. Cheverud. 2004. Integration and
924 modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse
925 mandible. *Genetics* 166:1909–1921.
- 926 Krause, W.J., and Saunders, N.R. 1994. Brain growth and neocortical
927 development in the opossum. *Ann. Anat.* 176:395-406.
- 928 Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution
929 applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33(1):402-416.
- 930 Lemos, B., and R. Cerqueira. 2002. Morphological differentiation in the
931 white-eared opossum group (Didelphidae: *Didelphis*). *J. Mamm.* 83(2): 354-369.
- 932 Lillegraven, J.A. 1975. Biological considerations of marsupial-placental
933 dichotomy. *Evolution* 29(4):707-722.
- 934 Magwene, P.M. 2001. New tools for studying integration and modularity.
935 *Evolution* 55(9):1734-1745.
- 936 Marroig, G., and J.M. Cheverud. 2001. A comparison of phenotypic
937 variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny
938 during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55(12): 2576-2600.
- 939 _____. 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: diet and adaptive
940 morphological radiation in New World Monkeys. *Evolution* 59(5):1128-1142.
- 941 Moore, W.J. 1981. The mammalian skull. Cambridge Univ. Press,
942 Cambridge.
- 943 Needham, J. 1933. On the dissociability of the fundamental processes in
944 ontogenesis. *Biol. Rev.* 8(2):180-223.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

945 Nelson, J.E. 1992. Developmental staging in a marsupial *Dasyurus*
946 *halucatus*. Anat. Embry. 185: 335-354.

947 Olson, E.C., and R.L. Miller. 1958. Morphological integration. Univ. of
948 Chicago Press, Chicago.

949 Palma, R.E., and A.E. Spotorno 1999. Molecular systematics of marsupials
950 based on the rRNA 12s mitochondrial gene: the phylogeny of Didelphimorphia and
951 of the living fossil microbiotheriid *Dromiciops gliroides* Thomas. Mol. Phylogenet.
952 Evol. 13(3):525-535.

953 Patton, J.L., and M.N.F. da Silva. 1997. Definition of species of pouched
954 four-eyed opossums (Didelphidae, *Philander*). J. Mamm. 78(1):90-102.

955 Pavlicev, M., J.P. Kenney-Hunt, E.A. Norgard, C.C. Roseman, J.B. Wolf,
956 and J.M. Cheverud. 2007. Genetic variation in pleiotropy: differential epistasis as a
957 source of variation in the allometric relationship between long bone lengths and
958 body weight. Evolution 62(1):199-213.

959 Porto, A., F.B. Oliveira, L.T. Shirai, V. De Conto, and G. Marroig. 2008.
960 The evolution of modularity in the mammalian skull I: morphological integration
961 patterns and magnitudes. J. Evol. Biol. (in press).

962 Renfree, M.B., A.B. Holt, S.W. Green, J.P. Carr, and D.B. Cheek. 1982.
963 Ontogeny of the brain in a marsupial (*Macropus eugenii*) throughout pouch life.
964 Brain Behav. Evol. 2057-2071.

965 Riedl, R. 1977. A systems-analytical approach to macroevolutionary
966 phenomena. Q. Rev. Biol. 52(4):351-370.

967 Riska, B. 1986. Some models for development, growth, and morphometric
968 correlation. Evolution 40(6):1303-1311.

- 969 Santori, R.T., D. Astúa de Moraes, and R. Cerqueira. 1995. Diet composition
970 of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphoidea) in
971 southeastern Brazil. *Mammalia* 50(4):511-516.
- 972 Saunders, N.R., E. Adam, M. Reader, and K. Mollgard. 1989. *Monodelphis*
973 *domestica* (gray short-tailed opossum): an accessible model for studies of early
974 neocortical development. *Anat. Embry.* 180:227-236.
- 975 Schlosser, G., and G.P. Wagner. 2004. Modularity in development and
976 evolution. Univ. of Chicago Press, Chicago., Chicago.
- 977 Schluter, D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance.
978 *Evolution* 50(5):1766–1774.
- 979 Schneider, E.D, and J.J. Kay. 1995. Order from disorder: the
980 thermodynamics of complexity in biology. Pp. 161-174 in M.P. Murphy and L.A.J.
981 O'Neill, eds. "What is life?" The next 50 years. Speculations on the future of
982 biology. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 983 Simon, H.A. 1962. The architecture of complexity. *Proc. Amer. Phil. Soc.*
984 106(6): 497-482.
- 985 Smith, K.K. 1996. Integration of craniofacial structures during development
986 in mammals. *Am. Zool.* 36: 70-79
- 987 _____. 1997. Comparative patterns of craniofacial development in Eutherian
988 and Metatherian mammals. *Evolution* 51(5): 1663-1678
- 989 _____. 2001. Early development of the neural plate, neural crest and facial
990 region of marsupials. *J.Anat.*199: 121-131
- 991 Sneath, P.H., and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. WH Freeman and
992 Co., San Francisco.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

993 Steiner, C., M. Tilak, E.J.P. Douzery, and F.M. Catzeflis. 2005. New DNA
994 data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene
995 diversification of living South America opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Mol.*
996 *Phylogenet. Evol.* 35:363-379.

997 Steppan, S.J., P.C. Phillips, and D. Houle. 2002. Comparative quantitative
998 genetics: evolution of the **G** matrix. *Trends Ecol. Evol.* 17: 320-327.

999 Szalay, F.S. 1994. Evolutionary history of marsupials and an analysis of
1000 osteological characters. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

1001 Tanay, A., R. Sharan, M. Kupiec, and R. Shamir. 2004. Revealing
1002 modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of
1003 highly heterogeneous genomewide data. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101(9):2981-2986.

1004 Vaglia, J.L., and K.K. Smith. 2003. Early differentiation and migration of
1005 cranial neural crest in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Evolution Develop.*
1006 5(2):121-135.

1007 von Dassow, G., and E. Munro. 1999. Modularity in animal development
1008 and evolution: elements of a conceptual framework for EvoDevo. *J. Exp. Zool.*
1009 285:307-325.

1010 Voss, R.S., and S.A. Jansa. 2003. Phylogenetic studies on didelphid
1011 marsupials II. Non-molecular data and new IRBP sequences: separate and combined
1012 analyses of Didelphine relationships with denser taxonomic sampling. *Bull. Amer.*
1013 *Mus. Nat. Hist.* 276:1-82.

