

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

ANA CLÁUDIA FEGIES

SISTEMÁTICA DO GÊNERO *CRYPTONANUS*
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) BASEADA EM ANÁLISES
MOLECULARES

Sorocaba
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

ANA CLÁUDIA FEGIES

SISTEMÁTICA DO GÊNERO *CRYPTONANUS*
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) BASEADA EM ANÁLISES
MOLECULARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de mestre em Diversidade Biológica e Conservação. Linha de pesquisa: Taxonomia, Sistemática e Biogeografia.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Carmignotto
Co-orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Sorocaba
2014

F295s Fegies, Ana Cláudia.
Sistemática do gênero *Cryptonanus* (Didelphimorphia: Didelphidae)
baseada em análises moleculares / Ana Cláudia Fegies. – 2014.
98 f. : 28 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos,
Campus Sorocaba, Sorocaba, 2014
Orientador: Ana Paula Carmignotto
Co-orientador: Ana Cláudia Lessinger
Banca examinadora: Alexandre Reis Percequillo, Mário de Vivo

Bibliografia

1. Filogenia. 2. Zoologia. 3. Marcador molecular.
I. Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

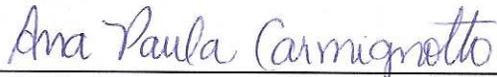
CDD 591.3

ANA CLÁUDIA FEGIES

**SISTEMÁTICA DO GÊNERO CRYPTONANUS
(DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) BASEADA EM
ANÁLISES MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de
mestre em Diversidade Biológica e Conservação.
Universidade Federal de São Carlos.
Sorocaba, 06 de março de 2014.

Orientadora:

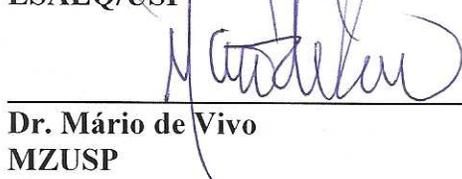


Profa. Dra. Ana Paula Carmignotto
Universidade Federal de São Carlos – *Campus Sorocaba*

Examinadores:



Dr. Alexandre Percequillo
ESALQ/USP



Dr. Mário de Vivo
MZUSP

*Aos Fegies,
por todo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer à Professora Ana Paula Carmignotto pela oportunidade de trabalhar com esse gênero desde a iniciação científica em 2010. Pela confiança em compartilhar o sonho de tentar entender melhor as espécies de *Cryptonanus* e por todos os incentivos que me deu durante esse trabalho.

À Professora Ana Cláudia Lessinger pelas lições de genética molecular além dos estímulos que me deu para continuar trabalhando.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao projeto.

Ao Mario de Vivo pelas conversas, incentivos e força que me deu para conseguir concluir a dissertação, além da participação na banca de qualificação!

À Mariana Lyra e Fernando Franco que participaram da minha banca de qualificação e contribuíram para o fechamento desse ciclo.

Ao Felipe Grazziotin por ter me ensinado as análises filogenéticas e por todo apoio que deu durante o curso que lecionou.

Aos técnicos Renato Kimura da UFSCar e Rosângela Rodrigues da Unicamp por todo apoio laboratorial.

À secretária do curso, Luciana Kawamura, por toda ajuda e paciência durante esse processo.

Ao Manolo Fernandez Perez que sempre me ajudou na execução deste trabalho, ora discutindo sobre o assunto, ora me apoiando, ora me ajudando a formatar. Muito obrigada por tudo.

À família Perez por todo o apoio e pelos ótimos momentos de distração que me fizeram relaxar um pouco.

Aos amigos mastozoólogos que tive o prazer de conhecer no decorrer desses dois anos e meio de mestrado e que me ajudaram de diferentes formas. Agradeço à Thiago Semedo (amiguinho), Guilherme Garbino (Garbes), Pamela Brenand (Pam), Gustavo Libardi (Napister), Leandro Godoy (Leléo), Joyce Rodrigues (Cem), Edson Jr. (Edinho, gaúcho), Marcus Brandão (Pueira), Elisandra Chiquito e Caroline de Bianchi Tocchet.

Ao Paulo Cseri por toda ajuda nas extrações e pelas conversas.

À todos os amigos da pós-graduação que dividiram as experiências durante as disciplinas, à Raphaella Magalhães e Cecília Jojima.

À Jamaíra Aparecida Victorio mesmo estando longe sempre compartilhou os momentos difíceis da pós-graduação e os bons também.

Aos meus pais, Silvia Helena Jorge Fegies e Newton de Castro Fegies, por me ajudarem incondicionalmente, pela ajuda de custo e pelo carinho que me dão. Aos meus irmãos, Juliana e Thiago Fegies por sempre me apoiarem.

RESUMO

O gênero *Cryptonanus*, pertencente à família Didelphidae, é composto por cinco espécies válidas, restritas às formações abertas da América do Sul: *C. agricolai*, *C. chacoensis*, *C. guahybae*, *C. ignitus* e *C. unduaviensis*. De acordo com análises morfológicas de espécimes do Cerrado, Caatinga e Pantanal, é necessária uma revisão taxonômica do grupo, considerando todo o espectro de variação morfológica encontrada e a amplitude da distribuição geográfica. Este estudo tem como objetivo auxiliar na delimitação das espécies de *Cryptonanus* a partir da avaliação de possíveis padrões de distribuição da variação genética intra e interespecífica, da análise das relações filogenéticas obtidas entre as diferentes linhagens genéticas e da distribuição geográfica destas linhagens. Devido ao seu potencial informativo em estudos de delimitação taxonômica, foram realizadas análises combinadas de sequências dos genes citocromo b (*cytb*, 781 pb) e subunidade I da citocromo oxidase c (*coI*, 743 pb) do DNA mitocondrial para um conjunto de 51 espécimes de *Cryptonanus*, além de análises em separado para cada marcador, 64 espécimes para o *cytb* e 54 para o *coI*, amostrando 42 localidades da América do Sul. As estimativas de distância genética foram realizadas em análises utilizando a estratégia de DNA *barcode*. As relações filogenéticas foram analisadas com base nas inferências resultantes dos métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. As topologias obtidas apresentaram resultados congruentes em relação ao posicionamento do gênero *Cryptonanus* em um agrupamento monofilético, o qual foi subdividido em nove clados. Em relação à delimitação de espécies, foram investigadas duas hipóteses evolutivas: 1- a manutenção de quatro dos cinco táxons válidos (excluindo-se *C. ignitus*, que não integra este estudo), a partir da caracterização de intervalos de variação genética intraespecífica entre 0 a 5,3% (*cytb*) e entre 0 a 5,1% (*coI*) e de variação interespecífica entre 4,1 a 13,2% (*cytb*) e 4,7 a 9,6% (*coI*), com estruturação genética nas populações de *C.*

