

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Distribuição geográfica da diversidade genética e
aspectos morfológicos diagnósticos de *Marmosa*
(*Micoureus*) (Mammalia, Didelphimorphia) na Mata
Atlântica**

Roger Rodrigues Guimarães

Vitória, ES
Fevereiro, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Distribuição geográfica da diversidade genética e
aspectos morfológicos diagnósticos de *Marmosa*
(*Micoureus*) (Mammalia, Didelphimorphia) na Mata
Atlântica**

Roger Rodrigues Guimarães

Orientador(a): Leonora Pires Costa

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal)
da Universidade Federal do Espírito Santo como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Biologia Animal.**

**Vitória, ES
Fevereiro, 2013**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer as pessoas que sempre me acompanham e de alguma maneira contribuíram para eu chegar até aqui. Família, mesmo os que não vejo com tanta frequência, e amigos, tanto no âmbito pessoal quanto profissional e mesmo que não tenhamos tanto contato. Não posso deixar de citar certos nomes: Thiago Lima Peixoto Costa, companheiro sempre presente, nas alegrias e nas tristezas, Fatima Izabel Rodrigues, mãe carinhosa, Bruna Rodrigues Guimarães e Helio Joaquim Guimarães Neto, irmã e sobrinho queridos. Também não posso esquecer os que não se encontram mais presentes aqui, mas contribuíram imensamente para o meu sucesso, Helio Joaquim Guimarães, pai sempre presente em minha vida, e minha avó querida Altina Guimarães, além de minha cachorrinha Laila. Quero agradecer também Leonora Pires Costa pela paciência e ter me agüentado todos esses anos, É nós! Aliás, a Yuri Leite e a todos os meus colegas do LaMaB também por terem me aturado, sei que as vezes não é fácil. Não posso esquecer os incontáveis socorros prestados pela Juliana Justino, Rita Gomes Rocha e pela minha “co-orientadora” Ana Carolina Loss Rodrigues. E por último, mas não menos importante, minha Best Kamila Souza Alves, que me acompanhou nessa jornada mestradística.

Preciso agradecer também os pesquisadores que gentilmente me cederam amostras: Pedro Rocha e Candelária Estarvillo/ UFBA, Cláudia Guimarães Costa/ PUC-MG, Alexandre Christorff/ ULBRA-RS e Renta Pardini/ USP. Também deixar o agradecimento à CAPES e FAPES pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

Resumo	I
1. Introdução	01
2. Materiais e métodos	03
2.1 - <i>Amostragem</i>	03
2.2 - <i>Aspectos moleculares</i>	04
2.3 - <i>Aspectos morfológico</i>	05
3. Resultados	05
4. Discussão	08
4.1 - <i>Marcadores moleculares, filogenias e biogeografia</i>	08
4.1.1 - <i>Citocromo b</i>	08
4.1.1 - <i>Irbp e análise concatenada</i>	11
4.2 - <i>Mapeamento morfológico</i>	12
Referências	14
Apêndice	17
Figuras	24
Tabelas	25

Distribuição geográfica da diversidade genética e morfológica de *Marmosa (Micoureus)* (Mammalia, Didelphimorphia) na Mata Atlântica e implicações sistemáticas

Resumo: As cuícas do subgênero *Marmosa (Micoureus)* são marsupiais didelfídeos neotropicais de ampla distribuição na América do Sul, principalmente no Brasil. Esse subgênero sofreu grandes mudanças taxonômicas na última década, sendo que sua espécie com maior distribuição geográfica, *Marmosa (Micoureus) demerarae*, foi dividida em duas espécies: *M. (M.) demerarae* (ocorrendo do oeste amazonense até o sul da Bahia) e *M. (M.) paraguayana* (ocorrendo do norte do Espírito Santo até o Paraguai). O subgênero *Micoureus* é um dos táxons que exhibe uma clara distinção na região do encontro dessas duas espécies, estabelecendo contato nesta região (entre o norte do Espírito Santo e norte de Minas Gerais e sul da Bahia) região esta onde ocorre um processo de intergradação nos espécimes, ou seja, espécimes com assinatura molecular de *M. (M.) demerarae* possuindo caracteres morfológicos de *M. (M.) paraguayana* e vice-versa. Assim, o presente estudo visou investigar a diversidade genética e morfológica de *Marmosa (Micoureus)* tanto na área de contato entre os táxons, quanto em toda extensão da Mata Atlântica, além de tentar esclarecer a confusa taxonomia do grupo. Foram feitas análises genéticas com dois marcadores moleculares *irbp* (nuclear) e *cit b* (mitocondrial) em conjunto com o mapeamento de caracteres morfológicos para tentar elucidar a questão da intergradação das espécies na região de contato. O gene mitocondrial recuperou dois clados monofiléticos atribuídos às duas espécies existentes no bioma. Outros clados com estruturação biogeográfica também foram recuperados. Foi descoberto a presença de um possível pseudogene no espécime LPC 75 que poderia levar à uma má interpretação dos dados, que poderia ser o primeiro registro de simpatria para as duas espécies. O marcador nuclear obteve topologias diferentes, não se mostrando eficiente em recuperar as duas linhagens monofiléticas das espécies e nenhum dos clados mostram alguma relação filogeográfica. A análise concatenada recuperou as duas linhagens da Mata Atlântica, mostrando que o *cit b* desse subgênero é altamente informativo, quando comparado com o gene nuclear utilizado neste trabalho. Analisando a morfologia, descobrimos quatro novos polimorfismos para o caractere diagnóstico “número de pêlos nas escamas da cauda” ainda não descritos na literatura. Plotando os caracteres morfológicos nas filogenias, concluímos que os mesmos caracteres diagnósticos não são confiáveis para a distinção das espécies. A grande variação morfológica e a grande divergência gênica do DNA mitocondrial poderia nos levar a crer que *M. (M.) demerarae* e *M. (M.) paraguayana* tratam-se de uma única espécie. No entanto, a alta divergência genética entre espécimes parapátricos condiz com a distinção entre duas espécies.

Palavras-chave: *Marmosa (Micoureus)*, Mata Atlântica, filogenias multigênicas, morfologia.

1- Introdução

As cuícas do subgênero *Marmosa (Micoureus)* Lesson, 1842 são marsupiais didelfídeos neotropicais de pequeno tamanho, arborícolas e de hábito noturno, com ampla distribuição na América Latina (Charles-Dominique *et al.* 1981; Gardner e Creighton 2008). Habitam desde áreas de florestas úmidas e fechadas (*eg.* Florestas Amazônica e Atlântica), como também áreas mais secas e abertas (*eg.* Cerrado e Caatinga). Atualmente são reconhecidas seis espécies desse subgênero: *M. (M.) alstoni* J. A. Allen, 1990, *M. (M.) constantiae* Thomas, 1904, *M. (M.) demerarae* Thomas, 1905, *M. (M.) paraguayana* Tate, 1931, *M. (M.) phaea* Thomas, 1899 e *M. (M.) regina* Thomas, 1898 (Figura 1), sendo quatro delas encontradas no Brasil. Esse táxon foi alvo de vários estudos taxonômicos durante a última década (*eg.* Voss *et al.* 2009; Dias *et al.* 2010; Gutiérrez *et al.* 2010; De La Sancha *et al.* 2012) e, mesmo assim, ainda há conflito sobre seu *status* taxonômico e sobre a existência de outras espécies ainda não descritas (Costa, 2003; Dias *et al.* 2010). Uma revisão para o subgênero não é feita desde Tate (1933), porém o monofiletismo para o táxon *Marmosa (Micoureus)* e a existência de duas espécies na Mata Atlântica é consensual.

Patton *et al.* (2000), através de um estudo com DNA mitocondrial (mtDNA), apontou dois grupos com divergência gênica média de 10,7%: o primeiro grupo de ocorrência amazônica e o segundo na Mata Atlântica. Patton *et al.* (2000) sugeriram que o clado amazônico fosse associado com *Micoureus demerarae* (*sensu* Gardner, 1993) e o clado da Mata Atlântica como *Micoureus limae* Thomas, 1920, desde que este epíteto específico (correspondente a um espécime proveniente de uma localidade do Ceará) era o mais antigo disponível para uma espécie da Mata Atlântica.

Em outros estudos, Costa (2001) e Patton & Costa (2003) re-analisaram afinidades filogeográficas em *Marmosa (Micoureus)* utilizando o mesmo gene utilizado em Patton *et al.* (2000), porém ampliando a amostragem geográfica anterior, incluindo áreas do Brasil Central e da Mata Atlântica do nordeste. Os resultados encontrados foram parcialmente similares aos de Patton *et al.* (2000). No entanto, os primeiros autores supra citados evidenciaram a existência de dois clados na Mata Atlântica, com espécimes do sudeste diferenciando-se de espécimes do nordeste (que, por sua vez, se agrupavam com espécimes da Amazônia e do Brasil Central) com divergência genética de mais de 10% entre os clados. Costa (2001) argumentou que o epíteto sugerido por Patton *et al.* (2000) – *limae* - com localidade tipo no estado do Ceará, não deveria ser empregado para denominar o grupo da Mata Atlântica do sul,

haja visto que as amostras do nordeste se agruparam com o clado amazônico correspondente à *Micoureus demerarae* (*sensu* Gardner, 1993). Ainda que Costa (2001) reconhecesse *paraguayana* Tate, 1931, com localidade tipo no nordeste do Paraguai, como o nome mais antigo para o grupo do centro sul da América do Sul, a autora não utilizou este epíteto para nomear este grupo, pelo fato dessa localidade tipo situar-se no limite de distribuição entre os grupos amazônicos e da Mata Atlântica do Sul, podendo ser também um sinônimo júnior de *M. demerarae*, de forma análoga à *M. limae*. Portanto, tanto Costa (2001) quanto Patton & Costa (2003) sugeriram o nome *Micoureus travassosi* Miranda-Ribeiro, 1936, com localidade tipo no estado do Rio de Janeiro, para o grupo sul da Mata Atlântica. Brant *et al.* (2003), com base em estudos morfológicos e moleculares, com uma ampla amostragem geográfica, concluiu que a área de contato entre as duas espécies encontravam-se na região de divisa entre os estados da Bahia e Norte de Minas Gerais e Espírito Santo. Essa conclusão obteve respaldo, posteriormente, nos trabalhos de Dias *et al.* (2010) e Neves *et al.* (2011), sem, no entanto, que os limites de distribuição entre as duas espécies fossem bem estabelecidos.

Voss & Jansa (2003) argumentaram que o nome *travassosi* ainda precisava ser propriamente analisado, pois a descrição de Miranda-Ribeiro, 1936 diz que a cauda geralmente é menor do que o comprimento cabeça-cauda, o que não corresponde ao que ocorre para todas as espécies de *Marmosa Micoureus*, onde o comprimento da cauda é significantemente maior que o comprimento cabeça-cauda (Voss & Jansa, 2003; Brant *et al.*, 2003). Ao lançarem dúvidas quanto a alocação genérica do táxon *travassosi* Miranda-Ribeiro, 1936, (ainda que o espécime tipo não tenha sido examinado), Voss & Jansa (2003) sugerem o nome *Micoureus paraguayanus* Tate, 1931, com localidade tipo no nordeste do Paraguai, como o epíteto mais apropriado, desde que a descrição morfológica da espécie por Tate (1933) combinava quase perfeitamente com os espécimes analisados pelos autores. De La Sancha *et al.* (2012), com dados genéticos (*cit b*) de espécimes do Paraguai, obteve uma filogenia que corrobora essa proposição, já que esses espécimes se agruparam com outros espécimes de *Marmosa Micoureus* da Mata Atlântica brasileira.

Recentemente, Voss & Jansa (2009) realocaram todo o gênero *Micoureus* dentro do gênero *Marmosa*, como subgênero, com o intuito de deixar monofilético o clado [*Marmosa* + (“*Marmosa*”*lepid*+*Micoureus*)]. Esse manejo permitiu manter o nome *Micoureus* (que representa um clado monofilético), sem precisar criar outros

nomes, decisão essa corroborada posteriormente por outros autores (De La Sancha *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2010).

Poucos estudos abrangendo a taxonomia e sistemática do grupo utilizam caracteres morfológicos. Brant *et al.* (2003) realizou um estudo, morfológico e morfométrico, com duzentos e vinte e oito espécimes de *Marmosa (Micoureus)* distribuídos em dezesseis estados brasileiros, que corroborou a distinção dos dois clados anteriormente constatados por Patton *et al.* (2000) e Costa (2001) com base em dados moleculares. Mas, além disso, verificou a existência de um processo de intergradação morfológica de espécimes encontrados na região de encontro geográfico dos dois clados (que representavam as espécies *M. demerarae* e *M. paraguayanus*) encontrados na análise molecular. Ou seja, no sudeste brasileiro eram encontrados espécimes com assinatura molecular mitocondrial de uma espécie do subgênero e caracteres morfológicos da espécie irmã e vice-versa. Dado que o marcador molecular até então utilizado era apenas mitocondrial, suscitou-se dúvidas quanto a este processo de intergradação da morfologia. Assim, neste estudo, optou-se pela utilização de um marcador molecular nuclear na tentativa de elucidar a questão.

Portanto, o presente estudo visou investigar a distribuição geográfica da diversidade genética de *Marmosa (Micoureus)* na Mata Atlântica, a congruência dos padrões genéticos inferidos a partir de dois marcadores moleculares (um mitocondrial e outro nuclear) com a variação morfológica registrada para o táxon na mesma área de distribuição e discutir as implicações sistemáticas e biogeográficas dos resultados encontrados.

2- Materiais e Métodos

2.1 - Amostragem – Duas espécies do subgênero *Marmosa (Micoureus)* foram objeto de estudo: *M. (M.) demerarae* e *M. (M.) paraguayana*. O material para análises genéticas e morfológicas, em sua maioria, é proveniente, respectivamente, da Coleção de Tecidos e DNA da UFES e da Coleção de Mamíferos da UFES. Outras amostras foram cedidas pelas seguintes pesquisadores/instituições: Pedro Rocha e Candelária Estarvillo/ UFBA, Cláudia Guimarães Costa/ PUC-MG, Alexandre Christorff/ ULBRA-RS e Renta Pardini/ USP. O material para as análises genéticas foi retirado de amostras de tecidos de fígado, músculo ou orelha crio-preservadas em etanol. No total, obteve-se 107 seqüências para três marcadores moleculares, dois mitocondriais

(citocromo b e a subunidade I do citocromo oxidase) e outro nuclear (interphotoreceptorretinoidbindingprotein), sendo duas destas para grupo externo (VAL 08- *M. murina* e JLP 15435- *M. (M.) regina*). Das 107 sequências, apenas duas representam o marcador mitocondrial citocromo oxidase I. Essa amostragem abrange grande parte da região central Mata Atlântica brasileira, incluindo também algumas amostras isoladas no nordeste e sul do país (Tabela 1 e Figura 2). Para os estudos morfológicos, além dos 228 espécimes já analisados em um estudo prévio (Brant *et al.*, 2003), foram analisados 85 espécimes de *Marmosa (Micoureus)* em preparo de pele e/ou crânio ou em via líquida, totalizando 313 indivíduos.