1014 Wagner, G.P. 1996. Homologues, natural kinds and the evolution of
1015 modularity. *Amer. Zool.* 36:36-43.

1016 Wagner, G.P., and L. Altenberg. 1996. Complex adaptations and the
1017 evolution of evolvability. *Evolution* 50(3):967-976.

- 1
2
3 1018 Wagner, G.P., M. Pavlicev, and J.M. Cheverud.. 2007. The road to
4
5
6 1019 modularity. *Nature Rev. Gen.* 8:921-931.
7
8 1020 Wright, S. 1968. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 1: Genetic
9
10 1021 and biometric foundations. Univ. Chicago Press, Chicago.
11
12 1022 Zelditch, M.L. 1988. Ontogenetic variation in patterns of phenotypic
13
14 1023 integration in the laboratory rat. *Evolution* 42(1): 28-41.
15
16
17 1024 Zelditch, M.L., D.O. Straney, D.L. Swiderski, and A.C. Carmichael. 1990.
18
19 1025 Variation in developmental constraints in *Sigmodon*. *Evolution* 44(7):1738-1747.
20
21
22 1026 Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets, and W.L. Fink. 2004.
23
24 1027 Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Acad. Press, San Diego.
25
26
27 1028
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1029

Table 1: Thirty five measurements and their hypothesized modular regions. Refer to Figure 1 for illustration of the landmarks. In Function, MAS refers to mastication (sometimes also including deglutition), RES to respiration (sometimes also including olfaction), CNS to protection of the central nervous system. The developmental origin for each measurement is also presented, being either from cells of the neural crest or of the paraxial mesoderm (Moore 1981), and bolded origins indicate which have early differentiation in marsupials when compared to placentals (Clark and Smith 1993).

Measurements	Regions	Subregions	Subregions	Function	Origin
		Marsupials	Primates		
IS-PM	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
IS-NSL	Face	Nasal	Nasal	RES	Crest
IS-PNS	Face	Oral, nasal	Oral, nasal	MAS, RES	Crest
PM-ZS	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
PM-ZI	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
PM-MT	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
NSL-NA	Face	Nasal	Nasal	RES	Crest
NSL-ZS	Face	Nasal	Nasal	RES	Crest
NSL-ZI	Face	Nasal	Nasal	RES	Crest
NA-BR	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
NA-PNS	Face	Nasal	Nasal	RES	Crest
BR-PT	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
BR-APET	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm

PT-APET	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
PT-BA	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
PT-EAM	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
PT-ZYGO	Face	Zygomatic	Zygomatic	MAS	Crest
PT-TSP	Neurocranium, Face	Vault, zygomatic	Vault, zygomatic	CNS, MAS	Mesoderm
ZS-ZI	Face	Oral, zygomatic	Oral	MAS	Crest
ZI-MT	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
ZI-ZYGO	Face	Zygomatic	Zygomatic	MAS	Crest
ZI-TSP	Face	Zygomatic	Zygomatic	MAS	Crest
MT-PNS	Face	Oral	Oral	MAS	Crest
PNS-APET	Neurocranium	Base	Base	CNS	Mesoderm
APET-BA	Neurocranium	Base	Base	CNS	Mesoderm
APET-TS	Neurocranium	Base	Base	CNS	Mesoderm
BA-EAM	Neurocranium	Base	Base	CNS	Mesoderm
EAM-ZYGO	Face	Zygomatic	Zygomatic	MAS	Crest
ZYGO-TSP	Face	Zygomatic	Zygomatic	MAS	Crest
LD-AS	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
BR-LD	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
OPI-LD	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
PT-AS	Neurocranium	Vault	Vault	CNS	Mesoderm
JP-AS	Neurocranium	Vault	Base	CNS	Mesoderm
BA-OPI	Neurocranium	Base	Base	CNS	Mesoderm

1039 Table 2: Modular distinctness in the cranium, as shown by (A) the ratio between avg
1040 (+) and avg (-), and (B) the differences of avg (+) and avg (-) in the natural base, for
1041 raw correlation matrices. Values indicated by * are positive and significant for tests
1042 of morphological integration at $P<0.1$, and ** at $P<0.05$. Average ratios for
1043 Neotropical marsupials (Metatheria) and monkeys (Eutheria) are presented in the
1044 last two rows.

1045 (A)

	total	neuroface	face	oral	nasal	vault
<i>Caluromys</i>	0.98	1.08*	1.65**	1.23	2.07**	0.57
<i>Chironectes</i>	1.13	1.17**	1.60**	1.59**	1.64**	0.85
<i>Didelphis</i>	1.02	1.04**	1.18**	1.12	1.26*	0.90
<i>Lutreolina</i>	1.00	1.02	1.19**	1.16	1.17	0.87
<i>Metachirus</i>	0.86	1.06	1.53**	1.24	2.13**	0.40
<i>Philander</i>	0.94	1.01	1.17	1.01	1.34*	0.78
<i>Alouatta</i>	1.17**	1.15**	1.47**	1.73**	1.33	0.93
<i>Pithecia</i>	1.25**	1.25**	1.47**	1.61**	1.90**	1.06
<i>Saguinus</i>	1.52**	1.25**	1.10	1.68**	1.53	1.65**
Metatheria	0.99	1.06	1.39	1.22	1.60	0.73
Eutheria	1.31	1.22	1.35	1.67	1.59	1.21

1046

1047 (B)

	total	neuroface	face	oral	nasal	vault
<i>Caluromys</i>	0.99	1.03*	1.22**	1.09	1.47**	0.85
<i>Chironectes</i>	1.05	1.06**	1.20**	1.23**	1.26**	0.95
<i>Didelphis</i>	1.01	1.02**	1.10**	1.07	1.16*	0.94
<i>Lutreolina</i>	1.00	1.01	1.12**	1.11	1.12	0.92
<i>Metachirus</i>	0.96	1.01	1.13**	1.06	1.33**	0.84
<i>Philander</i>	0.97	1.00	1.09	1.01	1.20*	0.89

<i>Alouatta</i>	1.05**	1.05**	1.15**	1.26**	1.12	0.98
<i>Pithecia</i>	1.06**	1.06**	1.11**	1.16**	1.25**	1.02
<i>Saguinus</i>	1.09**	1.04**	1.02	1.13**	1.10	1.12**
Metatheria	1.00	1.02	1.14	1.09	1.25	0.90
Eutheria	1.07	1.05	1.09	1.18	1.15	1.04

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

Table 3: Modular distinctness in the cranium, as shown by the differences in the natural base between avg (+) and avg (-) for residual correlation matrices. Values indicated by * are positive and significant for tests of morphological integration at $P<0.1$, and ** at $P<0.05$. Average ratios for Neotropical marsupials (Metatheria) and monkeys (Eutheria) are presented in the last two rows.