agricolai e *C. chacoensis*; 2- ampliação da diversidade do gênero com a identificação de cinco novas espécies, além das cinco espécies atualmente válidas, caracterizado por valores de variação intraespecífica entre 0 a 2,4% (*cytb*) e entre 0 a 3% (*coI*) e valores de variação interespecífica nos intervalos de 2,1 a 13,2% para *cytb* e 1,6 a 9,6% para *coI*. A hipótese 2 é defendida como sendo a condição que melhor representa a delimitação das espécies de *Cryptonanus* com base na congruência entre a estruturação geográfica, os intervalos de variação genética intra e interespecíficos válidos para outras espécies e a recuperação de linhagens genéticas reciprocamente monofiléticas em todas as análises filogenéticas.

Palavras-chave: Thylamyini. *Barcode*. Delimitação de Espécies. Filogenia. *cytb*. *coI*. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

The *Cryptonanus* genus, in Didelphidae family, is currently constituted by five recognized species restricted to the open vegetation areas of South America: *C. agricolai*, *C. chacoensis*, *C. guahybae*, *C. ignitus* e *C. unduaviensis*. Morphological analyses on specimens from Cerrado, Caatinga and Pantanal, indicate the need of taxonomic revision for this group, especially considering its wide range of phenotypic variation and geographic distribution. This study aims to contribute in *Cryptonanus* species delimitation by evaluating possible patterns of intra and interspecific genetic variation, by the analysis of the phylogenetic relationships from the genetic lineages and their geographic distribution. Combined analysis using mtDNA potentially informative sequences, from cytochrome b (*cytb*) and subunit I of cytochrome oxidase c (*coI*) genes, were performed for 51 *Cryptonanus* specimens, in addition to independent analysis of each marker, 64 specimens for *cytb* and 54 for *coI*, sampling a total of 42 localities in South America. Genetic distances were estimated based on a DNA barcode approach. Phylogenetic relationships were retrieved from the results of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods. The topologies recovered were congruent relative to the position of the genus *Cryptonanus* as a monophyletic cluster, subdivided in nine clades. Regarding species delimitation, two evolutionary hypotheses were tested: 1- the maintenance of four from five valid taxa (except *C. ignitus*, since this species was not included in the analyses), based on the characterization of intraspecific genetic variation ranged from 0 to 5,3% (*cytb*) and from 0 to 5,1% (*coI*), while interspecific variation ranging from 4,1 to 13,2% (*cytb*) and from 4,7 to 9,6% (*coI*), related with genetically structured populations in *C. agricolai* and *C. chacoensis* clusters; 2- extended biological diversity, related with the identification of five new species besides the five currently recognized. On this scenario, intraspecific genetic variation ranges from 0 to 2,4% (*cytb*) and from 0 to 3% (*coI*), while interspecific

variation ranges from 2,1 to 13,2% for *cytb* and 1,6 to 9,6% for *coI*. The hypothesis 2 is argued to provide a better picture for species delimitation in *Cryptonanus*, based on the congruence between geographic structure, intra and interspecific genetic variation ranges and the recovery of reciprocal monophyletic genetic lineages in every phylogenetic analyses.

Keywords: Thylamyini. *Barcode*. Species Delimitation. Phylogeny. *cytb*. *coI*. Molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A. Espécime de *Cryptonanus agricolai* levando os filhotes no ventre; B. Espécime de *Cryptonanus chacoensis* proveniente do Estado de Mato Grosso. 17
- Figura 2.** Mapa evidenciando a distribuição geográfica das espécies de *Cryptonanus* reconhecidas por Voss *et al.* (2005). As áreas delimitadas representam a distribuição potencial de *C. agricolai* (vermelho), *C. chacoensis* (azul), *C. gualhybae* (verde claro), *C. ignitus* (verde escuro) e *C. unduaviensis* (rosa). Figura modificada de Voss *et al.* (2005).....19
- Figura 3.** Mapa central da América do Sul apresentando a distribuição dos registros dos espécimes de *Cryptonanus* analisados. As ecorregiões estão delimitadas de acordo com Olson *et al.* (2001). Os números correspondem às localidades e espécimes citados nos ANEXOS I e IV. 28
- Figura 4.** Ilustração representando a localização dos *primers* táxon-específicos que flanqueiam a região *barcode*. Os *primers* utilizados para a amplificação da região alvo estão indicados por setas azuis (LCO1490mod) e verdes (HCO2288mod) que estão localizadas nos sítios de hibridação de cada *primer*. O *primer* HCO2198, utilizado para a amplificação da região *barcode* segundo Herbert *et al.* (2003), está indicado como referência. 30
- Figura 5.** Ilustração representando a localização dos *primers* táxon-específicos para o gene *cytb* (Jaqueline Vilella Barban, comunicação pessoal). Os *primers* utilizados para a amplificação da região alvo estão indicados por setas azuis (MVZ05mod) e verdes (MVZ16mod) que estão localizados nos sítios de hibridação de cada *primer*. 30
- Figura 6.** Correlação entre as divergências genéticas calculadas par a par pelo modelo de distância K2P para as sequências de *col* e *cytb* para 51 amostras de *Cryptonanus*. 36
- Figura 7.** Topologia obtida a partir da análise de 781 pb de uma região do gene *cytb* para 64 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 1. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo. 38
- Figura 8.** Topologia obtida a partir da análise de 743 pb de uma região do gene *col* para 54 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 1. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo. 39
- Figura 9.** Distribuição das frequências de valores de divergência genética intra e interespecíficas baseadas no modelo de distância K2P para as sequências de *col* e *cytb* considerando a Hipótese 1. 41
- Figura 10.** Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. unduaviensis* (análise intraespecífica) e entre *C. unduaviensis* e as

demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.....	44
Figura 11. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para <i>col</i> e <i>cytb</i> , incluindo comparações entre espécimes de <i>C. guahybae</i> (análise intraespecífica) e entre <i>C. guahybae</i> e as demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.....	44
Figura 12. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para <i>col</i> e <i>cytb</i> , incluindo comparações entre espécimes de <i>C. agricolai</i> (análise intraespecífica) e entre <i>C. agricolai</i> e as demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.....	45
Figura 13. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para <i>col</i> e <i>cytb</i> , incluindo comparações entre espécimes de <i>C. chacoensis</i> (análise intraespecífica) e entre <i>C. chacoensis</i> e as demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.....	45
Figura 14. Topologia obtida a partir da análise de 781 pb de uma região do gene <i>cytb</i> para 64 espécimes de <i>Cryptonanus</i> utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 2. Estão apresentados valores de <i>bootstrap</i> maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.	47
Figura 15. Topologia obtida a partir da análise de 743 pb de uma região do gene <i>col</i> para 54 espécimes de <i>Cryptonanus</i> utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 2. Estão apresentados valores de <i>bootstrap</i> maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.	48
Figura 16. Distribuição das frequências de valores de divergência genética intra e interespecíficas baseadas no modelo de distância K2P para as sequências de <i>col</i> e <i>cytb</i> considerando a Hipótese 2.....	50
Figura 17. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para <i>col</i> e <i>cytb</i> , incluindo comparações entre espécimes de <i>C. agricolai</i> (análise intraespecífica) e entre <i>C. agricolai</i> e as demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 2.....	50
Figura 18. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para <i>col</i> e <i>cytb</i> , incluindo comparações entre espécimes de <i>C. chacoensis</i> (análise intraespecífica) e entre <i>C. chacoensis</i> e as demais espécies de <i>Cryptonanus</i> (análise interespecífica), considerando a Hipótese 2.....	51
Figura 19. Topologia obtida a partir das inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP) entre os espécimes de <i>Cryptonanus</i> e do grupo externo, considerando a análise de sequências de <i>cytb</i> . Os valores de suporte de ramo acima de 75% (MP e ML) de <i>bootstrap</i> e 0.9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados por porções escuras nas circunferências presentes nos nós dos ramos.	56

- Figura 20.** Topologia obtida a partir das inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP) entre os espécimes de *Cryptonanus* e do grupo externo, considerando a análise de sequências de *col*. Os valores de suporte de ramo acima de 75% (MP e ML) de *bootstrap* e 0.9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados por porções escuras nas circunferências presentes nos nós dos ramos. 57
- Figura 21.** Topologia obtida a partir das análises de 781 pb de uma região do gene *cytb* para 64 espécimes de *Cryptonanus* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e 0,9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados pelas circunferências escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo. 60
- Figura 22.** Topologia obtida a partir das análises de 743 pb de uma região do gene *col* para 54 espécimes de *Cryptonanus* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e 0,9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados pelas circunferências escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo. 61
- Figura 23.** Topologia obtida a partir das análises de 1524 pb referente à análise concatenada dos genes *cytb* e *col* para 51 espécimes de *Cryptonanus* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e de 0,9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados pelas circunferências escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo. 62
- Figura 24.** Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição dos agrupamentos compostos por espécimes de *C. unduaviensis* (rosa) com relação aos grupos contendo espécimes de *C. agricolai* + *C. chacoensis* + *C. guahybae* (vermelho)..... 63
- Figura 25.** Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição dos agrupamentos compostos por espécimes de *C. agricolai* (vermelho), *C. chacoensis* (azul) e *C. guahybae* (verde). A seta indica a localidade 9, onde há a simpatria entre *C. chacoensis* e *C. agricolai*. 65
- Figura 26.** Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja) e *C. agricolai* C (amarelo). 66
- Figura 27.** Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C (azul claro) e *C. chacoensis* D (preto). Setas em branco indicam pontos de ocorrência de simpatria. 67
- Figura 28.** Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja), *C. agricolai* C (amarelo), *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C

(azul claro), *C. chacoensis* D (preto), *C. guahybae* (verde) e *C. unduaviensis* (rosa).
Setas em branco indicam pontos de ocorrência de simpatria..... 68

Figura 29. Mapa da região central da América do Sul mostrando a ocorrência dos rios e das áreas de altitude. A distribuição de *Cryptonanus* está representada pelos pontos coloridos: *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja), *C. agricolai* C (amarelo), *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C (azul claro), *C. chacoensis* D (preto), *C. guahybae* (verde) e *C. unduaviensis* (rosa). Os pontos em branco representam as localidades com registro de simpatria. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados de sequências do *col* e *cytb* depositadas no Genbank (Fevereiro 2014) para os gêneros da Tribo Thylamyini.* = espécies atualmente válidas para cada gênero segundo Voss e Jansa (2009), n = número de registros no GenBank e N = número de espécies de cada gênero com registros no GenBank..... 24
- Tabela 2.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região *cytb* considerando-se a Hipótese 1. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica..... 42
- Tabela 3.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região *col* considerando-se a Hipótese 1. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica..... 42
- Tabela 4.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências das regiões alvo dos genes *cytb* e *col* considerando a Hipótese 1. Estão representadas as médias, o mínimo e o máximo, o número amostral (n) e o número de localidades (N) para cada agrupamento. 43
- Tabela 5.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região alvo do gene *cytb* considerando a Hipótese 2. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica..... 52
- Tabela 6.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região alvo do gene *col* considerando a Hipótese 2. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica..... 53
- Tabela 7.** Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências das regiões alvo dos genes *cytb* e *col* considerando a Hipótese 2. Estão representadas as médias, o máximo e o mínimo, o número amostral (n) e o número de localidades (N) para cada agrupamento. 54