Os pontos de amostragem de *vouchers* e/ou amostras de tecidos dos espécimes estão plotados e numerados nos mapas confeccionados usando o software Quantum Gis 1.7.1 Wroclaw (Figura 2) e respectivas localidades específicas listadas na Tabela 1 e Apêndice II. Áreas não incluídas dentro dos limites do bioma Mata Atlântica, pertencendo ao bioma cerrado (amostras do Cerrado do estado de Minas Gerais foram incluídas nesse estudo com a finalidade de se entender melhor o processo de intergradação da morfologia em conjunto com as filogenias, mesmo o escopo desse trabalho sendo o bioma Mata Atlântica).

2.2 - Aspectos moleculares – Com intuito de obter sequências parciais dos genes mitocondriais citocromo b (*citb*) e subunidade I da citocromo oxidase (*COI*), e parte do primeiro exono gene nuclear *interphotoreceptorretinoidbindingprotein* (*irbp*), as amostras de tecido foram submetidas ao protocolo de extração de DNA com sal (Medrano *et al.* 1990). O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) para a confirmação da extração e obtenção da concentração da amostra. Todas as amostras foram diluídas para uma concentração padrão de aproximadamente 40ng/μl. Foram amplificados 801 pares de base do *cit b*, 657 pares de base do *COI* e 1200 pares de base do marcador nuclear (*irbp*), através da reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador, com os *primers* MVZ05 e MVZ16, LCO e HCOe os *primers* +IRBP217 e -IRBP1531. Os perfis de amplificação se encontram listados na Tabela 2. O produto da PCR foi purificado com a enzima ExoSap-IT (USB Corporation), com a finalidade de eliminar resíduos da PCR que poderiam inibir o sequenciamento. A reação do sequenciamento foi feita nas duas direções utilizando-se o kit Big Dye v3.1 no sequenciador ABI 310 (ambos da

Applied Biosystems Inc.). Para garantir maior qualidade, foram geradas sequências nas duas direções com os mesmos *primers* citados anteriormente. Em adição, algumas sequências utilizadas neste trabalho foram retiradas do GenBank (Tabela 1).

O programa Geneious versão 5.5.7 criado por Biomatters ([HTTP://www.geneious.com/](http://www.geneious.com/)) foi utilizado para fazer o alinhamento manual das sequências usando o software ClustalW. A relação genética e o padrão de distribuição espacial dos haplótipos foram obtidos a partir da variação nas sequências do DNA, com o auxílio dos programas DnaSP v5 (Librado e Rozas 2009) e NetWork 4.610 de Bandelt e Foster (1999). Redes de haplótipos foram construídas individualmente para cada gene e para dados concatenados através do algoritmo median-joining. Somente sequências com haplótipos únicos foram utilizadas nas análises filogenéticas do gene mitocondrial. Para as análises moleculares, foram utilizadas 53 sequências de *citb*, 2 sequências de *COI*, 40 sequências de *irbp*, na análise concatenada (*cit b + irbp*), foram utilizadas 37 sequências. O programa MEGA 5.0 de Tamura *et al.* (2011) foi usado para calcular as divergências inter e intraespecíficas, usando o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros (k2p) (Kimura, 1980). As filogenias foram inferidas a partir do programa PhyML 3.0, de Guindon *et al.* (2010), usando a plataforma online ATCG Bioinformatics ([HTTP://www.atcg-montpellier.fr](http://www.atcg-montpellier.fr)) para o método de Máxima Verossimilhança (MV) e o programa BEAST v1.7.4 de Drummond e Rambault (2007) para a análise de Inferência Bayesiana (IB). Os modelos de substituição de nucleotídeos para as análises de MV e IB foram obtidos no JModelTest 0.1.1 de Posada (2008). O suporte estatístico dos clados para a MV foi avaliado usando mil replicações de *bootstrap*. Para a inferência das probabilidades posteriores (BPP) da IB foram utilizadas 10 milhões de gerações, com amostragem a cada mil gerações. Também foram descartada 10% da amostragem, o que corresponde a mil árvores.

2.3 - *Aspectos morfológicos* – Os indivíduos foram alocados às espécies visadas no presente estudo de acordo com os caracteres morfológicos diagnósticos sugeridos por Brant *et al.* (2003), sendo estes: comprimento do pelo dorsal, cor da pelagem dorsal e número de pelos nas escamas da cauda (Figura 3). Com intuito de tentar entender o processo de intergradação da morfologia dos espécimes na região de encontro das duas espécies de *Marmosa (Micoureus)* (Norte do Espírito Santo e Sul

da Bahia), os caracteres foram aferidos a olho nu ou com ajuda de uma lupa e o comprimento dos pelos dorsais, a partir da região posterior do corpo, com ajuda de uma régua milimetrada, seguindo as médias das medidas feitas por Brant *et al.* (2003). Esses três caracteres foram analisados em conjunto com a filogenia e também com a distribuição geográfica das amostras, para verificar a congruência e a contribuição dos dados na identificação das espécies. Os espécimes foram ainda classificados de acordo com as classes de idade, segundo Losset *et al.* (2011). São sete classes, sendo classes 1, 2, 3 e 4 jovens, 5 sub-adulto e 6 e 7 adultos, de acordo com o padrão de desgaste dos dentes. Neste estudo só foram utilizados indivíduos das classes 6 e 7.

3- Resultados

As redes de haplótipos geradas no programa Network v4.6.10 (Figura 4) resultaram em: 30 haplótipos distintos, com diversidade haplotípica de 0,9552, para o marcador mitocondrial; 18 haplótipos para o marcador nuclear, com a diversidade haplotípica de 0,8905; e 28 haplótipos na análise concatenada, com a diversidade haplotípica de 0,9830. A lista com todos os haplótipos encontra-se no Apêndice I. A rede de haplótipos de *citb* (Figura 4a) para *M. (M.) demerarae* evidenciou um haplótipo central (H7) pertencente a vários espécimes de localidades diferentes (Porto Seguro, Itacaré, Caravelas e Andaraí) que se dispersou e deu origem a outros haplótipos. Também um outro haplótipo mais divergente (H8), que é associado ao espécime LPC 898 (Alagoas), mais distante geograficamente. Para *M. (M.) paraguayana*, houve estruturação biogeográfica (esses agrupamentos serão descritos posteriormente, pois são análogos aos clados da filogenia do mesmo marcador molecular), ao contrário de *M. (M.) demerarae*. Para a rede de *irbp* (Figuras 4b e 7), houve pouca ou nenhuma estruturação biogeográfica, assim como para a análise concatenada (Figuras 4c e 8).

Os melhores modelos de evolução determinados para cada marcador, foram sumarizados na Tabela 3, os quais foram aplicados para inferir as relações filogenéticas. As duas metodologias empregadas para análises filogenéticas, MV e IB, recuperaram topologias semelhantes. Por isso, serão apresentadas apenas as árvores da IB.

A filogenia da IB recuperada a partir do DNA mitocondrial do *citb*, obteve vários agrupamentos monofiléticos, conseguindo separar as duas espécies da Mata Atlântica, com alto suporte estatístico (7,9%; Figura 5). Para *M. (M.) demerarae*, o espécime LPC 898, do estado de Alagoas, ficou basal ao clado dos espécimes do estado da Bahia, com uma alta divergência gênica, de 2,6% (Figura 5). Para *M. (M.) paraguayana*, muitos clados monofiléticos com estruturação biogeográfica, corroborada pela rede de haplótipos, foram recuperados, todos com alto suporte estatístico (BPP \geq 0,95) (Figuras 5 e 6). Clados descritos por Neves *et al.* (2011), como os clados Norte do Rio Mucuri (NRM) (incluindo espécimes do estado da Bahia), Sul do Rio Doce (SRD) (envolvendo espécimes dos municípios: Guarapari, Viana e Santa Tereza) e Sul do Rio Doce Serrana (SRDS) (abrangendo os municípios de Domingos Martins, Cariacica e Viana), também foram recuperados neste estudo e serão empregados com os mesmos nomes (Figura 6). Outros clados recuperados por esta filogenia foram descritos de acordo com a localização geográfica das amostras. Para o clado de *M. (M.) demerarae* obteve-se dois agrupamentos. O clado NRM e o clado Alagoas (AL) com um único espécime do mesmo estado (Figuras 5 e 6). Para *M. (M.) paraguayana* foi recuperado um grupo, aqui denominado de Centro-Minas Gerais (CMG) abrangendo municípios de Marliéria, Paracatu, Nova Ponte, Casa Branca e Felixlândia. Outro clado, irmão ao CMG, foi nomeado como Centro-Sul (CSUL), que engloba o clado SRDS; além dos municípios já citado para este último (SRDS), também abrange municípios de São Paulo (Cotia, Capão Bonito e Sorocaba), Rio de Janeiro (Parati) e Paraná (Diamante do Norte). De forma análoga, o clado SRD é englobado pelo clado Norte de Minas Gerais-Centro Norte do Espírito Santo (NMG+CNES), envolvendo amostras de municípios do estado do Espírito Santo (Linhares e Conceição da Barra) e de Minas Gerais (São Gonçalo do Rio Preto, Turmalina e Berilo). E, por último, o clado Costa Sul com espécimes de Capão Bonito – SP, Gravataí – RS e Guapimirim – RJ (Figuras 5 e 6).

Dentre as amostras do município de Turmalina foram utilizados dois indivíduos (YL 75 e LPC 75). De acordo com o mtDNA, os dois espécimes são alocados a diferentes clados, relacionando os mesmos a diferentes espécies : YL 75 como *M. (M.) paraguayana*, e LPC 75 *M. (M.) demerarae*, o que configuraria o primeiro registro de simpatria entre as duas espécies (Figuras 9). A amostra LPC 75 recuperava-se de forma basalem relação aos clados NRM e AL, divergindo 4,0% dos

mesmos (separados geograficamente por uma pequena distância) e de 4,1% da amostra YL 75, sendo que AL diverge 2,6% de NRM em uma grande distância geográfica (Figura 5). Todavia, o marcador nuclear (Figura 7) indica que os dois espécimes pertencem à mesma espécie (recuperou-se um clado onde os dois indivíduos se agrupam com uma baixa divergência gênica, embora sem suporte estatístico). Resultado este corroborado pela morfologia, desde que LPC 75 possui claramente uma morfologia de *M. (M.) paraguayana*, (Figura 9) e pela rede de haplótipos (Figura 4b, H3), onde os dois espécimes compartilham o mesmo haplótipo. Objetivando-se uma comparação com outro marcador mitocondrial, foram analisadas sequências de *COI* dos dois espécimes para comparação com as de *cit b*. Os dois espécimes divergem 0,2% de acordo com *COI*, indicando que a sequência de *cit b* de LPC 75 possivelmente se trata de um pseudogene, assim não podendo ser utilizada para as análises filogenéticas, por não apresentar homologia com as outras sequências.

O gene nuclear obteve uma filogenia com topologia diferente (Figura 7), da encontrada para o marcador mitocondrial (Figura 5). O clado mitocondrial de *M. (M.) demerarae*, ficou polifilético de acordo com o gene *irbp*. Porém, apresenta um clado com espécimes da Bahia, aqui denominado de clado Bahia - embora haja espécimes provenientes de outras localidades do estado da Bahia que não estão agrupados com esse clado (LPC 209, LPC 222, NLP 30 e RM 92) - com alto suporte (BPP = 1) (Figura 7). *Micoureus (M.) paraguayana* também mostrou-se polifilético para esse marcador.

A árvore concatenada com os dois genes apresentou topologia semelhante à do gene mitocondrial (Figura 8), onde as duas espécies formam agrupamentos monofiléticos (Dias *et al.*, 2010; De La Sancha *et al.*, 2012; Costa, 2003; Patton *et al.*, 2000).

Dentre os caracteres diagnósticos da morfologia, no presente estudo foram encontrados quatro padrões de pelos em escamas (Figura 10). Um padrão de quatro pelos, com quatro pelos localizados lateralmente à base da escama de aproximadamente mesmo tamanho (Figura 9b); outro de quatro pelos com um pelo central longo, ultrapassando a escama posterior e outros três laterais de menor comprimento (Figura 9c); um padrão com três pelos, sendo um pelo central de maior comprimento que ultrapassa a escama posterior e dois outros laterais de menor

tamanho(Figura 9a); e um com cinco pelos, sendo um central de maior comprimento, ultrapassando a escama posterior e mais dois laterais de cada lado do central de menor comprimento e tamanhos parecidos (Figura 9d).

Analisando os caracteres morfológicos diagnósticos sugeridos por Brant *et al.*(2003), em conjunto com a filogenia de *cit b*(Figura 10), verificou-se que *Marmosa (M.) demerarae* apresenta padrão proposto com três pêlos nas escamas da cauda (sempre presente em todos os espécimes examinados), e pelagem dorsal de cor marrom ou amarronzada, mas com variação considerável no comprimento de pelagem. Já *M. (M.) paraguayana* não apresenta nenhum padrão quanto aos pelos de escamas da cauda, apesar de possuir pelagem predominantemente cinza ou acinzentada e comprimento longo de pelos.

4- Discussão

4.1 – Marcadores moleculares, filogenias e biogeografia

4.1.1 – Citocromo b e biogeografia

O marcador mitocondrial do citocromo b foi eficiente em recuperar os dois clados de *M. (Micoureus)*, como já descritos por outros autores (Patton *et al.*, 2000; Costa, 2003; Dias *et al.* 2010; De La Sancha *et al.* 2012), com alto valor de BPP (≥ 95) e uma divergência interespecífica de 7,9% entre as duas espécies da Mata Atlântica (Figura 5). Esse marcador é amplamente utilizado com alto sucesso em construir filogenias inter e intraespecíficas para diversos grupos de pequenos mamíferos (Loss & Leite, 2011; Voss & Jansa, 2009). Por possuir uma alta taxa de mutação (quando comparado com genes nucleares), padrão de herança materna, haploidia e não sofrer recombinação gênica (Avise, 1998), esse gene mostra uma alta resolução, mesmo em nível de espécie.

No caso do espécime LPC 75, coletado na Estação Ecológica de Acauã no município de Turmalina, próximo a zona de contato das duas espécies (localidade número 17, Figura 2 e Tabela 1), há a peculiaridade do possível pseudogene. Alguns estudos reportam erros com as análises e interpretações filogenéticas devido à co-amplificação, através da PCR, de cópias nucleares do mtDNA (paráloga) conhecidas

como *Numts* (Smith *et al.*, 1992; Cracraft *et al.*, 1998). Essas seqüências são material genético mitocondrial que foi transferido e integrado ao genoma nuclear como material não-codificante, por isso sem relação de ancestralidade (Bensasson *et al.*, 2001) (já que o DNA nuclear está sob efeito de taxas de mutação mais lentas que o mtDNA). Vários outros casos de *Numts* são relatados pra diversos grupos de mamíferos placentários (*e.g.* Zhang *et al.*, 2006; Triantand De Woody, 2008). Lemos *et al.* (2009) reportam várias seqüências de *Numts* em outros marsupiais didelfídeos, sugerindo que a entrada de mtDNA no genoma nuclear ocorreu em mais de um evento para o gênero *Didelphis*. As únicas diferenças encontradas nas seqüências do espécime LPC 75 foram nos pares de base 355, 356 e 357. Não houve mudança no aminoácido codificado (lisina) e não foi encontrado códon de parada. Embora *Numts* sejam amplamente relatados, alguns casos de mtDNA altamente conservados, às vezes mal interpretados como *Numts* (Rocha *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006) são encontrados. Ainda que haja fortes indícios de que a seqüência de *citb* do espécime LPC 75 seja um pseudogene, outros procedimentos, como clonagem *in vitro*, são necessários para se obter a confirmação.