	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault
<i>Caluromys</i>	1.04**	1.03**	1.00	1.01	1.01	1.05*	1.03*	1.05**
<i>Chironectes</i>	1.06**	1.06**	1.01	1.05**	1.00	1.09**	1.01	1.08**
<i>Didelphis</i>	1.03**	1.03**	1.01**	1.01**	1.04**	1.04**	1.02*	1.02**
<i>Lutreolina</i>	1.02**	1.02**	1.01**	1.01**	1.04**	1.01	1.01	1.01
<i>Metachirus</i>	1.01	1.02**	1.01**	1.00	1.01	1.05*	1.01	0.99
<i>Philander</i>	1.02**	1.01**	1.00	1.01	1.00	1.03*	1.02*	1.01*
<i>Alouatta</i>	1.07**	1.06**	1.01**	1.06**	1.05**	1.03	1.05**	1.09**
<i>Pithecia</i>	1.08**	1.06**	1.01*	1.05**	1.05**	1.09**	1.04*	1.11**
<i>Saguinus</i>	1.06**	1.04**	1.02*	1.03**	1.03	1.00	1.11**	1.08**
Metatheria	1.03	1.03	1.01	1.01	1.02	1.04	1.02	1.03
Eutheria	1.07	1.05	1.01	1.05	1.04	1.04	1.07	1.10

1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081

1082 Table 4: Eigenvectors of the first principal component from Neotropical marsupials
 1083 and monkeys correlation matrices. The first row presents the percentage of variation
 1084 explained by the first principal component for each genus.

46.62	46.66	59.52	67.59	35.27	58.81	38.67	30.18	24.53
<i>Caluromys</i>	<i>Chironectes</i>	<i>Didelphis</i>	<i>Lutreolina</i>	<i>Metachirus</i>	<i>Philander</i>	<i>Alouatta</i>	<i>Pithecia</i>	<i>Saguinus</i>
0.027	0.161	0.116	0.168	0.069	0.109	0.175	0.178	0.171
0.178	0.103	0.141	0.144	0.16	0.143	0.151	0.179	0.11
0.226	0.23	0.198	0.198	0.248	0.205	0.216	0.221	0.256
0.205	0.175	0.181	0.159	0.212	0.183	0.22	0.194	0.133
0.225	0.218	0.193	0.183	0.233	0.196	0.209	0.218	0.222
0.212	0.207	0.171	0.175	0.205	0.178	0.195	0.159	0.242
0.198	0.171	0.169	0.155	0.183	0.18	0.12	0.13	0.041
0.215	0.149	0.19	0.189	0.217	0.194	0.166	0.194	0.179
0.229	0.219	0.199	0.191	0.242	0.2	0.223	0.239	0.264
0.078	0.123	0.145	0.163	0.016	0.108	0.153	0.148	0.152
0.204	0.192	0.179	0.192	0.173	0.183	0.191	0.212	0.252
0.019	0.182	0.155	0.151	0.039	0.102	0.086	0.08	0.13
0.181	0.184	0.194	0.185	0.172	0.19	0.116	0.142	0.04
0.145	0.092	0.165	0.168	0.208	0.173	0.137	0.161	0.242
0.211	0.154	0.197	0.188	0.238	0.203	0.216	0.243	0.288
0.135	0.173	0.179	0.172	0.189	0.185	0.208	0.215	0.225
0.178	0.202	0.194	0.185	0.201	0.198	0.193	0.209	0.185
0.055	-0.035	0.094	0.114	-0.013	0.052	0.075	0.097	0.131
0.147	0.2	0.167	0.17	0.121	0.147	0.167	0.165	0.191
0.109	0.119	0.141	0.149	0.039	0.095	0.196	0.186	0.075
0.22	0.214	0.2	0.191	0.221	0.208	0.147	0.149	0.108
0.213	0.202	0.193	0.194	0.199	0.203	0.196	0.206	0.037
0.201	0.179	0.189	0.185	0.201	0.198	0.19	0.161	0.153

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

0.214	0.191	0.197	0.192	0.207	0.203	0.17	0.174	-0.003
0.173	0.163	0.186	0.182	0.201	0.192	0.194	0.187	0.156
0.058	-0.009	0.095	0.082	0.1	0.125	0.085	0.091	0.109
0.215	0.162	0.194	0.189	0.214	0.194	0.195	0.188	0.241
0.181	0.195	0.19	0.188	0.145	0.189	0.187	0.072	0.001
0.201	0.211	0.19	0.192	0.175	0.198	0.191	0.208	0.12
0.103	0.131	0.146	0.15	0.102	0.147	0.133	0.063	0.16
0.142	-0.009	0.09	0.069	0.083	0.095	0.051	0.033	0.057
0.111	0.188	0.157	0.163	0.136	0.171	0.103	0.086	0.153
0.18	0.177	0.183	0.183	0.136	0.185	0.21	0.216	0.195
-0.034	0.169	0.147	0.158	-0.011	0.126	0.158	0.135	0.191
0.013	-0.1	0.044	0.091	0.007	0.044	-0.015	0.027	0.039

1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099

1100 Table 5: Correlations between Neotropical marsupials and monkeys genera for (A)
 1101 raw and (B) residual matrices (below the diagonal). The bolded diagonal presents
 1102 the matrix repeatabilities for both cases, and adjusted values are above the diagonal.
 1103 All comparisons are significant at $P < 0.001$ in 9999 permutations.
 1104 (A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Caluromys</i>	0.906	0.697	0.809	0.812	0.903	0.877	0.626	0.617	0.289
<i>Chironectes</i>	0.547	0.679	1.051	1.211	0.747	0.948	0.857	0.714	0.431
<i>Didelphis</i>	0.738	0.830	0.918	1.174	0.837	0.993	0.785	0.694	0.394
<i>Lutreolina</i>	0.598	0.773	0.871	0.600	0.852	1.060	0.945	0.872	0.491
<i>Metachirus</i>	0.785	0.564	0.734	0.604	0.838	0.938	0.601	0.607	0.381
<i>Philander</i>	0.793	0.742	0.904	0.780	0.815	0.903	0.712	0.638	0.336
<i>Alouatta</i>	0.577	0.684	0.729	0.709	0.532	0.655	0.942	0.887	0.586
<i>Pithecia</i>	0.549	0.550	0.622	0.631	0.519	0.567	0.803	0.879	0.689
<i>Saguinus</i>	0.272	0.350	0.373	0.375	0.344	0.315	0.560	0.636	0.974