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
<i>Histórico taxonômico do gênero Cryptonanus</i>	16
<i>Delimitação de Espécies</i>	20
<i>Abordagem de DNA <u>barcode</u></i>	22
<i>Estado da arte no estudo de sequências nucleotídicas do DNA nos marsupiais sulamericanos</i>	23
OBJETIVOS	25
MATERIAIS E MÉTODOS	27
<i>Amostragem</i>	27
<i>Extração, amplificação e sequenciamento</i>	29
<i>Análises das sequências nucleotídicas</i>	32
<i>Análise de DNA <u>barcode</u>.....</i>	32
<i>Critérios para delimitar as espécies</i>	33
<i>Análises filogenéticas</i>	34
<i>Mapas representando a estruturação geográfica</i>	35
RESULTADOS	36
<i>Análise de DNA <u>barcode</u>.....</i>	36
<i>Hipótese 1</i>	37
<i>Hipótese 2</i>	46
<i>Análises Filogenéticas</i>	55
<i>Estruturação geográfica</i>	63
DISCUSSÃO	70
<i>Análise de DNA <u>barcode</u>.....</i>	70
<i>Análises filogenéticas</i>	73
<i>Estruturação geográfica</i>	74
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO I.	92
ANEXO II.....	94
ANEXO III	95
ANEXO IV	96

INTRODUÇÃO

Histórico taxonômico do gênero Cryptonanus

As espécies do gênero *Cryptonanus* pertencem à Infraclasse dos Mamíferos Marsupiais (Metatheria), cujas características mais marcantes estão relacionadas aos caracteres reprodutivos, incluindo o nascimento precoce dos filhotes, com a maior parte do desenvolvimento acontecendo fora do útero da mãe (Tyndale-Biscoe e Renfree, 1987). O marsúpio (do latim *marsupium*), estrutura localizada no ventre das fêmeas de marsupiais, é uma bolsa de pele que reveste os mamilos onde os filhotes permanecem logo após seu nascimento e, apesar de dar nome à Infraclasse, esta estrutura está ausente na maioria das espécies sul-americanas (Voss e Jansa, 2009; Figuras 1 A e B).

Atualmente a distribuição geográfica dos marsupiais se restringe aos continentes Americano (principalmente na América do Sul e Central, com uma única espécie distribuindo-se na América do Norte) e Australiano (com seis ordens, 74 gêneros e 258 espécies) (Wund e Myers, 2012). Na América do Sul há somente uma ordem, Didelphimorphia Gill, 1872, representada por uma Família, Didelphidae Gray, 1821, quatro Subfamílias, quatro Tribos, 18 gêneros e 97 espécies, todas de pequeno porte (até 2,1 kg) (Voss e Jansa, 2009). A maioria das espécies brasileiras (37 espécies de 55) apresenta hábito escansorial (terrestre e arborícola- 25 espécies) ou arborícola (12 espécies), geralmente habitando ambientes florestais (Paglia *et al.*, 2012).

A Tribo Thylamyini Hershkovitz, 1992 à qual o gênero *Cryptonanus* Voss *et al.*, 2005 pertence, possui outros cinco gêneros: *Chacodelphys* Voss *et al.*, 2004; *Gracilinanus* Gardner e Creighton, 1989; *Lestodelphys* Tate, 1934; *Marmosops* Matschie, 1916 e *Thylamys* Gray, 1843. Quatro gêneros dessa Tribo encontram-se restritos a formações vegetacionais abertas: *Chacodelphys*, *Cryptonanus* (Figuras 1 A e B), *Lestodelphys* e *Thylamys* (Marshall, 1977; Voss *et al.*, 2004, 2005; Carmignotto e

Monfort, 2006; Gardner, 2008). O gênero *Gracilinanus* possui seis espécies com ampla distribuição no continente sul-americano, ocorrendo tanto em formações florestais como em áreas abertas. O gênero *Marmosops* é composto por 15 espécies que habitam apenas formações florestais da América do Sul (Gardner, 2008; Voss e Jansa, 2009).

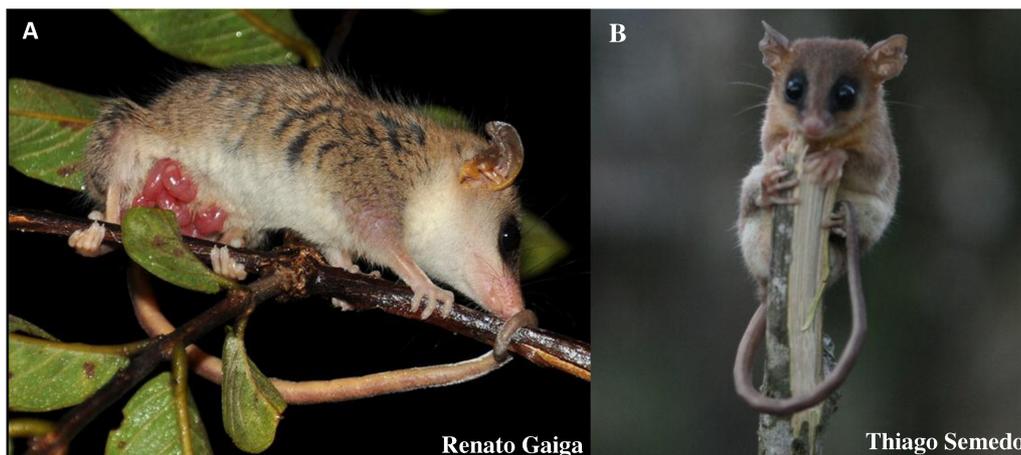


Figura 1. **A.** Espécime de *Cryptonanus agricolai* levando os filhotes no ventre; **B.** Espécime de *Cryptonanus chacoensis* proveniente do Estado de Mato Grosso.

Os gêneros *Chacodelphys* e *Lestodelphys* são monotípicos, com distribuição limitada a ambientes abertos da Argentina (Gardner, 2008). Os gêneros *Cryptonanus* (5 espécies) e *Thylamys* (9 espécies) apresentam ampla distribuição geográfica no território sul-americano, ocorrendo em formações abertas do Peru, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil (Carmignotto e Monfort, 2006; D'Élia e Martínez, 2006; Gardner, 2008; Giarla *et al.*, 2010).