Na topologia de *M. (M.) demerarae*, um espécime proveniente de Alagoas foi recuperado de forma basal, em relação ao clado NRM, LPC 898, (com uma divergência gênica de 2,6% do NRM) (Figuras 5 e 6). Isso pode ser explicado pelo isolamento geográfico entre populações de *M. (M.) demerarae*. A população da qual esse espécime foi proveniente está mais afastada geograficamente das populações dos espécimes que formam o clado NRM, no estado da Bahia, o que pode levar a uma maior diversificação das suas moléculas de mtDNA. Ou, alternativamente, pode ser um artefato de técnica da coleta, devido a um hiato geográfico. O espécime mais ao norte da Bahia (MCNM 2214) fica distante mais de 600 km do espécime do estado de Alagoas. Novas coletas nesse hiato devem ser realizadas no nordeste a fim de tentar esclarecer melhor as relações filogenéticas intraespecíficas e o conhecimento sobre a diversidade desse subgênero nessa região tão pouco estudada. Igualmente, a adição de novas amostras de outros biomas como a Floresta Amazônica, Chaco, Caatinga pode ajudar a elucidar essa alta divergência. Rocha *et al.* (2011), utilizando a mesma amostra (LPC 898), em uma filogenia mais abrangente com outras espécies do subgênero, mostrou que este espécime é mais próximo filogeneticamente do clado com amostras da Amazônia do que o clado com amostra da Bahia, resultado

semelhante encontrado por Costa (2003). Por (1992) descreveu rotas de migração entre Mata Atlântica e Amazônia. Costa (2003) indicou para *M. (M.) demerarae* uma rota que ligava o nordeste ao sudeste amazonense, o que poderia explicar esse agrupamento. Outra possível explicação seria a teoria de rios como barreira. O Rio São Francisco separa os dois clados (AL e NRM), sendo uma bacia grande, potencialmente capaz de atuar como uma barreira física para a interrupção de troca de fluxo gênico entre essas populações.

Neves *et al.* (2011) indicou o rio Mucuri como limite distribucional entre as duas espécies do subgênero na Mata Atlântica. Entretanto, com a maior amostragem deste estudo, pode-se concluir que esse rio não é limite para as duas espécies, servindo como barreira apenas no Corredor Central da Mata Atlântica (CCMA) (Figura 6). Isto porque a distribuição das duas espécies se estendem para o interior do país e mais zonas de contato devem existir para áreas do Brasil Central, assim como a zona de contato encontrada no CCMA. Outros rios podem influenciar localmente as populações das duas espécies, assim como o rio Mucuri no CCMA (Neves *et al.*, 2011). Dias *et al.* (2010), por exemplo, destaca o rio Jequitinhonha como barreira para populações do norte de Minas Gerais, o que não é corroborado pelos dados aqui apresentados, pois observando o mapa da Figura 6, notamos que este rio separa apenas populações de *M. (M.) demerarae* da Bahia, não servindo de barreira para as duas espécies.

Também se observou um aumento da área da distribuição conhecida para *M. (M.) paraguayana*, de acordo com o mapa de localidades marginais apresentado por Gardner e Creighton (2008), com expansão para o noroeste e norte de Minas Gerais (localidades 17, 18 e 23; Figura 2). *Marmosa (M.) paraguayana* ocorre no município de Paracatu (noroeste do estado de Minas Gerais, próximo à divisa com Goiás), área pertencente ao bioma Cerrado, mostrando que, assim como *M. (M.) demerarae*, a espécie pode ocorrer mais comumente do que se acredita em enclaves úmidos e matas de galeria neste bioma. De fato, outros registros para *M. (M.) demerarae* já foram observados no Cerrado, (Rocha *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2003), assim como para outra espécie do subgênero e *M. (M.) constantiae* ao sul da distribuição (De La Sancha *et al.*, 2012). Na análise filogenética, as amostras provenientes do Cerrado não se agruparam à exclusão de amostras da Mata Atlântica. O clado CMG reúne espécimes

da Floresta Atlântica e do Cerrado, por exemplo, assim como encontrado por Dias *et al.*(2010), e amostras de outras localidades do Cerrado, como Turmalina (17), São Gonçalo do Rio Preto (20) e Berilo (23) estão mais proximamente associadas à amostras de localidades da Mata Atlântica do que com as demais do Cerrado presentes nas análises (Figuras 2 e 6). Para *M. (M.) demerarae*, outros autores observaram que o clado da Floresta Atlântica é mais relacionado com o Cerrado do que com a Floresta Amazônica (Costa, 2003; Dias *et al.* 2010; De La Sancha *et al.* 2012). O acima descrito, ressalta a importância dessas áreas úmidas de Cerrado, ainda tão pouco inventariadas e estudadas, na história evolutiva dos mamíferos ditos como de Mata Atlântica ou Amazônicos.

Outra hipótese que poderia explicar a atual distribuição do subgênero no bioma Mata Atlântica seria a dos refúgios pleistocênicos. Carnaval & Moritz (2008), através de modelos paleoclimáticos, sugerem a existência de refúgios, ou áreas de estabilidade, na Floresta Atlântica durante os períodos de glaciações pleistocênicas quando houve grandes retrações de áreas florestadas. Essa hipótese, que poderia explicar o elevado número de endemismo de diversos táxons –aves, lagartos e preguiças (Cabanne *et al.*, 2007; Pellegrino *et al.*, 2005; Moraes-Barros *et al.*, 2006)- para essas áreas, prevê a ocorrência de dois grandes refúgios acima do rio Doce: refúgio da Bahia e acima do rio São Francisco: em Pernambuco. A existência desses refúgios poderia explicar os dois clados encontrados para *M. (M.) demerarae* no nordeste da MA: NRM e AL (estados da Bahia e Pernambuco respectivamente; Figura 6). Isso pode indicar que as glaciações do pleistoceno foram importantes eventos vicariantes para separação das duas linhagens de *Marmosa (Micoureus)* neste bioma. Rocha *et al.* (2011), afirma ainda que a separação do cladode *Marmosa (Micoureus)* se deu no pleistoceno, corroborando esta hipótese.

Além desses fatores, outra variável a ser considerada são as ecorregiões nas quais os clados de *Marmosa (Micoureus)* se encontram. Os clados NRM e AL de *M. (M.) demerarae* se enquadram em ecorregiões com fitofisionomias bem distintas na Mata Atlântica (Figura 6). O Clado NRM, se encontra na ecorregião Floresta Costeira da Bahia, enquanto que o espécime LPC 898 (Clado AL) se encontra na ecorregião Floresta Costeira de Pernambuco (WWF, 2012). Para os clados de *M. (M.) paraguayana* não houve o mesmo padrão; ou seja, nenhum dos clados se enquadrou

dentro de apenas uma ecorregião, mostrando que este táxon está bem adaptado a diferentes tipos de vegetação e clima, já que também possui uma distribuição com uma variação latitudinal maior que *M. (M.) demerarae*, que por sua vez possui uma distribuição com variação longitudinal maior (Figura 1).

4.1.2 – *Irbp* e análise concatenada

A filogenia do gene nuclear recuperou topologias completamente diferentes das do mtDNA, com clados apicais sem nenhuma estruturação biogeográfica, não recuperando, portanto, os dois clados mitocondriais que assinalam a divergência entre as duas espécies descritas (Figura 6). Loss & Leite (2011) também não obtiveram sucesso ao empregar esse marcador para inferir filogenias de roedores equimídeos, devido a uma baixa taxa de divergência nucleotídica desse gene. Outros estudos também reportam uma incongruência entre o mtDNA e outros marcadores moleculares nucleares (eg. Martins *et al.*, 2009), alegando também uma diferente taxa de mutação, padrões diferentes de segregação, regulação da transcrição e mecanismos de reparo.

Para a análise concatenada foi encontrado resultado similar ao do marcador mitocondrial *cit b*, recuperando clados monofiléticos de *M. (M.) demerarae* e *M. (M.) paraguayna*. Isso indica que o mtDNA de *M. (Micoureus)* é altamente divergente, quando comparado com *irbp*, a ponto de conseguir recuperar a monofilia de grupos mesmo com uma matriz de caractere menor que a do gene nuclear, como encontrado por Loss & Leite (2011) em suas análises. Outros clados também recuperados pela filogenia do gene mitocondrial se mostraram presentes na análise concatenada (Figuras 5 e 8), com alta BPP, como por exemplo os clados Centro Minas Gerais (CMG) e Sul do Rio Doce (SRD).

Em análises prévias do marcador *cit b*, o espécime de Turmalina (LPC 75) havia se agrupado com o clado de *M. (M.) demerarae*, enquanto que na análise com genes concatenados o mesmo espécime se agrupava com a outra espécie irmã (Figura 9). Isso mostra a importância da utilização deste tipo de análise (concatenada) a fim de uma abordagem mais robusta e, conseqüentemente, menor probabilidade de erros. De fato, Loss & Leite (2011) só conseguiram resolver politomias basais de roedores

equimídios com a análise de genes concatenados, evidenciando a maior robustez de uma matriz de dados maior.

4.2 – Mapeamento morfológico –

Analisando os caracteres morfológicos diagnósticos em conjunto com a filogenia obtida do marcador mitocondrial (Figura 11) podemos tirar algumas conclusões. Os únicos caracteres que apresentaram um padrão foram: a coloração dos pelos dorsais e número de pelos nas escamas da cauda, para *M. (M.) demerarae*, que possuem a cor mais amarronzada e três pelos nas escamas. Para a espécie da Região Nordeste da Mata Atlântica, o comprimento do pelo não apresentou padrão esperado para *M. (M.) demerarae*, segundo Brant *et al.* (2003), pois espécimes distantes geograficamente da região de encontro com *M. (M.) paraguayana* (NLP 30 em Nilo Peçanha, por exemplo), onde não se esperaria a intergradação dos caracteres morfológicos, possuem pelos do dorso com comprimento longo (uma característica de *M. (M.) paraguayana*. Para *M. (M.) paraguayana* o caractere mais confiável foi o comprimento do pelo dorsal, com exceção de alguns espécimes (MCNU 215 e MAM 47, por exemplo). Assim, vale notar que *M. (M.) paraguayana*, antes considerada uma espécie tipicamente de floresta de latitudes mais baixas, ou seja, com temperaturas mais amenas ou sazonalidade menor, quando comparada com *M. (M.) demerarae*, possui, em média, pelos dorsais mais longos –Figura 3a– (Brant *et al.*, 2003). Miranda-Ribeiro (1936) fazendo a descrição de um espécime coletado em Angra dos Reis-RJ relata: “pelo muito mais longo (forma de montanha?)”. Esse caractere carece de mais pesquisas, para verificar se essa associação entre clima mais frio e tamanho da pelagem dorsal maior está correta para este grupo. A coloração da pelagem dorsal também se mostrou, em sua maioria, como o esperado (Brant *et al.*, 2003; Voss&Jansa, 2003; De La Sancha *et al.* 2012) para a espécie da Mata Atlântica do sudeste (cor acinzentada). O caractere mais polimórfico e, portanto menos confiável foi o número de pelos nas escamas, não obtendo um padrão para esta espécie.

Tate (1933) descreveu um padrão de pelos das escamas da cauda para o grupo *Marmosa cinerea*, como também para outros grupos de marsupiais didelfídeos, que inclui *Micoureus demerarae* (*sensu* Gardner, 1993). Segundo Tate (1933), o grupo possuía escamas com três pelos, um central e dois laterais a esse de aproximadamente o mesmo tamanho (Figura 3c), sendo esta uma das únicas descrições para o caractere

publicada e amplamente utilizada por diversos autores (Voss & Jansa, 2009; Brant *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2010). Brant *et al.* (2003) relatou um novo padrão de cinco pelos, três centrais de longo comprimento (ultrapassando a próxima escama) e dois laterais a esses (Figura 3d), que atribuiu à *M. (M.) paraguayana*, enquanto o arranjo com apenas três pelos foi relegado à *M. (M.) demerarae*. No presente estudo foram apresentados mais quatro polimorfismos para o caractere pelos nas escamas da cauda (Figura 9). Todos arranjos com mais de três pelos por escama são atribuídos à *M. (M.) paraguayana*. A descoberta de novos padrões para estas espécies é de grande relevância para o campo da sistemática do grupo, uma vez que este caractere é amplamente utilizado em análises, porém difícil de observar e, por isso, pouco discutido. Nenhuma referência foi encontrada na literatura para quatro ou cinco pelos nas escamas da cauda para o gênero *Marmosa*. Segundo Voss & Jansa (2009), em um estudo com todos marsupiais didelfídeos, apenas *Lutreolina* e *Philander* possuem quatro ou mais pelos nas escamas da cauda.

Outros caracteres observados por Brant *et al.* (2003) também apresentaram diferenças entre as duas espécies analisadas neste trabalho, além dos outros três caracteres diagnósticos já discutidos. São elas: coloração da cauda e quatro medidas cranianas (largura da caixa craniana, comprimento da série molar superior, distância transversal entre molares e largura mínima ao nível do pterigóide), embora não tenham obtido significância estatística. Todos os caracteres analisados por Brant *et al.* (2003) que mostraram diferenças entre as espécies apresentaram exceções.

Concluimos que os caracteres diagnósticos apontados por Brant *et al.* (2003), mesmo utilizados em conjunto, não são suficientes para o reconhecimento das espécies de forma segura, se fazendo necessária a utilização da genética para um resultado mais embasado. Principalmente de espécimes na região de encontro de *M. (M.) demerarae* e *M. (M.) paraguayana* na divisa entre o norte do Espírito Santo, sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais.

M. (M.) demerarae e *M. (M.) paraguayana* apresentam considerável variação morfológica intraespecífica e ocorrem em ampla área geográfica de gradiente latitudinal e longitudinal consideráveis. O gene nuclear utilizado não apresentou resolução para a separação entre amostras das duas espécies. Assim, poderia-se supor que as mesmas representassem uma única espécie com um valor de divergência

gênica mitocondrial alta (8% em média) entre clados regionais, como observado para outros táxons irmãos de *Marmosa (Micoureus)* (eg. *Gracilinanus* em Losset *al.* 2011). Entretanto, o registro de parapatria (Nova Viçosa, localidade número 10, e Conceição da Barra, localidade número 25, separadas por cerca de 100 km) para dois clados tão divergentes, e o fato de que o clado do nordeste de *M.(M.) demerarae* é mais proximamente relacionado a clados da Amazônia, sugere que os dois agrupamentos monofiléticos encontrados na Mata Atlântica representem realmente duas espécies distintas.

Referências

AVISE, J. C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 371-379, 1998.

BANDELT H-J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *MolBiolEvol.*, v.16, n. 1, p. 37-48, jan.1999.