1105

1106 (B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Caluromys</i>	0.912	0.582	0.706	0.576	0.532	0.682	0.537	0.606	0.447
<i>Chironectes</i>	0.478	0.738	0.703	0.453	0.565	0.660	0.504	0.510	0.430
<i>Didelphis</i>	0.646	0.579	0.920	0.717	0.748	0.847	0.586	0.626	0.566
<i>Lutreolina</i>	0.500	0.354	0.625	0.826	0.602	0.668	0.505	0.588	0.495
<i>Metachirus</i>	0.409	0.391	0.578	0.440	0.648	0.583	0.379	0.453	0.425
<i>Philander</i>	0.612	0.533	0.763	0.570	0.440	0.882	0.539	0.616	0.517
<i>Alouatta</i>	0.500	0.422	0.549	0.448	0.298	0.494	0.952	0.794	0.648
<i>Pithecia</i>	0.559	0.423	0.581	0.517	0.352	0.559	0.749	0.935	0.720
<i>Saguinus</i>	0.423	0.366	0.537	0.445	0.338	0.481	0.626	0.689	0.981

1107

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1108 Table 6: Correlations between the eigenvectors of the first principal component from
1109 Neotropical marsupials and monkeys correlation matrices. The value of corr_{max} for a
1110 comparison among 35 size-related vectors is 0.851, thus only two correlations are
1111 not significant ($P < 0.05$, italicized). The bolded diagonal presents the eigenvectors
1112 repeatabilities.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Caluromys</i>	0.996								
<i>Chironectes</i>	0.916	0.974							
<i>Didelphis</i>	0.956	0.959	0.999						
<i>Lutreolina</i>	0.940	0.952	0.995	0.997					
<i>Metachirus</i>	0.981	0.918	0.947	0.930	0.942				
<i>Philander</i>	0.968	0.955	0.994	0.987	0.969	0.998			
<i>Alouatta</i>	0.942	0.958	0.980	0.978	0.934	0.974	0.999		
<i>Pithecia</i>	0.939	0.935	0.970	0.970	0.935	0.965	0.985	0.996	
<i>Saguinus</i>	<i>0.835</i>	0.853	0.895	0.900	0.856	0.888	0.911	0.920	0.998

1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123

Table 7: Morphological integration indexes for New World marsupials and monkeys: r^2 values for raw correlation matrices, and ICV for V/CV residual matrices. The simulation results using raw V/CV matrices are shown as the absolute number of responses aligned with: first three principal components (1st 3 PCs); only the first ($p_{\max}$), the second (PC2), and the third (PC3) principal components; and the selection gradient (β). Using V/CV residual matrices it is shown the number of responses aligned with: the second principal component (PC2 resid) and with the selection gradient (β resid). The last two rows present the average values for New World marsupials (Metatheria) and monkeys (Eutheria).

	r^2	1 st 3 PCs	$p_{\max}$	PC2	PC3	β	ICV resid	PC2 resid	β resid
<i>Caluromys</i>	0.22	911	767	79	65	140	2.00	405	650
<i>Chironectes</i>	0.23	890	765	105	20	98	2.05	496	461
<i>Didelphis</i>	0.35	914	872	20	22	96	1.68	264	871
<i>Lutreolina</i>	0.45	949	900	36	13	52	1.92	389	652
<i>Metachirus</i>	0.13	848	503	334	11	278	2.27	700	471
<i>Philander</i>	0.34	907	856	41	10	99	1.69	386	847
<i>Ateles</i>	0.08	730	393	290	47	674	1.92	509	751
<i>Alouatta</i>	0.15	787	731	44	12	436	1.25	234	997
<i>Brachyteles</i>	0.06	471	284	150	37	914	1.47	293	934
<i>Lagothrix</i>	0.10	670	536	94	40	725	1.46	277	967
<i>Cacajao</i>	0.11	659	558	73	28	671	1.33	235	986
<i>Pithecia</i>	0.09	681	581	64	36	750	1.32	214	999
<i>Chiropotes</i>	0.08	603	443	125	35	890	1.41	313	992
<i>Callicebus</i>	0.08	657	577	56	24	793	1.27	210	999
<i>Aotus</i>	0.06	506	367	106	33	917	1.42	221	992

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

<i>Saimiri</i>	0.17	787	663	91	33	382	1.64	347	937
<i>Cebus</i>	0.12	771	456	235	80	387	2.05	510	585
<i>Leontopithecus</i>	0.13	776	569	148	59	301	1.98	459	617
<i>Saguinus</i>	0.07	550	477	58	15	956	1.15	179	1000
<i>Callimico</i>	0.16	778	525	221	32	302	2.16	500	489
<i>Callithrix</i>	0.07	567	362	175	30	923	1.50	333	974
<i>Cebuella</i>	0.06	560	451	90	19	920	1.30	219	998
Metatheria	0.29	903	777	103	24	127	1.93	440	659
Eutheria	0.10	660	498	126	35	684	1.54	316	889

1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Landmarks in the (A) dorsal, (B) lateral, and (C) ventral view of a cranium of *Didelphis marsupialis* (MZUSP 21311). Definitions are presented in Table A1. Landmarks without legend are indicated in the opposite side of the skull. Bar scale of 1 cm.

Figure 2: Scatterplot of the morphological integration index ($\log r^2$) with the number of responses aligned with (A) $p_{\max}$, (B) the selection gradient (β), and (C) with the first three PCs.

Figure 3: Scatterplot of the residual morphological integration index (ICV) with the number of responses aligned with (A) PC2, and (B) the selection gradient (β).

1177

APPENDIX TABLES

1178

Table A1: Description of the 33 landmarks used in this study. R/L: landmark

1179

present in right and left sides.