As espécies que atualmente fazem parte do gênero *Cryptonanus* eram consideradas subespécies e/ou espécies do gênero *Gracilinanus* (Gardner e Creighton, 1989; Diaz *et al.*, 2002). Voss *et al.* (2005) descreveram *Cryptonanus* para abranger as espécies morfológicamente distintas das outras espécies de *Gracilinanus*, reconhecendo cinco espécies neste gênero recém descrito: *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943), *C. chacoensis* (Tate, 1931), *C. guahybae* (Tate, 1931), *C. ignitus* (Diaz *et al.*, 2002) e *C.*

undaviensis (Tate, 1931). Registros nos Estados do Ceará, Goiás e Minas Gerais foram considerados pertencentes à *C. agricolai*, apresentando ampla distribuição no Brasil; *C. guahybae* esteve restrito a duas localidades no Estado do Rio Grande do Sul; *C. chacoensis* foi reconhecido para as regiões abertas no norte da Argentina e Paraguai; *C. ignitus* registrado apenas na localidade tipo no norte da Argentina; e *C. undaviensis* encontrado nos ambientes abertos da Bolívia (Voss *et al.*, 2005; Figura 2). Registros de ampliação de distribuição geográfica foram publicados para *C. guahybae*, estendendo a área de distribuição desta espécie no Rio Grande do Sul (Quintela *et al.*, 2011) e para *C. chacoensis*, incluindo localidades no oeste do Brasil (Cáceres *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2010), além de registros de *Cryptonanus* não identificados em nível específico para o Uruguai (D'Élia e Martínez, 2006). A espécie *C. ignitus* está atualmente considerada extinta de acordo com a lista vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), uma vez que não há registros de ocorrência desde 1962 e a área onde o holótipo havia sido encontrado está sendo intensivamente utilizada para a agricultura e indústria (Diaz e Barquez, 2008).

O estudo de Voss e colaboradores (2005) apresentou a diagnose do gênero *Cryptonanus* incluindo a caracterização morfológica das cinco espécies consideradas válidas, com maior representatividade amostral para *Cryptonanus undaviensis* (n=23), *C. chacoensis* (n=16) e *C. agricolai* (n=14); apenas o holótipo de *C. ignitus* e dois indivíduos de *C. guahybae*. Nas análises moleculares, estes autores caracterizaram apenas um espécime de *C. chacoensis* e dois de *C. undaviensis*, inferindo a monofilia do gênero com base na análise do gene nuclear IRBP (*interphotoreceptor retinoid-binding protein*).

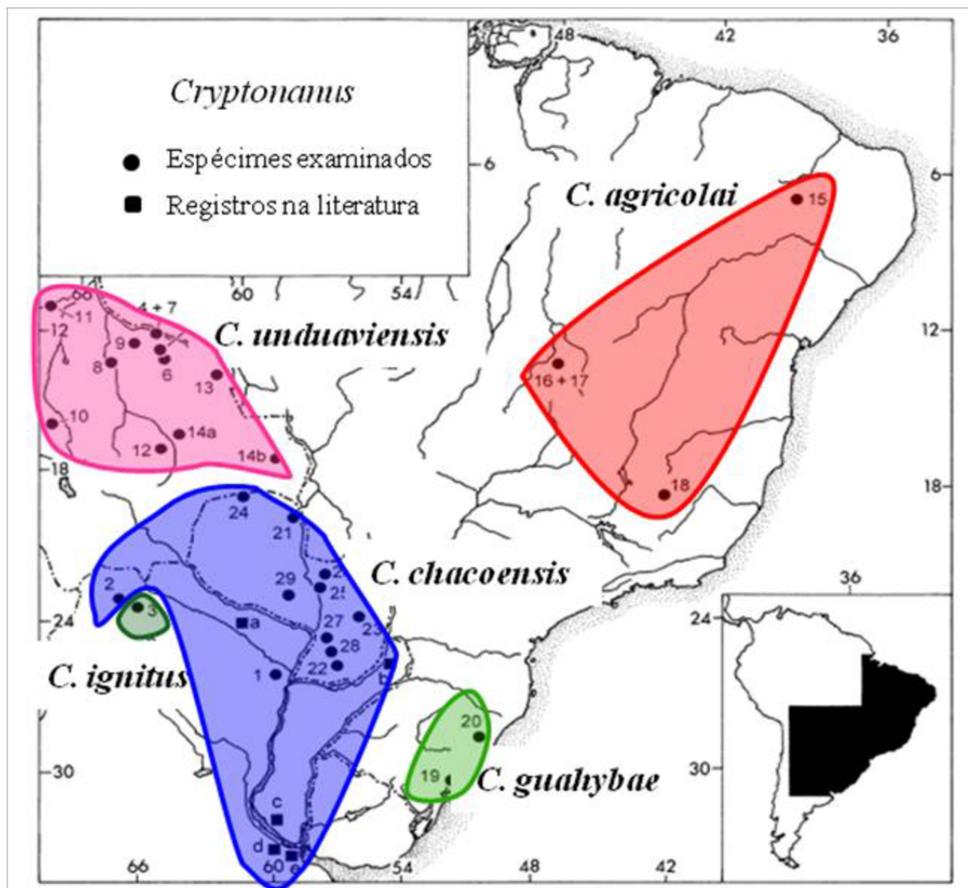


Figura 2. Mapa evidenciando a distribuição geográfica das espécies de *Cryptonanus* reconhecidas por Voss *et al.* (2005). As áreas delimitadas representam a distribuição potencial de *C. agricolai* (vermelho), *C. chacoensis* (azul), *C. gualhybae* (verde claro), *C. ignitus* (verde escuro) e *C. unduaviensis* (rosa). Figura modificada de Voss *et al.* (2005).

Posteriormente, Voss e Jansa (2009) analisaram outros quatro marcadores nucleares destes mesmos três espécimes de *Cryptonanus*: DMP1 (*dentin matrix protein 1* - 1.173 pb); RAG1 (*recombination activating 1 gene* - 2.790 pb); o exon 11 do gene BRCA1 (*breast cancer activating gene 1* - 2.040 pb) e o exon 28 do gene vWF (*von Willebrand Factor gene* - 957 pb) para inferir hipóteses a respeito da relação de parentesco entre *Cryptonanus* e os outros gêneros da Tribo Thylamyini. Entretanto, as análises destes marcadores não recuperaram relações congruentes e a posição de *Cryptonanus* em relação à *Gracilinanus*, *Marmosops*, *Lestodelphys* e *Thylamys* mantêm-se controversa (Voss e Jansa, 2009), não existindo registro de sequências destes marcadores para *Chacodelphys*.