BATES, J. M.; HACKETT, S. J. & CRACRAFT, J. Area-relationships in the neotropical lowlands: a hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *JournalofBiogeography*, v. 25, n. 4, p. 783-793, jul. 1998.

BRANT, F. C.; COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R. Variações morfológicas na pelagem e no crânio da cuíca *Micoureusdemerarae* (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE) suas implicações sistemáticas. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA*, 2., 2003, Belo Horizonte. **Resumo...**Belo Horizonte, UFMG, 2003. p 283-284.

BENSASSON, D.; ZHANG, D. X.; HARD, D. L.; HEWITT, G. M. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *TrendsEcolEvol*, v. 16, p. 314-321, 2001.

CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R. & MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchusfuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recente

demographic expansion in Southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 73-84, mai. 2007.

CALDARA, V. JR. **Identidade taxonômica e variação geográfica dos ouriços-cacheiros do leste do Brasil (Mammalia: Erethizontidae: *Sphiggurus*)**. 2008. 68f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

CARNAVAL, A. C. O. Q. & MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1-15, jul. 2008.

CARNAVAL, A. C. O. Q. *et al.* Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785-789, fev. 2009.

CHARLES-DOMINIQUE, P., ATRAMENTOWICZ, M., GERARD, H. *et al.* Les mammifères frugivores arboricoles nocturnes d'une forêt guyanaise: inter-relations plantes-animaux. **Revue d'Ecologie Terre et La Vie** v.35, n. 1, p. 341-345. fev 1981.

COSTA, L. P. *et al.* Biogeography of South American Forest Mammals: Endemism and Diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 872-881, dez. 2000.

COSTA, L. P. **Phylogeography Studies on Neotropical Small Mammals**. Tese (PHD in Integrative Biology) Graduate division of the University of California, Berkeley, 2001

COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, n. 1, p. 71-86, jan. 2003.

CRACRAFT, J.; FEINSTEIN, J.; VAUGHN, J.; HELM-BYCHOWSKY, K. Sorting out tigers (*Panthera tigris*): Mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics. **AnimConserv**, v. 1, p. 139-150, 1998.

DE LA SANCHA, N.U., *et al.* Systematic of the subgenus of mouse opossums *Marmosa*(*Micoureus*) (Didelphimorphia, Didelphidae) with noteworthy records from Paraguay. **Mammalian Biology**, v. 77, n. 4, p. 229-236, jul. 2012.

DIAS, I. M. G. *et al.* Delineating geographic boundaries of the woolly mouse opossums, *Micoureus demerarae* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae). **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1579-1585, jul. 2010.

DRUMMOND, A. J., RAMBAUT, A. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees". **BMC Evol. Biol**, v. 7, n. 1, p. 214, nov. 2007

ESTEEVES, T. E. *et al.* Genetic analyses reveal hybridization but no hybrid swarm in one of the world's rarest birds. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 23, p. 5090-5100, nov. 2010.

GARDNER, A. L. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D. E., REEDER, D. M. (Eds.). **Mammals Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 2. Ed. Washington and London: Smithsonian Institution Press., 1993. p. 15-23.

GARDNER, A.L. Order Didelphimorphia. In: WILSON, D.E., REEDER, D.M. (Eds.). **Mammals Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005. p. 3-18.

GARDNER, A.L., CREIGHTON, G.K. Genus *Marmosa* Lesson, 1842. In: GARDNER, A.L. (Ed.). **Mammals of South America**. 2. ed. University of Chicago Press, Chicago, 2008. p. 74-82.

GUIDON, S.; DUFAYARD, J-F.; LEFORT, V.; ANISOMOVA, M.; HORDUK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and Methods to estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0 **Systematic Biology**, v. 59, n. 4, p. 307-321, mar. 2010.

GUTIÉRREZ, E. E.; JANSA, S. A.; VOSS, R. S. Molecular Systematics of Mouse

Opossums (Didelohidae: Marmosa): Assessing Species Limits using Mitochondrial DNA Sequences, with Comments on Phylogenetic Relationships and Biogeography. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 3692, n. 22, p. 1-22, jun. 2010.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological Identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B. Biological Sciences*, v. 270, p. 313-321, 2003.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Note**, v. 17, p. 754-755, nov. 2001.

JANSA, S. A.; FORSMAN, J. F.; VOSS, R. S. Different patterns of selection on the nuclear genes IRBP and DMP-1 affect the efficiency but not the outcome of phylogeny estimation for didelphid marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, n. 23, p. 363-380, jul. 2006.

KIMURA, M. A single method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, v.16, p. 111-120, 1980

LEITE, Y. L. R. Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats, genus *Phyllomys* (Rodentia. Echimyidae), with Description of Two New Species. **University of California Publications in Zoology**, v. 132, p. 1-118, 2003.

LEMOS, B.; CANAVEZ, F.; MOREIRA, M. A. M. Mitochondrial DNA-like sequences in the nuclear genome of the opossum genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae). **J Hered**, v. 90, p. 543-547, 1999.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** v. 25, n. 11, p. 1451-1452, apr. 2009.

LOSS, S. *et al.* Geographic variation, phylogeny and systematic status of *Gracilinanus microtarsus* (Mammalia: Didelphimorphia: Didelphidae). *Zootaxa*, v.

2761, p. 1-33, 2011.

LOSS, A. C. & LEITE, Y. L. R. Evolutionary diversification of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 6, p. 1352-1366, 2011.

MARTINS, F. M.; TEMPLETON, A. R.; PAVAN, A. C. O.; KOHLBACH, B. C.; MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p.294, dec. 2009.

MEDRANO, J. F.; AASEN, E. & SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red-blood cells. **Biotechniques**, v. 8, p. 43, feb. 1990.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Didelphia ou Mammalia-Ovovivipara: Marsupiales, Didelphos, Pedimanos ou Metatherios. *Revista do Museu Paulista*, v. 20, p. 245-427, 1936.

MORAES-BARROS, N. *et al.* Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). **Genética**, v. 126, p. 189-198, jan. 2006.

MORITZ, C. & FAITH, D.P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 419-429, 1998.

NEVES, A. S. **Investigação sobre uma zona de sutura no corredor central da mata atlântica a partir da filogeografia de pequenos mamíferos.** 2011. 123 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F. da; MALCOM, J. R. Mammals of the Rio Juruá

and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 244, p. 1-36, 2000.

PATTON, J. L. & COSTA, L. P. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: JONES, M.; DICKMAN, C.; ARCHER, M. (Eds.). **Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials**. 1 Ed. CSIRO publishing, Collingwood, 2003, p. 63-81.

PELLEGRINO, K. C. M. *et al.* Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p.13–26, 2005.

POR, F. D. Sooretama, the Atlantic rain forest of Brazil. **SPB Academic Publishing, The Hague**, p. 130, 1992.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

ROCHA, R. G. *et al.* **Diversificação Evolutiva no Brasil Central: onde a Amazônia e o Cerrado se encontram**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

ROCHA, R. G.; LEITE, Y. L. R.; FERREIRA, E.; JUSTINO, J.; COSTA, L. P. Highly conserved d-loop sequences in woolly mouse opossums *Marmosa* (Micoeureus). **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 2, p. 77-83, apr. 2012.

ROSSI, R. V.; VOSS, R. S.; LUNDE, D. P. A revision of the Didelphid marsupial genus *Marmosa*: part 1. The species in Tate's 'mexicana' and 'mitis' sections and other closely related forms. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 334, p. 1-83, jun. 2003.

SMITH, M. F.; THOMAS, W. K.; PATTON, J. L. Mitochondrial DNA-like

sequences in the nuclear genome of an akodontine rodent. **MolBiolEvol**, v. 9, p. 204-215, 1992.

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

STANHOPE, M. J.; CZELUSNIAK, J.; ST, S. J.; NICKERSON, J.; GOODMAN, M. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 1, p.148-160, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; AND KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TATE, G. H. H. A Systematic Revision of the Genus *Marmosa*. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 66, n. 1, p. 53-70, Aug. 1933.

TCHAICKA, L. *et al.* Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cercdocyon thous*). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 819–838, 2007.

TRIAN, D. A.; DE WOODY, J. A. Molecular analyses of mitochondrial pseudogenes within the nuclear genome of arvicoline rodents. **Genetica**, v. 32, n. 1, p. 21-33, 2008.

VOSS, R. S. & JANSA, S. A. Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Non molecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 76, p. 1-82. 2003.

VOSS, R. S. & JANSA, S. A. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, and extant radiation of New World methatherian mammals. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** v. 322, p. 1-177, jun. 2009.

WWF Brasil. Fundo mundial da Natureza. Disponível em <http://www.wwf.org.br> Acesso em Dezembro de 2012.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends EcolEvol**, v. 11, p. 247-251, 1996.

ZHANG, D. X.; ZHANG, Z.; SHEN, F.; HOU, R.; LV, X.; BISONG, Y. Highly conserved d-loop-like nuclear mitochondrial sequences (Numts) in tiger (*Panthera tigris*). **J Genet**, v. 85, p. 107-116, 2006.

Apêndice I

Haplótipos do marcador mitocondrial (*citb*):

Haplótipo1: [SLF291,YL449,SLF162,SLF169,MBML2309, LPC1189]; Haplótipo2: [JEQ01,YL75, TAX 01, LPC61]; Haplótipo3: [LPC1286, LPC1288]; Haplótipo4: [MCNM 2214,MCNM 2224]; Haplótipo5: [RM 120,RM 116]; Haplótipo6: [SLF76,SLF96,SLF91]; Haplótipo7: [SLF64,SLF66,SLF70,SLF71, LPC209, LPC222,RM 109,RM 219,SLF22]; Haplótipo 8: [LPC 898]; Haplótipo 9: [CAM 50]; Haplótipo 10: [RM 198]; Haplótipo 11: [RM 108, RM 92]; Haplótipo 12: [NLP 30]; Haplótipo 13: [CRB 1287]; Haplótipo 14 [CB 01, YL 81, LPC 86]; Haplótipo 15: [MCNM 1985]; Haplótipo 16: [RP 717, MAM 27, RP 787, RP 136]; Haplótipo 17: [CTX 2930]; Haplótipo 18: [LPC 1046]; Haplótipo 19: [MBML 2505]; Haplótipo 20: [LPC 1006, LPC 986]; Haplótipo 21: [MBML 2370]; Haplótipo 22: [LPC 975]; Haplótipo 23: [MCNU 215]; Haplótipo 24: [LPC 326]; Haplótipo 25: [LPC 792]; Haplótipo 26: [AP 23]; Haplótipo 27: [MAM 47]; Haplótipo 28: [YL39]; Haplótipo 29: [LP 47]; Haplótipo 30: [LPC 106].

Haplótipos do marcador nuclear (IRBP):

Haplótipo 1: [MCNM 1985]; Haplótipo 2: [LPC 61]; Haplótipo 3: [LPC 75, YL 449, LPC 1286, RP 471, RP 717, YL 75, LPC 1185, SLF 291, TAX 01, MAM 47]; Haplótipo 4: [YL 445]; Haplótipo 5: [LPC 326, YL 81]; Haplótipo 6: [LPC 1046]; Haplótipo 7: [LPC 1006, LPC 975, LPC 986, SLF 169, LPC 86]; Haplótipo 8: [RP 353]; Haplótipo9: [RP 787]; Haplótipo 10: [RP 136]; Haplótipo 11: [NLP 30]; Haplótipo 12: [RM 92, SLF 96,SLF 91, SLF 66, SLF 22, SLF 64, SLF 70]; Haplótipo 13: [SLF 162]; Haplótipo 14: [SLF 76]; Haplótipo 15: [LPC 1189]; Haplótipo 16: [LPC 1288]; Haplótipo 17: [LPC 209]; Haplótipo 18: [LPC 222].

Haplótipos dos marcadores nuclear e mitocondrial (genes concatenados):

Haplótipo1: [LPC 209]; Haplótipo 2: [LPC 222]; Haplótipo 3: [SLF 96, SLF 91]; Haplótipo 4: [LPC 1185 YL 449, SLF 291]; Haplótipo 5: [MCNM 1985]; Haplótipo 6: [RP 136]; Haplótipo7: [LPC 61]; Haplótipo 8: [LPC 326]; Haplótipo 9: [YL 445]; Haplótipo 10: [SLF 70, SLF 66, SLF 22]; Haplótipo 11: [LPC 975]; Haplótipo 12: [LPC 1046]; Haplótipo 13: [LPC 1006, LPC 986]; Haplótipo14: [LPC1286]; Haplótipo15: [LPC 86]; Haplótipo16: [MAM 47]; Haplótipo17: [SLF 169];Haplótipo18: [TAX 01,YL75]; Haplótipo19: [LPC1189];Haplótipo20: [RP 717]; Haplótipo21: [SLF162]; Haplótipo22: [YL81]; Haplótipo23: [SLF76]; Haplótipo24: [NLP30]; Haplótipo25: [RP787];Haplótipo26: [LPC1288].

Apêndice II

Espécimes utilizados e localidades:

BRASIL – Alagoas: São José da Laje, Usina de Serra Grande Mata do Brejo (LPC 898 – 8°57'20"S/36°3'56"W). Amazonas: Nova Empresa, margem esquerda Rio Júrua (JLP 15435 – 6° 48'S/70° 43' 59"W). **Bahia:** Andaraí, Fazenda Santa Rita, 8 km (LPC 209, LPC 222 – 12°48'6"S/41°15'41"); Camamu (CAM 50); Caravelas, Fazenda Espada Ilha, Ilha da Cassumba (SLF 70); Caravelas, Fazenda Monte Castelo (SLF 64, SLF 66 – 17°47'40"S/39°15'50"W); Itacaré, Fazenda Rio Capitão (RM 108, RM 109 – 14°20'37"S/39°5'13"W); Itamari, Fazenda São Roque (RM198 – 13°51'54"S/39°40'22"W); Nova Viçosa, Fazenda Elma (SLF 22, SLF 96 – 17°58'32"S/39°33'53"); Nova Viçosa, Fazenda João Guardo (SLF 76 – 17°58'44"S/39°34'2"W); Nova Viçosa, Fazenda Tucum (SLF 91 – 17°58'29"S/39°33'45"W); Porto Seguro, Parque Nacional do Pau Brasil (RM 219 – 16°30'44"S/39°18'13"W); Salvador (MCNM 2214, MCNM 2224); Una, Fazenda