Landmark	Description	Position
IS	Intradentale Superior	Medial, anterior
PM	Premaxillary-Maxillary suture at the alveolus	R/L
NSL	Nasale	Medial, anterior
NA	Nasion	Medial, dorsal
BR	Bregma	Medial, dorsal
PT	Pterion	R/L
ZS	Zygomaxillare superior	R/L
ZI	Zygomaxillare inferior	R/L
MT	Maxillary tuberosity	R/L
PNS	Posterior Nasal Spine	Medial, ventral
APET	Anterior Petrous Temporal	R/L
BA	Basion	Medial, inferior
OPI	Opistion	Medial, inferior
EAM	anterior External Auditory Meatus	R/L
ZYGO	posterior External Auditory Meatus	R/L
TSP	Temporo-Spheno-Parietal suture	R/L
TS	Temporo-Sphenoidal junction at petrous	R/L
JP	Jugular Process	R/L
LD	Lambda	R/L
AS	Asterion	R/L

1180

Table A2: Values of integrated (avg +) and non-integrated (avg -) traits, as well as the difference between the two, for all morphological integration hypotheses in (A) raw, and (B) residual correlation matrices.

(A)

Avg (+)	Total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	0.363	0.384	0.514	0.215	0.451	0.744	0.488	0.221	0.218
<i>Chironectes</i>	0.394	0.389	0.490	0.229	0.556	0.581	0.454	0.312	0.075
<i>Didelphis</i>	0.562	0.565	0.623	0.473	0.618	0.696	0.650	0.503	0.408
<i>Lutreolina</i>	0.641	0.648	0.724	0.550	0.738	0.751	0.737	0.566	0.505
<i>Metachirus</i>	0.232	0.270	0.348	0.155	0.321	0.542	0.263	0.112	0.251
<i>Philander</i>	0.509	0.537	0.596	0.434	0.540	0.712	0.601	0.428	0.457
<i>Alouatta</i>	0.372	0.355	0.429	0.266	0.553	0.438	0.398	0.310	0.205
<i>Pithecia</i>	0.294	0.277	0.323	0.210	0.391	0.464	0.273	0.263	0.162
<i>Saguinus</i>	0.243	0.199	0.192	0.196	0.291	0.270	0.167	0.279	0.097
Metatheria	0.450	0.465	0.549	0.343	0.537	0.671	0.532	0.357	0.319
Eutheria	0.303	0.277	0.314	0.224	0.412	0.391	0.280	0.284	0.155

(B)

Avg (-)	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	0.372	0.356	0.311	0.415	0.365	0.360	0.365	0.388	0.372
<i>Chironectes</i>	0.349	0.332	0.307	0.398	0.350	0.354	0.356	0.365	0.364
<i>Didelphis</i>	0.552	0.544	0.527	0.579	0.551	0.551	0.551	0.561	0.557
<i>Lutreolina</i>	0.642	0.637	0.609	0.670	0.637	0.639	0.639	0.652	0.645
<i>Metachirus</i>	0.271	0.255	0.227	0.294	0.259	0.255	0.262	0.281	0.262
<i>Philander</i>	0.543	0.533	0.510	0.565	0.534	0.530	0.532	0.548	0.536
<i>Alouatta</i>	0.318	0.308	0.292	0.350	0.320	0.328	0.329	0.333	0.334
<i>Pithecia</i>	0.236	0.223	0.220	0.261	0.242	0.244	0.249	0.248	0.252
<i>Saguinus</i>	0.159	0.160	0.174	0.174	0.174	0.177	0.179	0.169	0.181
Metatheria	0.455	0.443	0.415	0.487	0.450	0.448	0.451	0.466	0.456

Eutheria	0.238	0.230	0.228	0.262	0.245	0.250	0.252	0.250	0.256
1186									
Difference	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	-0.009	0.028	0.203	-0.201	0.085	0.384	0.123	-0.167	-0.154
<i>Chironectes</i>	0.045	0.057	0.183	-0.170	0.206	0.227	0.098	-0.054	-0.290
<i>Didelphis</i>	0.010	0.021	0.097	-0.106	0.067	0.145	0.100	-0.058	-0.149
<i>Lutreolina</i>	-0.001	0.011	0.115	-0.120	0.100	0.111	0.098	-0.086	-0.140
<i>Metachirus</i>	-0.039	0.014	0.121	-0.138	0.061	0.287	0.001	-0.169	-0.011
<i>Philander</i>	-0.034	0.004	0.086	-0.130	0.006	0.182	0.068	-0.120	-0.079
<i>Alouatta</i>	0.053	0.047	0.137	-0.085	0.233	0.110	0.069	-0.023	-0.130
<i>Pithecia</i>	0.058	0.055	0.103	-0.051	0.149	0.220	0.025	0.015	-0.089
<i>Saguinus</i>	0.083	0.040	0.018	0.022	0.118	0.093	-0.012	0.110	-0.084
Metatheria	-0.005	0.023	0.134	-0.144	0.088	0.223	0.081	-0.109	-0.137
Eutheria	0.065	0.047	0.086	-0.038	0.166	0.141	0.027	0.034	-0.101

1187

1188 (B)

Avg (+)	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	0.017	0.003	-0.013	-0.005	-0.005	0.037	0.021	0.030	-0.049
<i>Chironectes</i>	0.034	0.020	-0.003	0.025	-0.008	0.073	0.003	0.054	0.020
<i>Didelphis</i>	0.013	0.005	-0.003	0.000	0.022	0.027	0.012	0.008	0.001
<i>Lutreolina</i>	0.005	0.002	0.001	-0.001	0.026	0.001	0.003	-0.003	0.007
<i>Metachirus</i>	-0.010	-0.006	-0.006	-0.014	-0.010	0.031	-0.004	-0.025	0.010
<i>Philander</i>	0.002	-0.003	-0.008	-0.006	-0.008	0.016	0.009	0.000	0.004
<i>Alouatta</i>	0.035	0.012	-0.006	0.027	0.033	0.013	0.035	0.067	-0.012
<i>Pithecia</i>	0.038	0.014	-0.010	0.021	0.030	0.066	0.020	0.075	-0.019
<i>Saguinus</i>	0.031	0.010	-0.001	0.013	0.016	-0.008	0.093	0.060	-0.019
Metatheria	0.010	0.004	-0.005	0.000	0.003	0.031	0.007	0.011	-0.001
Eutheria	0.035	0.012	-0.006	0.020	0.026	0.024	0.050	0.067	-0.017