Com exceção dos trabalhos de Voss e colaboradores (2005, 2009), nenhum outro estudo trata do *status* taxonômico do gênero e de suas espécies, existindo apenas alguns trabalhos sobre ampliação de distribuição geográfica, contendo dados inéditos sobre história natural e caracterização morfológica de algumas espécies de *Cryptonanus* (D'Élia e Martínez, 2006; Cáceres *et al.*, 2008; Teta *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2010; Teta e Pardinãs, 2010; Quintela *et al.*, 2011; Câmara e Oliveira, 2012; Rossi *et al.*, 2012). Até o momento não há hipóteses filogenéticas para o gênero *Cryptonanus* que incluam um maior número de táxons e de espécimes que contenham a maior parte da distribuição geográfica do gênero.

Análises realizadas por Carmignotto (2009) identificaram pelo menos quatro morfotipos associados ao gênero *Cryptonanus*, além das espécies reconhecidas por Voss e colaboradores (2005), com exemplares distribuídos na Caatinga, Cerrado e Pantanal e em áreas de transição com a Mata Atlântica. De acordo com Carmignotto (2009), *Cryptonanus agricolai*, como definido por Voss e colaboradores (2005), representa um complexo de espécies. Estes resultados incentivaram a condução de análises que integram dados morfológicos com a caracterização de marcadores moleculares, visando a delimitação dos táxons dentro deste gênero e a realização de inferências filogenéticas para elucidar suas relações de parentesco.

Delimitação de Espécies

A delimitação de espécies é um dos campos mais críticos dentro da sistemática, pois depende da definição de um conceito de espécie, considerando que a especiação é um processo e que a espécie é uma hipótese (Wiens e Penkrot, 2002; Sites e Marshall, 2003).

O processo de especiação mais amplamente conhecido está relacionado com o isolamento geográfico de duas populações de organismos relacionados, fenômeno

conhecido como especiação alopátrica. A separação geográfica pode ocorrer pelo processo de vicariância ou pela dispersão. A especiação também pode ocorrer sem que as populações estejam separadas geograficamente, processo definido como especiação simpátrica, assim como as populações podem se diferenciar dentro da área de dispersão da espécie, processo denominado especiação parapátrica (Mayr, 1963; Tauber e Tauber, 1977; Wood e Guttman, 1983; Schlieven *et al.*, 2006; Coyne e Prince, 2000; Kramer *et al.*, 2003; Savolainen *et al.*, 2006). Segundo Mayr (1963) e Coyne e Orr (2004), a especiação é o resultado do acúmulo de diferenças genéticas entre populações que podem ou não estar isoladas geograficamente.

Entre os conceitos de espécie disponíveis na literatura é consenso de que as espécies são linhagens geneticamente independentes, ou seja, são organismos que possuem uma única linha de ancestralidade e descendência (de Queiroz, 1998). Por questões metodológicas, será utilizado um consenso entre o conceito genético (Bradley e Baker, 2001) e o conceito filogenético (Cracraft, 1983) de espécie para auxiliar a delimitação das espécies de *Cryptonanus* neste estudo.

O conceito genético de espécie é baseado na quantidade de diferenças genéticas encontrada em uma população natural que esteja isolada geneticamente de outra (Bradley e Baker, 2001). A utilização da informação genética para a identificação de espécies é importante principalmente em táxons que passaram recentemente pelo processo de especiação e ainda não desenvolveram diferenças morfológicas que possibilitem sua identificação taxonômica através da morfologia (espécies crípticas) (Roca *et al.*, 2001; Bradley *et al.*, 2004).

O conceito filogenético de Cracraft (1983) considera as espécies como entidades que ocorrem no tempo e no espaço e que apresentam um padrão parental de ancestralidade e descendência; organismos que compartilham caracteres (sinapomorfias).

As filogenias frequentemente auxiliam na delimitação dos grupos reciprocamente monofiléticos, e em conjunto com diferentes tipos de dados, como os valores de distância genética e os caracteres morfológicos, é possível verificar se há congruência entre as diferentes informações sobre a possível história evolutiva do táxon (*e.g.* Giarla *et al.*, 2010, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2010; de la Sancha *et al.*, 2011).

Abordagem de DNA barcode

A abordagem de DNA *barcode* proposta por Hebert *et al.* (2003 a) é baseada em análises comparativas de uma região de 648 pb da extremidade 5' do gene da subunidade I da citocromo oxidase (*coI*), do genoma mitocondrial. O objetivo dessa abordagem está na caracterização de intervalos de valores de variabilidade genética intra e interespecíficos e na identificação de linhagens genéticas independentes.

Apesar de não ser a primeira abordagem a utilizar sequências de DNA para identificação de espécies, a estratégia proposta por Hebert *et al.* (2003 a) incorpora a abordagem em larga-escala e promove a ampliação dos bancos de sequências visando ampla cobertura taxonômica para minimizar erros de amostragem. Esta abordagem tem promovido intenso debate e tem contribuído para auxiliar na identificação e na delimitação de espécies em vários grupos animais (Hebert *et al.* 2004; Ward *et al.* 2005; Barret e Hebert 2005; Mikkelsen *et al.* 2007).

Atualmente o termo DNA *barcode* tem sido usado para referir-se de forma mais genérica (*sensu lato*) à análise de sequências de DNA para a identificação taxonômica, não se restringindo à análise de um único marcador (*coI*), incorporando outras metodologias de análise comparativa e outros métodos de inferência filogenética e, nem sempre, exigindo a identificação ao nível específico (Valentini *et al.*, 2008).

A metodologia utilizada pelos artigos que originalmente caracterizam a análise de DNA barcode (Hebert *et al.*, 2003 a,b), representam a abordagem *sensu stricto* que

calcula valores de divergência genética pelo modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2 parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), os quais são utilizados para gerar uma árvore pelo método de Neighbor Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987) para delimitar as espécies.