Bolandeira, 1 kmS (LPC 106 – 15°21'S/39°0'W); Una, Reserva Biológica de Uma (RM 92 – 15°10'19"S/39°3'40"W); Uruçuca, Fazenda Catitu (RM 120 – 14°25'27"S/39°3'38"W); Valença (VAL 08). **Espírito Santo:** Cariacica, Reserva Biológica de Duas Bocas, Alto Alegre (LPC 1006, LPC 1046 – 20°16'52"S/40°31'19"W); Conceição da Barra, Floresta Nacional do Rio Preto (LPC 1286, LPC 1288 - 18°21'19"S/39°50'39"W); Domingos Martins, Pedra Azul, Hidrelétrica São Pedro (MBML 2505 – 20°21'48"S/40°39'33"); Guarapari (MBML 2309 – 20°40'S/40°29'51"); Linhares, Fazenda Bom Conselho (MBML 2370 – 19°23'28"S/40°4'20"W); Linhares, Reserva Natural da Vale do Rio Doce (TAX 01 – 19°6'42"S/40°10'16"W); Linhares, Fazenda Santa Terezinha, 33 km NE (YL 39 – 19°8'S/39°57'W); Santa Tereza, Estação Biológica Santa Lúcia (YL 445, YL 449 – 19°58'10"S/40°32'24"W); Viana, Caracas (SLF 291); Viana, Fazenda Boa Baixa (SLF 162, SLF 169 – 20°23'S/40°27'W); Viana, Pimenta (LPC 975, LPC 986 – 20°22'44"S/40°28'5"W); Viana, Ribeira (LPC 1185, LPC 1189 – 20°22'35"S/40°27'30"W). **Minas Gerais:** Berilo, Usina Hidrelétrica de Irapé (JEQ 01); Casa Branca, Rola Moça (CB 01); Felixlândia, Fazenda Santa Cruz (AP 23 – 18°46'14"S/45°8'34"W); Marliéria, Parque Estadual do Rio Doce, 13 km E (LPC 86, YL 81 – 19°43'S/42°39'W); Nova Ponte, Fazenda Capão da Onça, 11 km E (LPC 326 – 19°9'5"S/47°33'45"W); Paracatu, Usina Batalha (MCNM 1985); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Doce, 15 km S (18°9'S/43°23'W); Turmalina, Estação Ecológica de Acauã, 17 km N (LPC 75, YL 75 – 17°8'S/42°46'W). **Paraná:** Diamante do Norte (CTX 2930 – 22°37'S/52°51'W). **Rio de Janeiro:** Guapimirim, Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CRB 1287); Parati, Tarituba (LP 47 – 23°13'S/44°42'W). **Rio Grande do Sul:** Gravataí, Morro Agudo (MCNU 215). **São Paulo:** Capão Bonito, Fazenda Intervalles (MAM 27, MAM 47 – 24°19'59"S/48°25'W); Capão Bonito, Fazendo Sakamoto (RP 136 – 24°10'44,7"S/48°14'17"W); Cotia, Big Vale (RP 717 – 23°47'4"S/47°0'19,2"W); Cotia, Chave (RP 471 – 23°42'51"S/47°W); Cotia, Psicótica (RP 787 – 23°41'45"S/46°57'16"W); Cotia, Ruth (RP 353 – 23°40'43"S/46°59'13"W); Sorocaba, Floresta Nacional de Ipanema 20 km NW (LPC 792 – 23°26'7"S/47°37'41"W).

Figuras

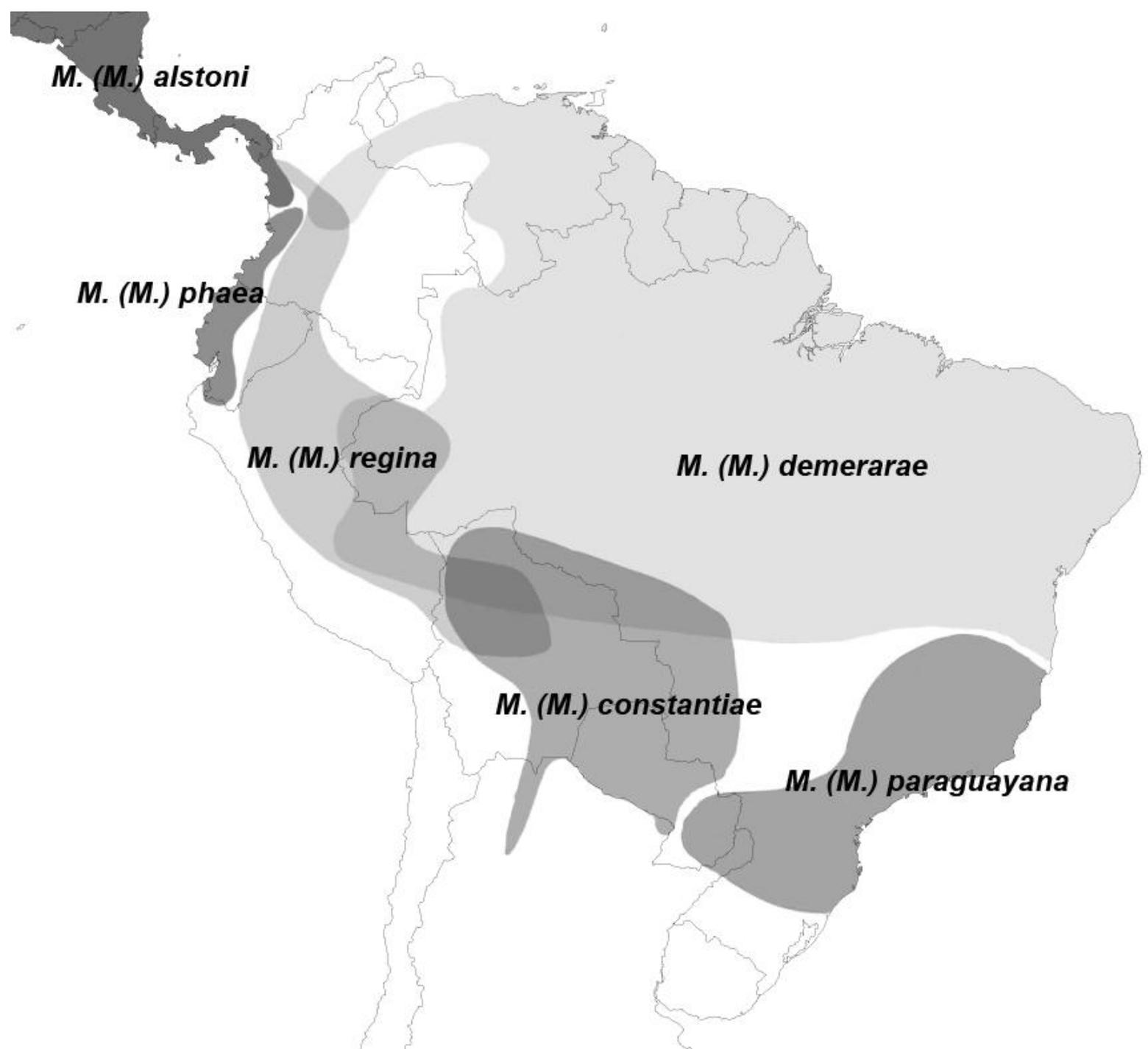


Figura 1 Área de ocorrência das seis espécies de *Marmosa* (*Micoureus*). Modificado de DelaSancha (2012).

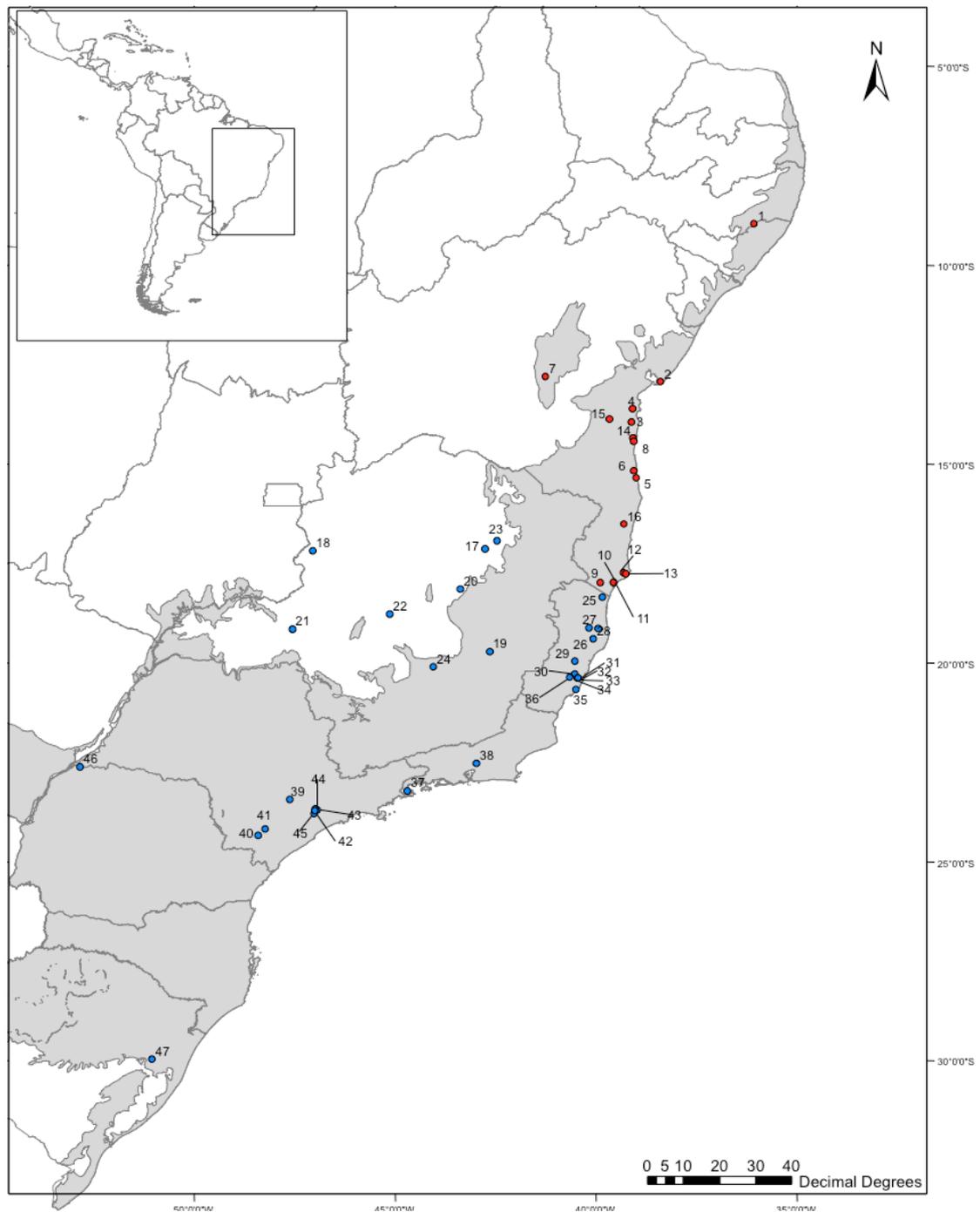


Figura 2. Distribuição das amostras de tecidos de espécimes utilizados nas análises genéticas para as duas espécies de *Marmosa* (*Micoureus*). A lista das localidades específicas encontra-se na Tabela 1, com números correspondentes. Círculos em azul identificam as amostras de *M. (M.) paraguayana* e em vermelho as de *M. (M.) demerarae*.

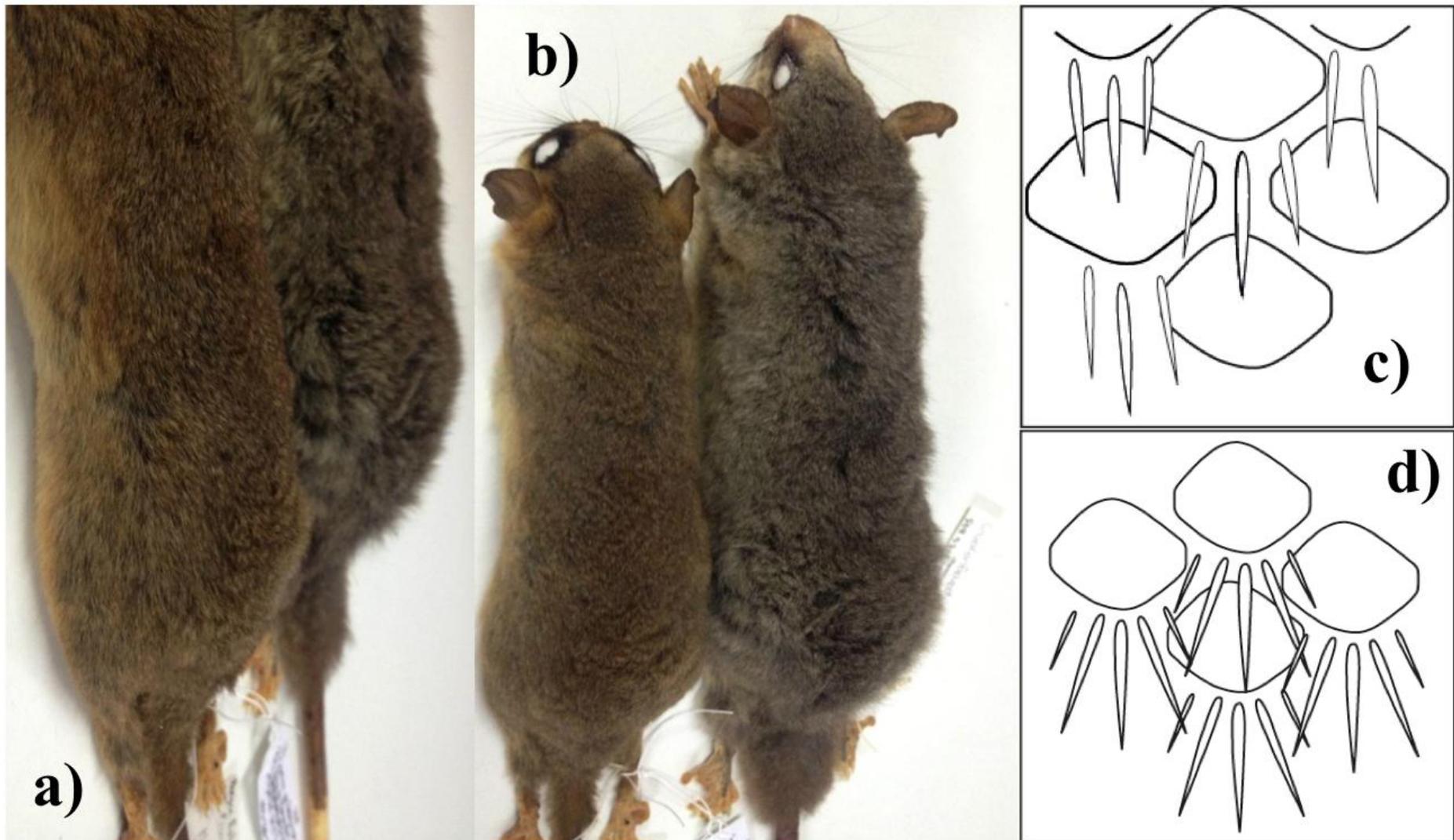


Figura 3. Ilustração de caracteres diagnósticos segundo Brant (2003). **a)** Comprimento do pelo dorsal. À esquerda *M. (M.) demerarae* (pêlo curto) e à direita *M. (M.) paraguayana* (pêlo longo). **b)** Coloração da pelagem dorsal. À esquerda *M. (M.) demerarae* (pêlo amarronzado) e à direita *M. (M.) paraguayana* (pêlo acinzentado). **c)** e **d)** Número de pêlos nas escamas da cauda (modificado de Tate, 1933). **c)** *M. (M.) demerarae* (grupo *Cinerea*) (3 pêlos) e **d)** *M. (M.) paraguayana* (5 pêlos).