1189

Avg (-)	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	-0.020	-0.025	-0.011	-0.013	-0.012	-0.013	-0.012	-0.016	-0.011
<i>Chironectes</i>	-0.023	-0.039	-0.013	-0.020	-0.010	-0.012	-0.010	-0.018	-0.010
<i>Didelphis</i>	-0.019	-0.026	-0.014	-0.014	-0.013	-0.012	-0.012	-0.013	-0.011
<i>Lutreolina</i>	-0.013	-0.019	-0.013	-0.011	-0.011	-0.009	-0.009	-0.010	-0.009
<i>Metachirus</i>	-0.017	-0.025	-0.019	-0.016	-0.016	-0.017	-0.016	-0.014	-0.016
<i>Philander</i>	-0.015	-0.018	-0.012	-0.012	-0.011	-0.011	-0.011	-0.012	-0.011
<i>Alouatta</i>	-0.031	-0.042	-0.019	-0.028	-0.018	-0.016	-0.017	-0.024	-0.016
<i>Pithecia</i>	-0.035	-0.048	-0.021	-0.029	-0.020	-0.020	-0.019	-0.027	-0.017
<i>Saguinus</i>	-0.025	-0.034	-0.017	-0.020	-0.014	-0.012	-0.015	-0.020	-0.012
Metatheria	-0.018	-0.025	-0.014	-0.015	-0.012	-0.012	-0.012	-0.014	-0.011
Eutheria	-0.030	-0.041	-0.019	-0.026	-0.017	-0.016	-0.017	-0.023	-0.015

1190

Difference	total	neuroface	face	neuro	oral	nasal	zygo	vault	base
<i>Caluromys</i>	0.037	0.028	-0.002	0.009	0.007	0.049	0.033	0.047	-0.038
<i>Chironectes</i>	0.057	0.059	0.010	0.045	0.002	0.085	0.013	0.072	0.030
<i>Didelphis</i>	0.032	0.031	0.012	0.014	0.035	0.039	0.024	0.022	0.013
<i>Lutreolina</i>	0.018	0.021	0.014	0.010	0.037	0.011	0.013	0.007	0.016
<i>Metachirus</i>	0.007	0.019	0.014	0.002	0.006	0.047	0.012	-0.010	0.026
<i>Philander</i>	0.017	0.015	0.004	0.006	0.003	0.027	0.021	0.013	0.015
<i>Alouatta</i>	0.067	0.054	0.013	0.055	0.051	0.029	0.052	0.091	0.003
<i>Pithecia</i>	0.073	0.062	0.011	0.051	0.050	0.085	0.039	0.102	-0.002
<i>Saguinus</i>	0.056	0.044	0.015	0.032	0.030	0.004	0.108	0.080	-0.007
Metatheria	0.028	0.029	0.008	0.014	0.015	0.043	0.019	0.025	0.010
Eutheria	0.065	0.053	0.013	0.046	0.044	0.040	0.066	0.091	-0.002

1191

1192

1193

1194

1195 FIGURES

1196 Figure 1

1197 (A)

1198

1199 (B)

1200

1201 (C)

1202

1203

1204

1205

1206

1207 Figure 2

1208 (A)

1209

1210 (B)

1211

1212 (C)

1213

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

Figure 3

(A)

(B)

1230

1231

Referências Bibliográficas

- Aljanabi, S. and I. Martinez, 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic dna for pcr-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692–4693.
- Anne, C., 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127:101–120.
- Avise, J., 2001. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Harvard.
- Avise, J., J. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb, and N. Saunders, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489–522.
- Ayres, J. and T. Clutton-Brock, 1992. River boundaries and species range size in amazonian primates. *American Naturalist* 140:531–537.
- Bartlein, P. and I. Prentice, 1989. Orbital variation, climate and paleoecology. *Trends in Ecology and Evolution* 4:195–199.
- Bigarella, J. and D. Andrade-Lima, 1979. Biological diversification in the tropics, chap. *Paleoenvironmental changes in Brazil*, Pp. 27–40. Columbia University Press, NY. *Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology*, held at Macuco Beach, Caracas, Venezuela.
- Brown, K., 1987. Biogeography and quaternary history in tropical America, chap. *Conclusions, synthesis, and alternative hypotheses*, Pp. 175–195. Clarenton Press, Oxford.
- Cabrera, A., 1957. *Catalogo de los mamíferos de America del Sur*, vol. IV. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales e Instituto de Investigación de las Ciencias Naturales*.
- Capparella, A., 1986. Genetic variation in neotropical birds: implication for the speciation process. *Acta XIX Congress International Ornithology* 2:1658–1664. Não consultado.
- Cardillo, M., O. Bininda-Emonds, E. Boakes, and A. Purvis, 2004. A species-level phylogenetic supertree of marsupials. *Journal of Zoology*, London 264:11–31.
- Carnaval, A. and C. Moritz, 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the brazilian atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35:1187–1201.
- Cerqueira, R., 1985. The distribution of didelphis in south america (polyprodonia, didelphidae). *Journal of Biogeography* 12:135–145.

- Cerqueira, R. and B. Lemos, 2000. Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia* 64:319–327.
- Cerqueira, R. and C. Tribe, 2008. Mammals of South America, vol. I. Marsupials (Didelphimorphia, Microbiotheria, and Paucituberculata), Xenarthrans (Cingulata, Pilosa), Shrews (Soricomorpha), and bats (Chiroptera), chap. Didelphis, Pp. 19–41. University of Chicago Press, Chicago and London.
- Chek, A., J. Austin, and S. Loughheed, 2003. Why is there a tropical-temperate disparity in the genetic diversity and taxonomy of species. *Evolutionary Ecology Research* 5:69–77.
- Cheviron, Z., S. Hackett, and A. Capparella, 2005. Complex evolutionary history of a neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36:338–357.
- Clemens, W., 1968. Origin and early evolution of marsupials. *Evolution* 22:1–18.
- Coates, A., J. Jackson, L. Collins, T. Cronin, H. Dowsett, L. Bybell, P. Jung, and J. Obando, 1992. Closure of the isthmus of Panama: the near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin* 104:814–828.
- Cordero, G. and R. Nicolas, 1987. Feeding habits of the opossum (*Didelphis marsupialis*) in northern Venezuela. *Fieldiana* 39:125–131.
- Costa, L., 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.
- Costa, L., Y. Leite, G. Fonseca, and M. Fonseca, 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic forest. *Biotropica* 32:872–881.
- Cracraft, J. and R. Prum, 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution* 42:603–620.
- Dinerstein, E., D. Olson, P. Graham, A. Webster, S. Primm, M. Bookbinder, and G. Ledec, 1995. A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. The World Bank, Washington D.C.
- Ebach, M. and D. Goujet, 2006. The first biogeographical map. *Journal of Biogeography* 33:761–769.
- Edwards, S. and P. Beerli, 2000. Gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54:1839–1854.
- Emerson, B., E. Paradis, and C. Thébaud, 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution* 16:707–716.
- Emmons, L. and F. Feer, 1997. Neotropical rainforest mammals: a field guide. 2nd ed. The University of Chicago Press, Chicago.