A análise de sequências de DNA amplia significativamente o conjunto de dados disponível para a caracterização de limites taxonômicos. Entretanto nem sempre estes dados apresentam resolução necessária devido à complexidade dos cenários evolutivos envolvidos (Mallet e Willmont, 2003; Will *et al.* 2005). Dentre as limitações do uso dessa abordagem para identificação de espécies, destacam-se aquelas que argumentam que apenas a análise da informação da sequência nucleotídica de um único trecho gênico não é suficiente para diagnosticar uma espécie, especialmente sob a perspectiva de que 23% das espécies animais apresentam poli ou parafiletismo para o gene *col*, por exemplo (Funk e Omland, 2003). Entretanto, um cenário que integra esforços de descrição morfológica e identificação de espécies por abordagens tradicionais de taxonomia e sistemática com análises de marcadores moleculares tem sido proposto como uma estratégia eficiente para compor inventários de biodiversidade (Dayrat, 2005; Padial e De La Riva, 2007; Padial *et al.*, 2010; Riedel *et al.*, 2013).

Estado da arte no estudo de sequências nucleotídicas do DNA nos marsupiais sulamericanos

Dentre as 97 espécies dos 18 gêneros da Família Didelphidae (Voss e Jansa, 2009), 82 apresentam sequências de DNA disponíveis no GenBank (Fevereiro 2014 – www.ncbi.nlm.nih.gov). No caso da Tribo Thylamyini, três gêneros (*Thylamys*, *Marmosops* e *Gracilinanus*) estão mais representados na base de dados considerando sequências de DNA mitocondrial (Tabela 1).

Buscas por dados sobre marsupiais na base BOLD (*Barcode of Life Data Systems* – Ratnasingam e Hebert, 2007) registraram sequências de DNA *barcodes* para 20 espécies da família Didelphidae associadas a seis projetos da campanha “Mammalia barcode of life” (Fevereiro 2014 – www.mammaliabol.org). Na base do Genbank, 30 espécies apresentaram sequências para a região *col*, e destas, somente *Monodelphis domestica* possui o genoma mitocondrial sequenciado. A análise de sequências de *col* em marsupiais neotropicais para fins de identificação taxonômica tem sido pouco explorada na literatura (Agrizzi *et al.*, 2012).

Tabela 1. Dados de sequências do *col* e *cytb* depositadas no Genbank (Fevereiro 2014) para os gêneros da Tribo Thylamyini.* = espécies atualmente válidas para cada gênero segundo Voss e Jansa (2009), n = número de registros no GenBank e N = número de espécies de cada gênero com registros no GenBank.

Gêneros	Espécies*	Registros no Genbank	<i>col</i> n/N	<i>cytb</i> n/N
<i>Chacodelphys</i>	1	0	0	0
<i>Cryptonanus</i>	5	18	0	4/3
<i>Gracilinanus</i>	6	271	6/1	95/4
<i>Lestodelphys</i>	1	7	0	2/1
<i>Marmosops</i>	15	201	87/5	27/5
<i>Thylamys</i>	9	2016	1/1	193/9

O DNA mitocondrial (DNAmt) tem sido amplamente utilizado em análises taxonômicas e filogenéticas por apresentar características que o tornam um marcador potencialmente informativo (Meyer, 1994; Avise, 1994, 2009; Goto e Kimura, 2001; Othman, 2012): 1- taxa de substituição nucleotídica geralmente mais alta que a taxa descrita para o genoma nuclear, 2- facilidade operacional nas etapas de amplificação e sequenciamento, 3- abundância no número de caracteres analisados em relação aos estudos baseados somente em caracteres morfológicos, 4- ausência de íntrons ou de eventos de recombinação, 5- condição haplóide e herança predominantemente materna.

Em vertebrados, trechos de sequência do gene citocromo b (*cytb*) do genoma mitocondrial são mais bem caracterizados e amplamente usados como marcador molecular em análises de delimitação de espécies e em reconstruções filogenéticas, especialmente considerando as relações de parentesco dentro de gêneros (Meyer, 1994; Johns e Avise, 1998; Nicolas *et al.*, 2012). No caso dos marsupiais neotropicais, o gene *cytb* é o marcador mais estudado até o momento (*e.g.* Patton *et al.*, 1996; Costa, 2003; Giarla *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2010; Solari, 2011). Steiner e Catzeflis (2004) analisaram sequências nucleotídicas de *cytb* para determinar valores de divergência intraespecífica para diferentes espécies de marsupiais da Família Didelphidae visando detectar padrões de estrutura geográfica na região da Guiana. Hajibabaei *et al.* (2007) e Agrizzi *et al.* (2012) mostraram que as sequências do gene *col* também são eficientes para inferir delimitações taxonômicas em mamíferos, com mesmo potencial informativo que as tradicionais análises de sequências do gene *cytb*.

OBJETIVOS

GERAL:

- Investigar o *status* taxonômico das espécies do gênero *Cryptonanus* com o auxílio da análise de sequências nucleotídicas referentes à subunidade I do gene citocromo oxidase c (*col*) e ao gene citocromo b (*cytb*) do genoma mitocondrial.

ESPECÍFICOS:

- Caracterizar as frequências, os valores e os intervalos de variação genética intra e interespecífica associados ao gênero *Cryptonanus* considerando-se diferentes cenários evolutivos;
- Inferir hipóteses filogenéticas para elucidar as relações entre táxons do gênero *Cryptonanus*, verificando-se a monofilia do gênero;

- Definir possíveis cenários taxonômicos/evolutivos envolvendo a integração de dados referentes à distribuição das frequências e valores de variação genética inter e intraespecífica, à caracterização de linhagens genéticas independentes e à congruência entre os táxons propostos e seus padrões de distribuição geográfica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram obtidos 781 pb do gene citocromo b (*cytb*) para 62 espécimes e 743 pb do gene citocromo oxidase I (*coI*) para 54 espécimes de *Cryptonanus* de um total de 65 amostras. As análises integrando os dois conjuntos de dados (análise concatenada) foram realizadas para 51 espécimes. Todos os espécimes foram analisados morfologicamente pela Profª. Dra. Ana Paula Carmignotto, especialista na taxonomia do grupo.