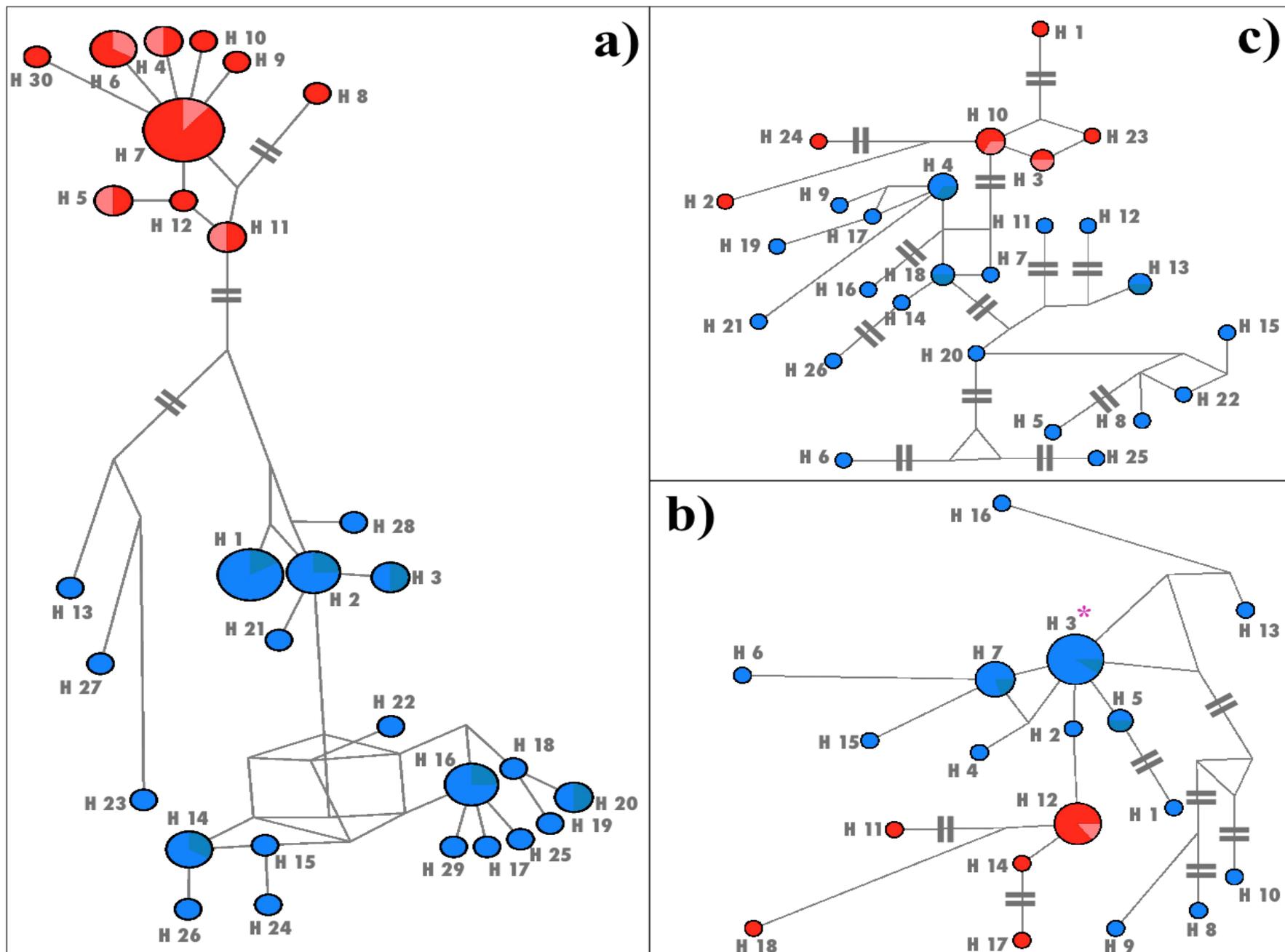


Figura 4. Rede de haplótipos para cada marcador. a) *cit b*, b) *irpb* e c) genes concatenados. Em azul haplótipos de *M. (M.) paraguayana* e em vermelho haplótipos de *M. (M.) demerarae*, segundo o mtDNA. Lista com os haplótipos encontra-se no apêndice. Asterisco no haplótipo H3 na rede ilustrada em b) identifica o haplótipo compartilhado entre os espécimes YL75 e LPC 75.

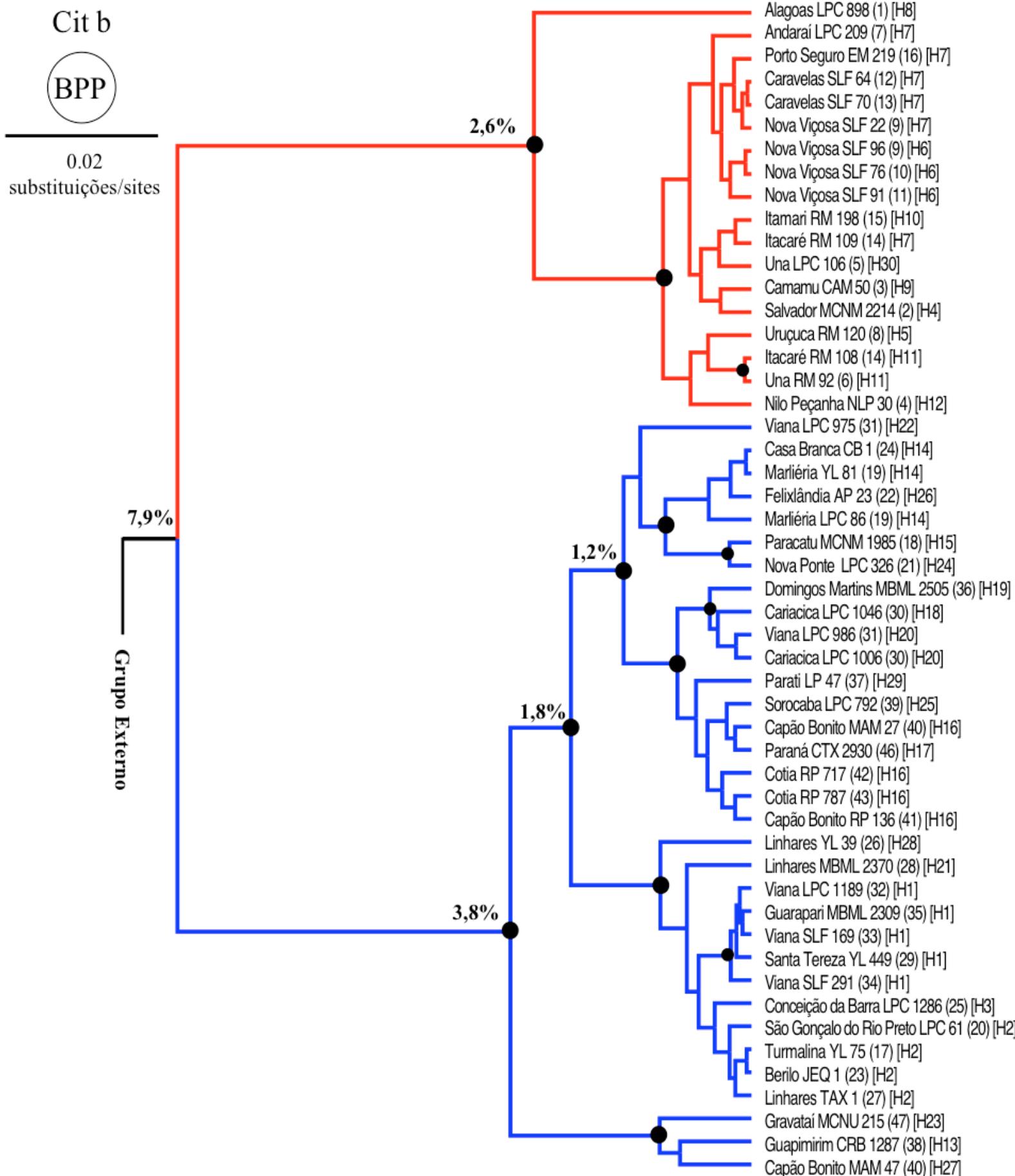


Figura 5. Árvore de Inferência Bayesiana para o gene *Cit b*. Círculos pretos nos nós significam BPP $\geq 0,95$. Porcentagens representam as divergências gênicas, para esse marcador, dentro dos clados. Em azul *M. (M.) paraguayana* e em vermelho *M. (M.) demerarae*. Número entre parênteses representam as localidades (Figura 2 e Tabela 1) e entre colchetes os respectivos haplótipos dos espécimes (lista com todos os haplótipos se encontra no Apêndice D).

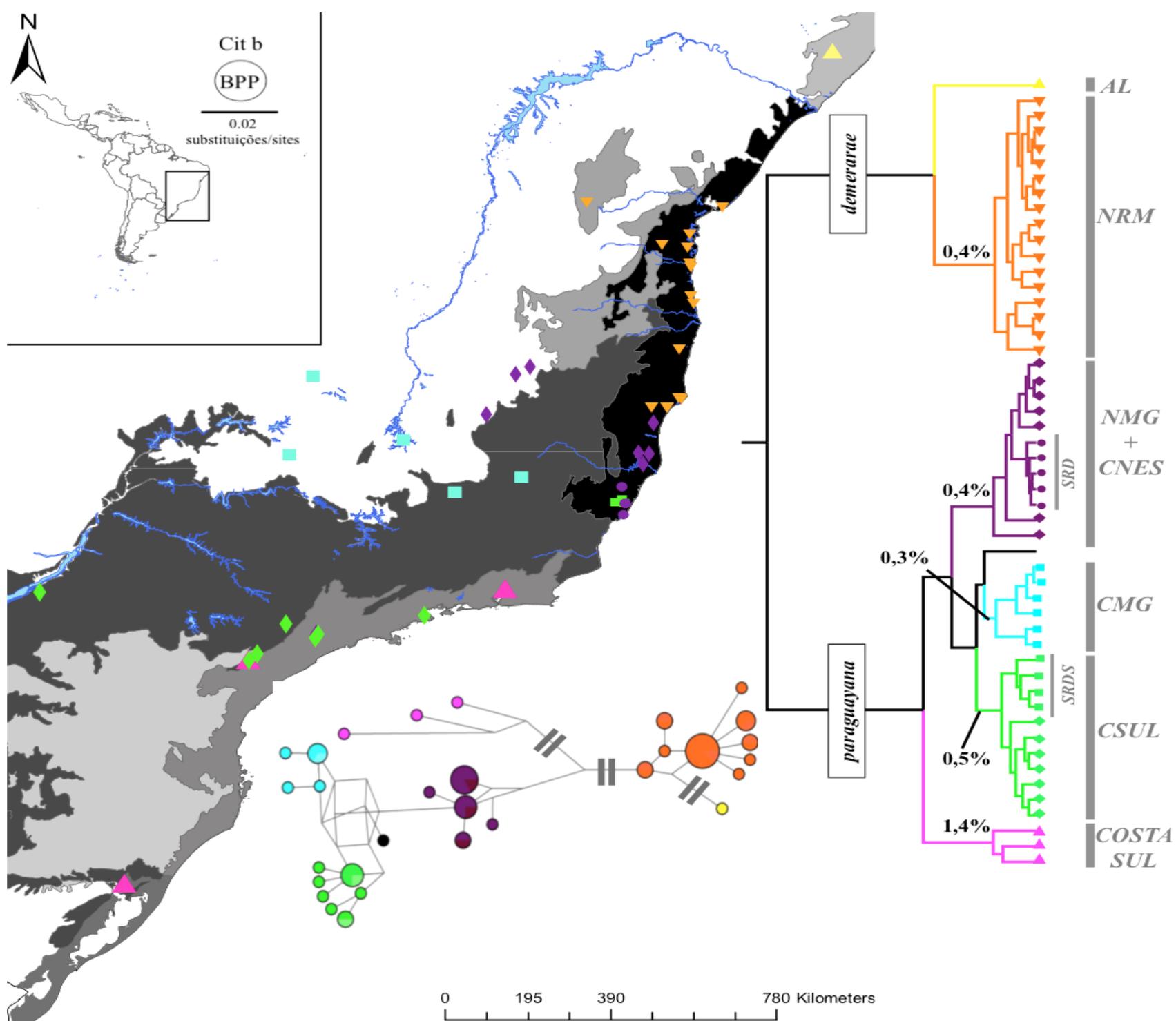


Figura 6. Árvore de Inferência Bayesiana para o gene *Cit b*. Em amarelo Clado Alagoas (AL), em laranja Clado Norte do Rio Mucuri (NRM), em azul ciano Clado Centro Minas (CMG), em verde Clado Centro Sul (CSUL), que envolve o Clado Sul do Rio Doce Serrana (SRDS), em roxo Clado Norte Minas + Centro Norte Espírito Santo, englobando o clado Sul do Rio Doce, e em rosa Clado Costa Sul. Porcentagens mostra a divergência gênica dentro os clados.

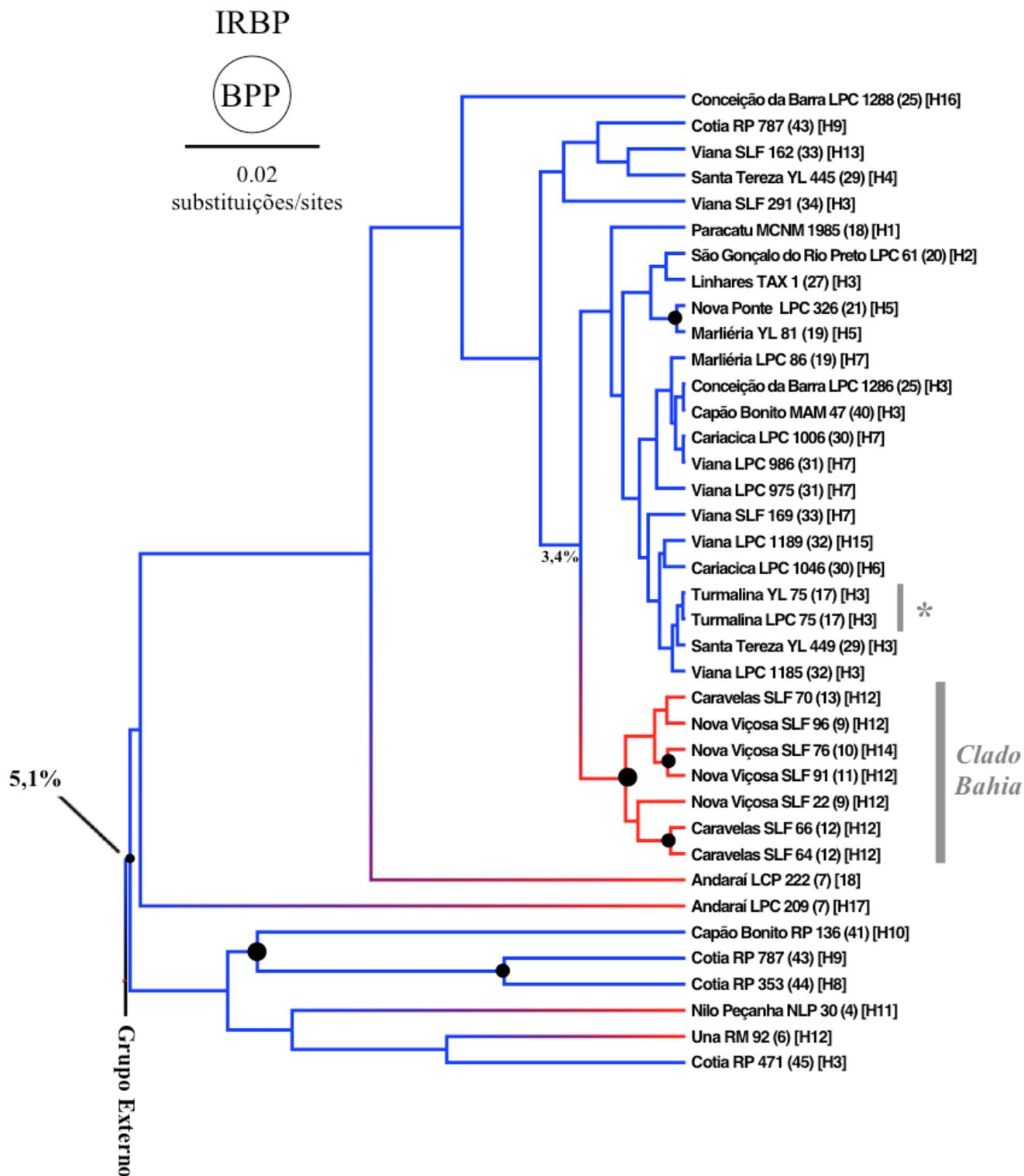


Figura 7. Árvore de IB para o gene IRBP. Círculos pretos nos nós significam BPP $\geq 0,95$. Em azul *M. (M.) paraguayana* e em vermelho *M. (M.) demerarae*, segundo o mtDNA. O asterisco chama atenção para os espécimes YL 75 e LPC 75, que compartilham o mesmo haplótipo de DNA nuclear (H3 na Fig. 4b) e divergem entre si em 0,05%. Porcentagens representam as divergências gênicas, para esse marcador, dentro dos clados. Número entre parênteses representam as localidades (Figura 2 e Tabela 1) e entre colchetes os respectivos haplótipos dos espécimes (lista com todos os haplótipos se encontra no Apêndice I).