- Emsley, M., 1965. Speciation in *Heliconius* (lepidoptera, nymphalidae): morphology and geographic distribution. *Zoologica* 50:191–254. Não consultado.
- Endler, J., 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton. Não consultado.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 79:783–791.
- , 2008. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.68. University of Washington, Seattle.
- Freckleton, R. and A. Watkinson, 2002. Large-scale spatial dynamics of plants: metapopulations, regional ensembles and patchy populations. *Journal of Ecology* 90:419–434.
- Fu, Y., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Fu, Y. and W. Li, 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693–709.
- Gardner, A., 1993. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, chap. Order Didelphimorphia, Pp. 15–23. 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Grazziotin, F., M. Monzel, S. Echeverrigaray, and S. Bonatto, 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.
- , 1979. Biological diversification in the tropics, chap. General aspects of the refuge theory, Pp. 6–24. Columbia University Press, NY. Proceedings of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology, held at Macuco Beach, Caracas, Venezuela.
- , 1997. Alternative models of vertebrate speciation in amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6:451–476.
- Hall, J. and D. Harvey, 2002. The phylogeography of amazonia revisited: new evidence from riodonid butterflies. *Evolution* 56:1489–1497.
- Hall, T., 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic acids symposium series* 41:95–98.
- Hammen, T., 1974. The pleistocene changes of vegetation and climate in tropical south america. *Journal of Biogeography* 1:3–26.
- Hartl, D., 2000. A primer of Population Genetics. 3rd ed. Harvard University Press, Harvard.

- Hartman, C., 1952. Possums. University of Texas Press.
- Hasegawa, M., K. Kishino, and T. Yano, 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial dna. *Journal of Molecular Evolution* 22:160–174.
- Hershkovitz, P., 1969. The evolution of mammals on southern continents vi. the recent mammals of the neotropical region: a zoogeographic and ecological review. *The Quarterly Review of Biology* 44:1–70.
- Hoffman, E. and M. Blouin, 2004. Evolutionary history of the northern leopard frog: reconstruction of phylogeny, phylogeography, and historical changes in population demography from mitochondrial dna. *Evolution* 58:145–159.
- Hooghiemstra, H. and T. Hammen, 1998. Neogene and quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Science Reviews* 44:147–183.
- Hulbert, R. and G. Morgan, 1993. Morphological change in Quaternary mammals of North America, chap. Quantitative and qualitative evolution of the giant armadillo *Holmesina* (Edentata: Pampatheriidae) in Florida, Pp. 134–175. Cambridge University Press, Cambridge.
- IBGE, 1993. Mapa da Vegetação do Brasil. Fundação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- Janke, A., G. Feldmaier-Fuchs, W. Thomas, A. von Haeseler, and S. Paabo, 1994. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137:243–256.
- Jansa, S. and R. Voss, 2000. Phylogenetic studies on didelphid marsupials i. introduction and preliminary results from irbp gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7:43–77.
- Julien-Lafférière, D. and M. Atramentowicz, 1990. Feeding and reproduction of three didelphid marsupials in two neotropical forests (french guiana). *Biotropica* 22:404–415.
- Kajin, M., 2008. Demografia, dinâmica e genética de populações de *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphidae) na Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Ph.D. thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624–626.
- Kimura, M. and J. Crow, 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725–738.
- Kingman, J., 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13:235–248.
- Kirsch, J. and R. Palma, 1995. Dna/dna hybridization studies of carnivorous marsupials. v: a further estimate of relationships among opossums (marsupialia: Didelphidae). *Mammalia* 59:403–425.

- Klecka, W., 1980. Discriminant analysis, *SAGE University Papers*, vol. 07-019. SAGE Publications, Beverly Hills.
- Knowlton, N. and L. Weigt, 1998. New dates and new rates for divergence across the isthmus of panama. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265:2257–2263.
- Leite, Y., L. Costa, and J. Stallings, 1996. Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a brazilian atlantic forest reserve. *Journal of Tropical Ecology* 12:435–440.
- Lemos, B., F. Canavez, and M. Moreira, 1999. Mitochondrial dna-like sequences in the nuclear genome of the opossum genus *Didelphis* (marsupialia: Didelphidae). *The Journal of Heredity* 90:543–547.
- Lessa, E., J. Cook, and J. Patton, 2003. Genetic footprints of demographic expansion in north america, but not amazonia, during the late quaternary. *Proceedings of the National Academy of Science* 100:10331–10334.
- Lleonart, J., J. Salat, and G. Torres, 2000. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology* 205:85–93.
- Loretto, D. and M. Vieira, 2005. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*didelphis aurita* wied-neuwied, 1926). *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.
- Marroig, G. and R. Cerqueira, 1997. Plio-pleistocene south american history and the amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology* 2:103–119.
- Marroig, G. and J. Cheverud, 2004. Cranial evolution in sakis (*pithecia*, *platyrrhini*) i: interspecific differentiation and allometric patterns. *American Journal of Physical Anthropology* 125:266–278.
- Mayle, F., D. Beerling, W. Gosling, and M. Bush, 2004. Responses of amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359:499–514.
- Mayr, E., 1942. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. and R. O'Hara, 1986. The biogeographic evidence supporting the pleistocene forest refuge hypothesis. *Evolution* 40:55–67.
- McVean, G., P. Awadalla, and P. Fearnhead, 2002. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* 160: 1231-1241 160:1231–1241.

- Mendel, S., M. Vieira, and R. Cerqueira, 2008. Precipitation, litterfall, and the dynamics of density and biomass in the black-eared opossum, *Didelphis aurita*. *Journal of Mammalogy* 89:159–167.
- Moraes-Barros, N., J. Silva, C. Miyaki, and J. Morgante, 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.
- Morris, W. (ed.) 1999. *The American Heritage Dictionary of the English Language*. New College Ed. Houghton Mifflin Co., Boston.
- Myers, N., R. Mittermeier, C. Mittermeier, G. Fonseca, and J. Kent, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.
- Neigel, J., 2002. Is *fst* obsolete? *Conservation Genetics* 3:167–173.
- Nelson, G., 1979. Refuges, humans and vicariance. *Systematic Zoology* 27:484–487. Não consultado.
- Nunes-Santos, C., J. Ayres, H. Schneider, and I. Sampaio, 2006. Molecular discrimination of pouched four-eyed opossums from Mamirauá Reserve (Amazon-Brazil). *Genetics and Molecular Biology* 29:283–286.
- Ohta, T. and J. Gillespie, 1996. Development of neutral and nearly neutral theories. *Theoretical Population Biology* 49:128–142.
- Olifiers, N., R. Gentile, and J. Fizon, 2005. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* 65:495–501.
- Palma, R. and A. Spotorno, 1999. Molecular systematics of marsupials based on the rRNA 12S mitochondrial gene: the phylogeny of Didelphimorphia and of the living fossil Microbiotheriidae *Dromiciops gliroides* Thomas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13:525–535.
- Papavero, N. and D. Teixeira, 2001. Os viajantes e a biogeografia. *História, Ciências, Saúde* VIII:1015–1037.
- Pardini, R., S. M. Souza, R. Braga-Neto, and J. Metzger, 2005. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic Forest landscape. *Biological Conservation* 124:253–266.
- Patton, J. and L. Costa, 2003. Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials, chap. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America., Pp. 63–81. CSIRO Publishing, Collingwood.
- Patton, J., S. Reis, and M. Silva, 1996. Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Mammalian Evolution* 3:3–29.
- Patton, J. and M. da Silva, 1997. Definition of species of pouched four-eyed opossums (Didelphidae, Philander). *Journal of Mammalogy* 78:90–102.

- Patton, J., M. Silva, and J. Malcolm, 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (rodentia: Echimyidae) of the amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution* 48:1314–1323.
- Patton, J., M. da Silva, and J. Malcolm, 2000. Mammals os the rio juruá and the evolutionary and ecological diversification of amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 244:1–306.
- Patton, J. and M. Smith, 1992. mtdna phylogeny of andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46:174–183.
- Platnick, N. and G. Nelson, 1978. A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology* 27:1–16. Não consultado.
- Posada, D. and K. Crandall, 1998. Modeltest: testing the model of dna substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Posada, D., K. Crandall, and A. Templeton, 2000. Geodis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9:487–488.
- Prance, G., 1987. Biogeography and quaternary history in tropical America, chap. *Biogeography of neotropical plants*, Pp. 46–65. Clarenton Press, Oxford.
- Ramos-Onsins, S. and J. Rozas, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19:2092–2100.
- Rosen, B., 1988. Analytical biogeography: an integrated approach to the study of animal and plant distributions, chap. *Biogeographic patterns: a perceptual overview*, Pp. 23–55. Chapman and Hall, London and New York.
- Rougier, G., J. Wible, and M. Novacek, 1998. Implications of deltatheridium specimens for early marsupial history. *Nature* 396:459–463.
- Rozas, J., J. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas, 2003. Dnasp, dna polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497.
- Räsänen, M., J. Salo, and R. Kalliola, 1987. Fluvial perturbation in the western amazon basin: regulation by long-term sub-andean tectonics. *Science* 238:1398–1401. Não consultado.
- Santori, R., D. A. de Moraes, and R. Cerqueira, 1995. Diet composition of metachirus nudicaudatus and didelphis aurita (marsupialia, didelphoidea) in southeastern brazil. *Mammalia* 59:511–516.
- Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution* 16:372–380.
- Shirai, L. and G. Marroig, submetido. Evolutionary constraint and freedom: a comparison between new world marsupials and monkeys skull. *Evolution* .
- Sick, H., 1967. Rios e enchentes na amazônia como obstáculo para a avifauna. *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica* 5:495–520. Não consultado.

- Simpson, B. and J. Haffer, 1978. Speciation patterns in the amazonian forest biota. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9:497–518. Não consultado.
- Simpson, G., 1969. Biogeography and Ecology in South-America. Volume II, *Monographiae Biologicae*, vol. 19, chap. South american mammals, Pp. 879–909. Dr. W. Junk, Hague.
- Smith, K., 1997. Comparative patterns of craniofacial development in eutherian and metatherian mammals. *Evolution* 51:1663–1678.
- Smith, M. and J. Patton, 1993. The diversification of south american murid rodents: evidence from mitochondrial dna sequence data for the akodontinae tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149–177.
- Steiner, C. and F. Catzeffis, 2003. Mitochondrial diversity and morphological variation of *marmosa murina* (didelphidae) in french guiana. *Journal of Mammalogy* 84:822–831.
- Steiner, C., M. Tilak, E. Douzery, and F. Catzeffis, 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.
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199–203.
- Swofford, D., 2002. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and Other Methods), version 4. Sinauer Sunderland, MA.
- Szalay, F., 1994. Evolutionary history of the marsupials and an analysis of osteological characters. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by dna polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tamura, K. and M. Nei, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial dna in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512–526.
- Tavaré, S., 1984. Line-of-descent and genealogical processes, and their application in population genetic models. *Theoretical Population Biology* 26:119–164.
- Templeton, A., E. Routman, and C. Phillips, 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial dna haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140:767–782.
- Thompson, J., T. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. Higgins, 1997. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876–4882.
- Tyndale-Biscoe, C. and R. Mackenzie, 1976. Reproduction in *didelphis marsupialis* and *d. albiventris* in colombia. *Journal of Mammalogy* 57:249–265.

- Vanzolini, P. and E. Williams, 1970. South american anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (sauria, iguanidae). Arquivos de Zoologia (São Paulo) 19:1–298. Não consultado.
- Voss, R. and S. Jansa, 2003. Phylogenetic studies on didelphid marsupials ii. non-molecular data and new irbp sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxonomic sampling. Bulletin of the American Museum of Natural History 276:1–82.
- Wakeley, J., 2003. The Evolution of Population Biology, chap. Inferences about the structure and history of populations: coalescents and intraspecific phylogeography, Pp. 193–215. Cambridge University Press.
- Walker, E., F. Warnick, K. Lange, H. Uible, S. Hamlet, M. Davis, and P. Wright, 1964. Mammals of the world, vol. I. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Wallace, A., 1849. On the monkeys of the amazon. Proclamations of the Zoological Society of London 20:361–362. Não consultado.
- Xia, X. and Z. Xie, 2001. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. Journal of Heredity 92:371–373.