Genes Concatenados

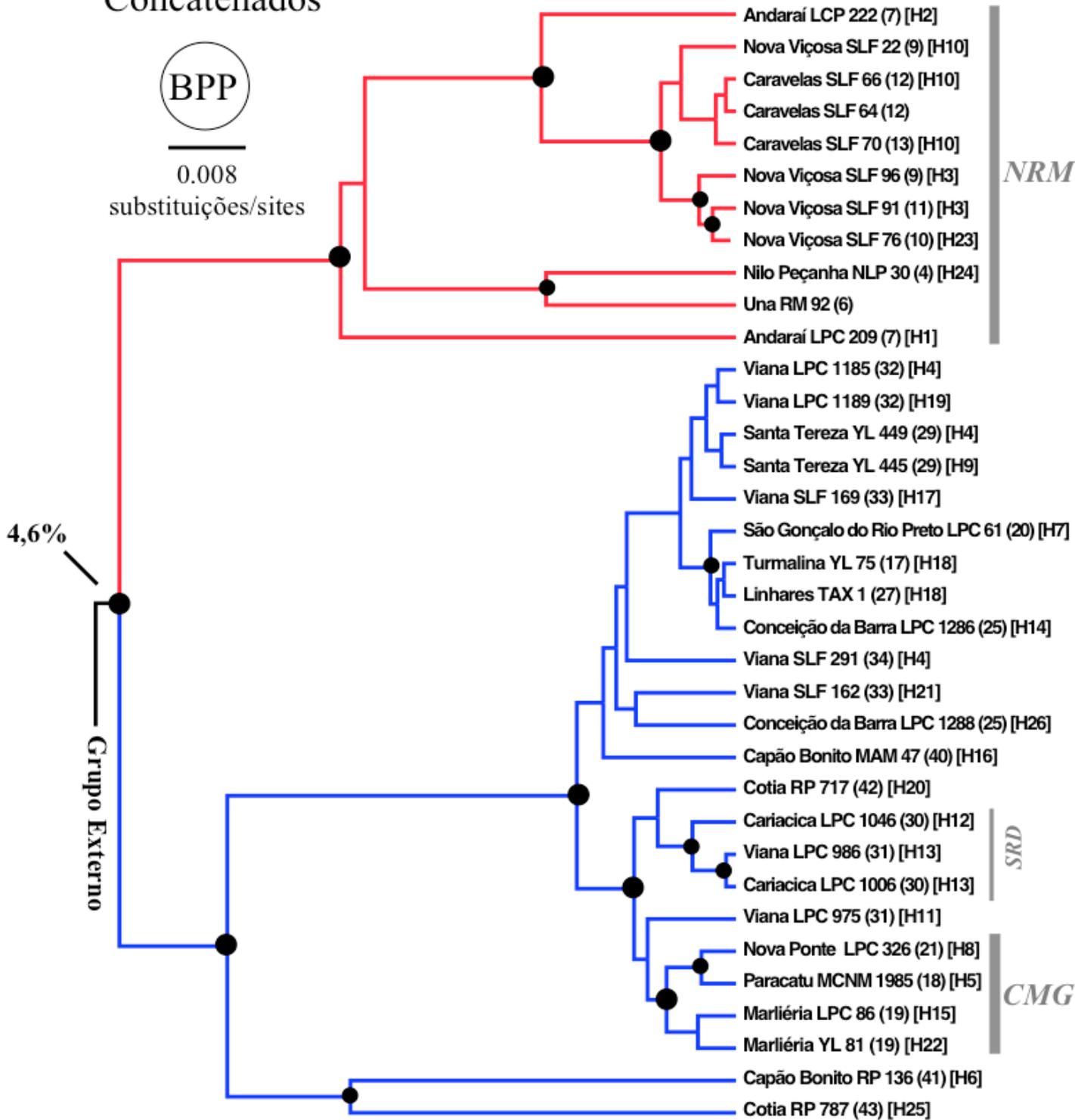


Figura 8. Árvore de Inferência Bayesiana para os genes concatenados. Círculos pretos nos nós significam BPP $\geq 0,95$. Em azul *M. (M.) paraguayana* e em vermelho *M. (M.) demerarae*, segundo o mtDNA.. Número entre parênteses representam as localidades (Figura 2 e Tabela 1) e entre colchetes os respectivos haplótipos dos espécimes (lista com todos os haplótipos se encontra no Apêndice I). Porcentagens representam as divergências gênicas, para esse marcador, dentro dos clados.

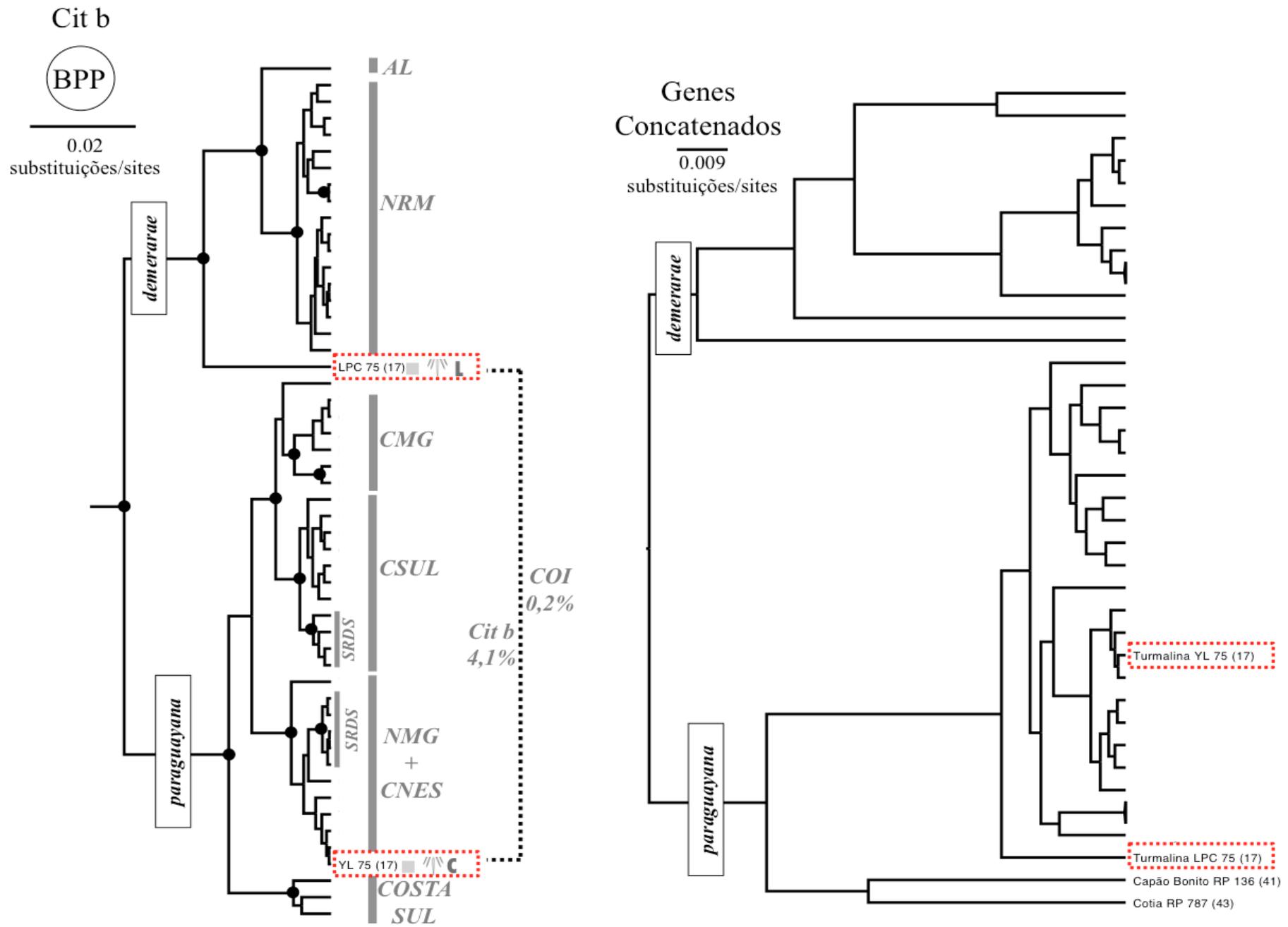


Figura 9. Árvore de IB para *Cit b* e genes concatenados recuperadas em análises prévias. O espécime LPC 75 possivelmente possui um *Numt*, por isso foi retirado das análises que envolviam o marcador *Cit b*. Os espécimes simpátricos (LPC 75 e YL 75), destacados em vermelho, divergem geneticamente 4,1% pelo *Cit b* e 0,2% pelo *COI*. Estes dois espécimes ficam agrupados na mesma espécie de acordo com a análise com genes concatenados, o que não ocorria para o gene mitocondrial, além de possuírem morfologia típica de *M. (M.) paraguayana*.

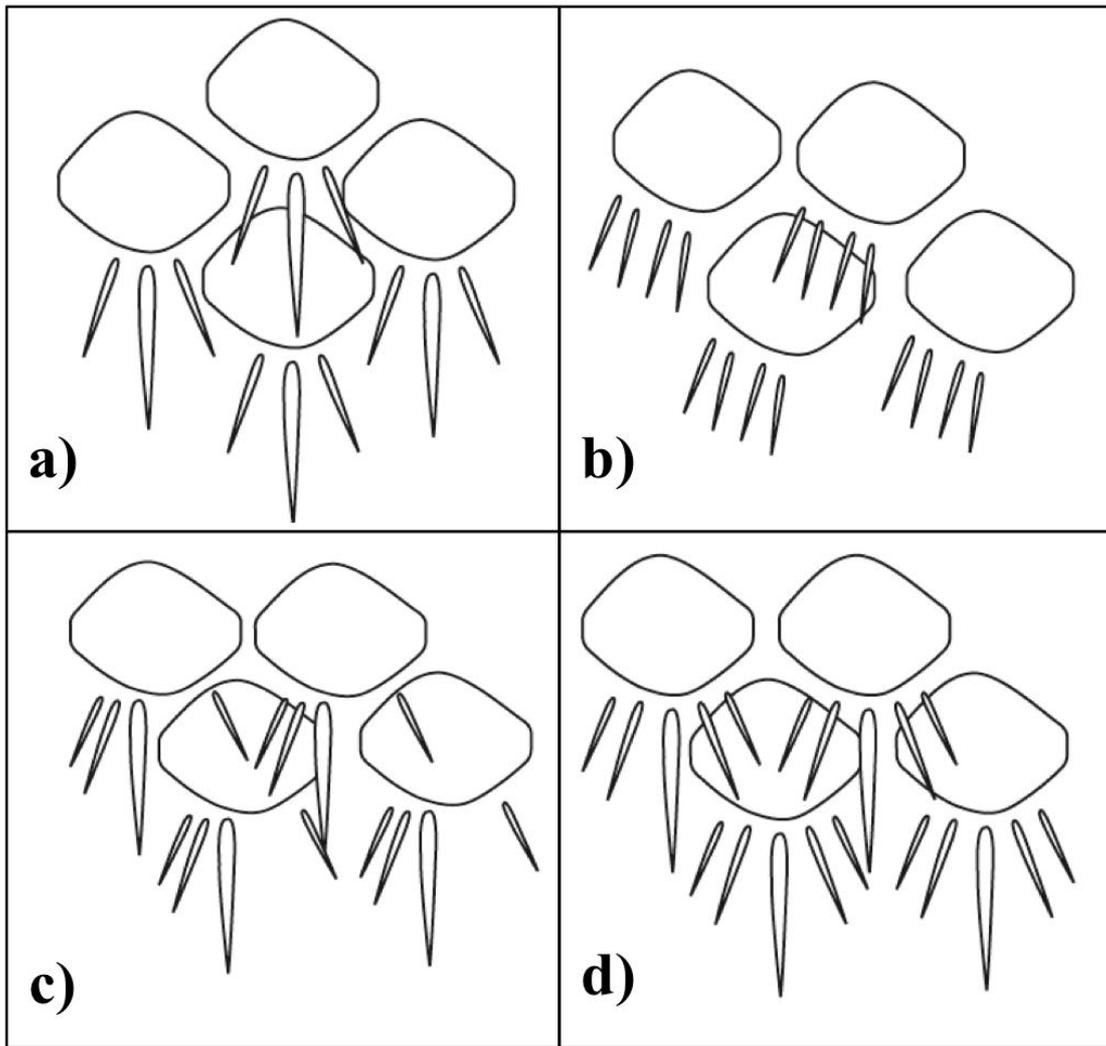


Figura 10. Novos polimorfismos para o caractere pelos nas escamas da cauda descobertos nesse trabalho. Padrão com três pelos, sendo um pelo central de maior comprimento que ultrapassa a escama posterior e dois outros laterais de menor tamanho(a). Padrão de quatro pelos, com quatro pelos localizados lateralmente à base da escama de aproximadamente mesmo tamanho (b). Quatro pelos com um pelo central longo, ultrapassando a escama posterior e outros três laterais de menor comprimento (c). E um novo estado com cinco pelos, sendo um central de maior comprimento, ultrapassando a escama posterior e mais dois laterais de cada lado do central de menor comprimento e tamanhos parecidos (d). Os padrões b), c) e d) foram encontrados exclusivamente em *M. (M.) paraguayana* e a) em *M. (M.) paraguayana* e *M. (M.) demerarae*.

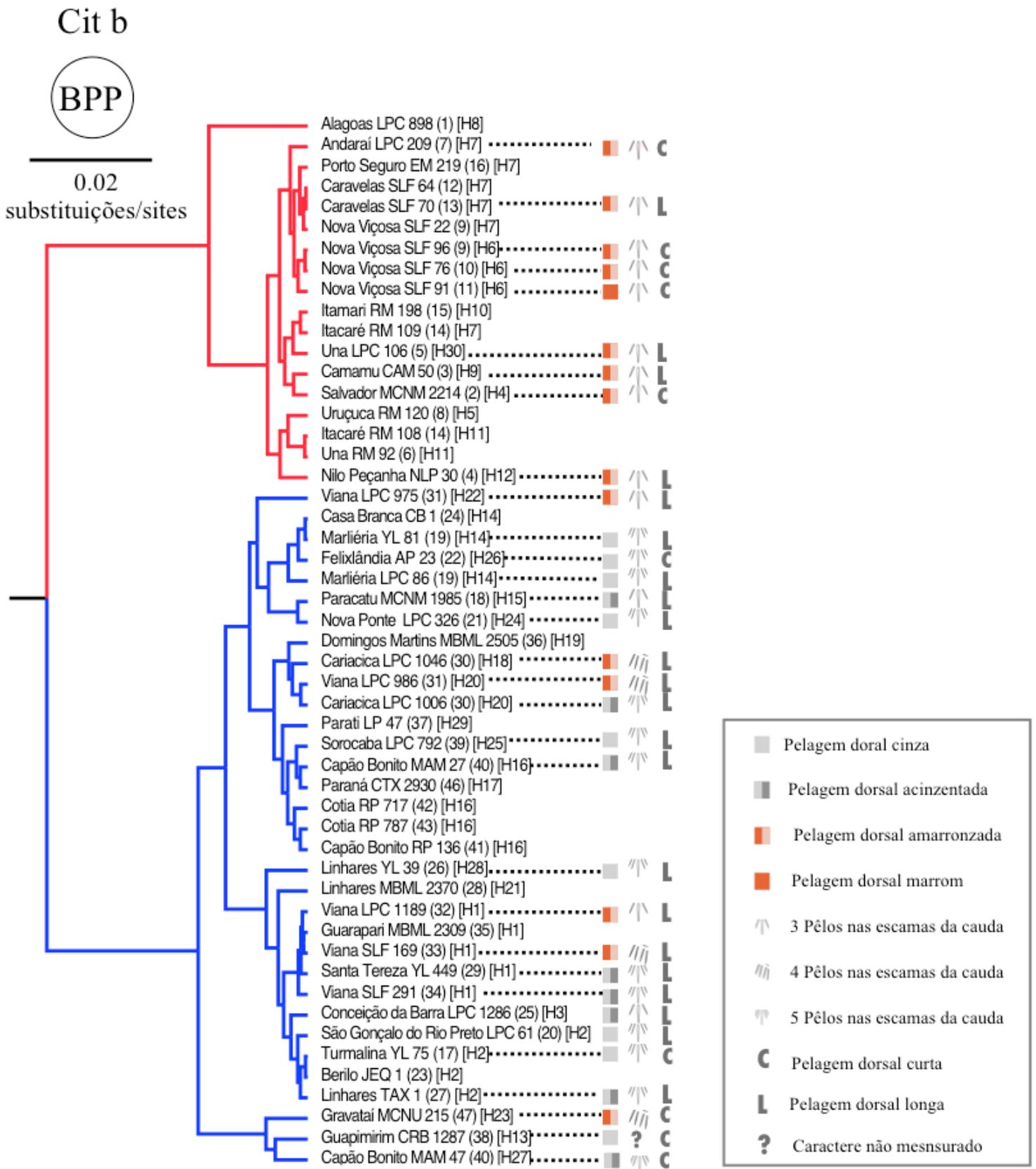


Figura 11. Árvore de Inferência Bayesiana para o marcador molecular *Cit b* com estados de caracteres morfológicos plotados ao lado de cada espécime, identificadas pelas localidades de coleta e número dos haplótipos correspondentes. Em azul *M. (M.) paraguayana* e em vermelho *M. (M.) demerarae*.

Tabela 1. Lista de espécimes de *Marmosa (Micoureus)* utilizados, com seus respectivos números de coleta (Código Amostra), número de acesso do GenBank, localidades, nomes empregados nas árvores (Descrição) (número em parênteses é referente à localidade do espécime), espécie (de acordo com o DNA mitocondrial) e número das localidades usadas nos mapas deste trabalho. Amostras em azul foram usadas exclusivamente para o *Cit b* e em vermelho exclusivamente para *irbp*. Em rosa espécime (YL 75) cujo foi sequenciado o *COI*, para comparação com outro espécime simpátrico, além de todos os outros marcadores. Em verde, espécime (LPC 75) que possivelmente possui Numt e por isso foi excluído das análises com o *Cit b* e genes concatenados. Os marcadores *irbp* e *COI* foram sequenciados para este espécime (LPC 75).

Localidade #	Descrição	Código Amostra	GenBank	Espécie	Localidade
1	Alagoas LPC 898 (1)	LPC 898	JF281091.1	<i>M. demerarare</i>	AL: São José da Laje, Mata do Brejo
2	Salvador MCNM 2214 (2)	MCNM 2214	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Salvador
3	Camamu CAM 50 (3)	CAM 50	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Camamu
4	Nilo Peçanha NLP 30 (4)	NLP 30	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Nilo Peçanha
5	Una LPC 106 (5)	LPC 106	JF281082.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Una, Fazenda Bolandeira
6	Una RM 92 (6)	RM 92	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Una, Reserva Biológica de Una
7	Andaraí LPC 209 (7)	LPC 209	GU112915.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Andaraí, Fazenda Santa Rita
7	Andaraí LCP 222 (7)	LPC 222	JF281080.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Andaraí, Fazenda Santa Rita
8	Uruçuca RM 120 (8)	RM 120	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Uruçuca, Fazenda Catitu
9	Nova Viçosa SLF 22 (9)	SLF 22	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Nova Viçosa, Fazenda Elma
9	Nova Viçosa SLF 96 (9)	SLF 96	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Nova Viçosa, Fazenda Elma
10	Nova Viçosa SLF 76 (10)	SLF 76	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Nova Viçosa, Fazenda João Guardo
11	Nova Viçosa SLF 91 (11)	SLF 91	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Nova Viçosa, Fazenda Tucum
12	Caravelas SLF 64 (12)	SLF 64	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Caravelas, Fazenda Monte Castelo
12	Caravelas SLF 66 (12)	SLF 66	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Caravelas, Fazenda Monte Castelo
13	Caravelas SLF 70 (13)	SLF 70	-	<i>M. demerarare</i>	BA: Caravelas, Fazenda Espada Ilha
14	Itacaré RM 108 (14)	RM 108	EF587299.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Itacaré, Fazenda Rio Capitão
14	Itacaré RM 109 (14)	RM 109	EF587297.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Itacaré, Fazenda Rio Capitão
15	Itamarí RM 198 (15)	RM 198	EF587300.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Itamarí, Fazenda São Roque
16	Porto Seguro EM 219 (16)	RM 219	EF587296.1	<i>M. demerarare</i>	BA: Porto Seguro, Parque Nacional do Pau Brasil
17	Turmalina LPC 75 (17)	LPC 75	-	<i>M. paraguayana</i>	MG: Turmalina, Estação Ecológica de Acauã
17	Turmalina YL 75 (17)	YL 75	GU112920.1	<i>M. paraguayana</i>	MG: Turmalina, Estação Ecológica de Acauã
18	Paracatu MCNM 1985 (18)	MCNM 1985	-	<i>M. paraguayana</i>	MG: Paracatu, Usina Batalha
19	Marliéria YL 81 (19)	YL 81	JF281068.1	<i>M. paraguayana</i>	MG: Marliéria, Parque Estadual do Rio Doce
19	Marliéria LPC 86 (19)	LPC 86	-	<i>M. paraguayana</i>	MG: Marliéria, Parque Estadual do Rio Doce
20	São Gonçalo do Rio Preto LPC 61 (20)	LPC 61	-	<i>M. paraguayana</i>	MG: São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Doce
21	Nova Ponte LPC 326 (21)	LPC 326	GU112923.1	<i>M. paraguayana</i>	MG: Nova Ponte, Fazenda Capão da Onça
22	Felixlândia AP 23 (22)	AP 23	-	<i>M. paraguayana</i>	MG: Felixlândia, Fazenda Santa Cruz
23	Berilo JEQ 1 (23)	JEQ 1	EF587303.1	<i>M. paraguayana</i>	MG: Berilo, Usina Hidrelétrica de Irapé
24	Casa Branca CB 1 (24)	CB 1	EF587307.1	<i>M. paraguayana</i>	MG: Casa Branca, Rola Moça
25	Conceição da Barra LPC 1286 (25)	LPC 1286	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Conceição da Barra, Floresta Nacional do Rio Preto
25	Conceição da Barra LPC 1288 (25)	LPC 1288	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Conceição da Barra, Floresta Nacional do Rio Preto
26	Linhares YL 39 (26)	YL 39	GU112921.1	<i>M. paraguayana</i>	ES: Linhares, Fazenda Santa Terezinha
27	Linhares TAX 1 (27)	TAX 1	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Linhares, Reserva Natural da Vale do Rio Doce
28	Linhares MBML 2370 (28)	MBML 2370	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Linhares, Fazenda Bom Conselho
29	Santa Tereza YL 445 (29)	YL 445	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Santa Tereza, Estação Biológica Santa Lúcia
29	Santa Tereza YL 449 (29)	YL 449	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Santa Tereza, Estação Biológica Santa Lúcia
30	Cariacica LPC 1006 (30)	LPC 1006	GU112924.1	<i>M. paraguayana</i>	ES: Cariacica: Reserva Biológica de Duas Bocas
30	Cariacica LPC 1046 (30)	LPC 1046	GU112919.1	<i>M. paraguayana</i>	ES: Cariacica: Reserva Biológica de Duas Bocas
31	Viana LPC 975 (31)	LPC 975	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Pimenta
31	Viana LPC 986 (31)	LPC 986	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Pimenta
32	Viana LPC 1185 (32)	LPC 1185	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Ribeira
32	Viana LPC 1189 (32)	LPC 1189	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Ribeira
33	Viana SLF 162 (33)	SLF 162	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Fazenda Boa Baixa
33	Viana SLF 169 (33)	SLF 169	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Fazenda Boa Baixa
34	Viana SLF 291 (34)	SLF 291	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Viana, Caracas
35	Guarapari MBML 2309 (35)	MBML 2309	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Guarapari
36	Domingos Martins MBML 2505 (36)	MBML 2505	-	<i>M. paraguayana</i>	ES: Pedra Azul, Hidrelétrica São Pedro
37	Parati LP 47 (37)	LP 47	-	<i>M. paraguayana</i>	RJ: Parati, Tarituba
38	Guapimirim CRB 1287 (38)	CRB 1287	-	<i>M. paraguayana</i>	RJ: Guapimirim
39	Sorocaba LPC 792 (39)	LPC 792	GU112922.1	<i>M. paraguayana</i>	SP: Sorocaba, Floresta Nacional de Ipanema
40	Capão Bonito MAM 27 (40)	MAM 27	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Capão Bonito, Fazenda Intervalles
40	Capão Bonito MAM 47 (40)	MAM 47	AY233778.1	<i>M. paraguayana</i>	SP: Capão Bonito, Fazenda Intervalles
41	Capão Bonito RP 136 (41)	RP 136	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Capão Bonito, Fazenda Sakamoto
42	Cotia RP 717 (42)	RP 717	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Cotia, Big Vale
43	Cotia RP 787 (43)	RP 787	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Cotia, Psicótica
44	Cotia RP 353 (44)	RP 353	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Cotia, Ruth
45	Cotia RP 471 (45)	RP 471	-	<i>M. paraguayana</i>	SP: Cotia, Chave
46	Paraná CTX 2930 (46)	CTX 2930	-	<i>M. paraguayana</i>	PR: Diamante do Norte
47	Gravataí MCNU 215 (47)	MCNU 215	-	<i>M. paraguayana</i>	RS: Gravataí, Morro Agudo
48	Grupo Externo	JLP 15435	AY233779.1	<i>M. regina</i>	AM: Nova Empresa, left bank Rio Júrua
49	Grupo Externo	VAL 08	-	<i>M. murina</i>	BA: Valença

Tabela 2. Marcadores e primers utilizados e suas respectivas sequências, fonte e perfis das PCR's.

Gene	Primer	Sequência	Referência	# ciclos	Ta	Elongação
<i>Cit b</i>	MVZ 05	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	Smith and Patton, 1993	40	48° C - 45sec	72° C - 45sec
<i>Cit b</i>	MVZ 16	5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'	Smith and Patton, 1993	40	48° C - 45sec	72° C - 45sec
<i>Irpb</i>	"+IRBP217"	5'-ATGGCCAAGGTCCTCTTGGATAACTACTGCTT-3'	Stanhope et al., 1992	39	60° C - 90sec	72° C - 3min
<i>Irpb</i>	"-IRBP1531"	5'-CGCAGGTCCATGATGAGGTGCTCCGTGTCCTG-3'	Stanhope et al., 1992	39	60° C - 90sec	72° C - 3min
<i>COI</i>	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Herbert et al., 2003	35	44° C - 90sec	72° C - 1min
<i>COI</i>	HCO2198	5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Herbert et al., 2004	35	44° C - 90sec	72° C - 1min

Tabela 3. Modelo de evolução, parâmetro gamma, proporção de sítios invariáveis (Pinvar), distância genética média (K2p), números de sítios variáveis e números de sítios informativos para cada marcador e análise concatenada.

Marcador	Modelo de evolução		Gamma		Pinvar		Distância K2p (%) média	# Sítios variáveis	# Sítios informativos
	ML	IB	ML	IB	ML	IB			
<i>citb</i>	GTR	HKY	0,308	0,276	-	-	5,6	252	125
<i>irpb</i>	HKY	HKY	1,161	1,161	-	-	7,2	833	275
concatenada	GTR	SYM	0,516	0,517	0,701	0,705	4,6	890	267

Tabela 4. Divergências gênicas para o *Cit b*, entre e dentro dos clados, com média e desvio padrão.

	Divergência gênica entre os clados					Divergência gênica dentro dos clados	
	1	2	3	4	5	média	desvio padrão
1-CMG	-	-	-	-	-	0,3	0,002
2-NRM	8,6	-	-	-	-	0,4	0,001
3-COSTA SUL	4,2	8,7	-	-	-	1,4	0,005
4-CSUL	1,2	8,2	4,3	-	-	0,5	0,002
5-CNES+NMG	1,9	7,9	3,2	1,8	-	0,4	0,002
6-AL	9,2	2,6	8,7	8,7	8,4	-	-