Esta amostragem está distribuída em 40 localidades distintas de formações abertas da Argentina, Brasil, Bolívia e Paraguai (Figura 3; ANEXOS I e IV). As amostras incluem material representativo de quatro táxons reconhecidos como espécies válidas por Voss *et al.* (2005): *Cryptonanus agricolai*, *C. chacoensis*, *C. guahybae* e *C. unduaviensis*. A espécie *C. ignitus* foi a única espécie do gênero que não foi analisada neste estudo por falta de material disponível para condução de análises moleculares. Essa amostragem preenche lacunas de registros na área de distribuição previamente conhecida para o gênero (Voss *et al.*, 2005), ampliando significativamente o número de ocorrências, especialmente no território brasileiro, além de aumentar a representatividade de espécimes de *Cryptonanus* em análises moleculares (anteriormente, n=3 em Voss *et al.*, 2005; Voss e Jansa, 2009).

Sequências depositadas no Genbank para o gene *cytb* identificadas como pertencentes à *C. agricolai* (amostra LBCE 7486) com ocorrência em Goiás (Faria *et al.* 2013) e *C. chacoensis* (GD 521) oriundas do Paraguai (Teta *et al.*, 2009) foram incluídas para ampliar a amostragem, totalizando 67 amostras de 42 localidades (Figura 3; ANEXOS II e IV). Sequências homólogas pertencentes a outros representantes da Tribo Thylamyini incluindo espécies dos gêneros *Gracilinanus* (n= 10 para *cytb* e n= 9

para *col*), *Marmosops* (n= 6 para *cytb* e n= 5 para *col*), *Lestodelphys* (n= 1 para *cytb* e n= 0 para *col*) e *Thylamys* (n= 11 para *cytb* e n= 3 para *col*), foram utilizadas como grupo externo (ANEXOS II e III). Além disso, sequências da espécie *Monodelphis domestica* (n=1 para *cytb* e n= 1 para *col*), pertencente à Tribo Marmosini Hershkovitz, 1992, foram utilizadas nas análises como uma referência externa à Tribo Thylamyini por apresentar relações de parentesco bem distantes deste grupo, sendo o gênero menos relacionado filogeneticamente dentro da Subfamília Didelphinae (Voss e Jansa, 2009) (ANEXO III).

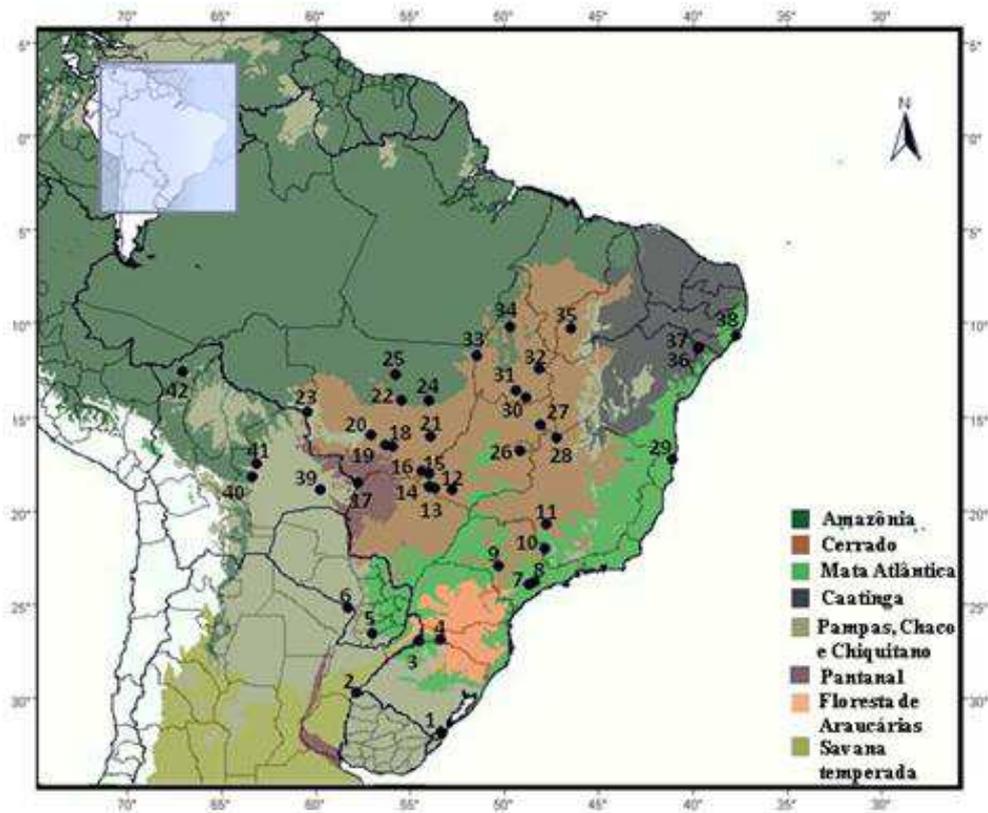


Figura 3. Mapa central da América do Sul apresentando a distribuição dos registros dos espécimes de *Cryptonanus* analisados. As ecorregiões estão delimitadas de acordo com Olson *et al.* (2001). Os números correspondem às localidades e espécimes citados nos ANEXOS I e IV.

Extração, amplificação e sequenciamento

As amostras analisadas estão depositadas nas seguintes instituições: Coleção de Mamíferos do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) (n=25), Coleção de Tecidos de Vertebrados do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) (n=14), Coleção de Mamíferos do Museum of Southwestern Biology (MSB), Albuquerque, EUA (n=5), Coleção de Mamíferos da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) (n=3), Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (n=1) e Coleção de Tecidos do Centro Nacional Patagônico (CENPAT), Argentina (n=1). O restante foi obtido através de doação dos próprios pesquisadores coletores dos espécimes: Alexandra M. R. Bezerra (ARB, n=8), Renata Pardini (FB, FU n=3), Geruza Melo (GMC, n=2) e Jonas Sponchiado (JE, JS n=3) (ANEXO I).

Os tecidos analisados estavam preservados em -80°C (biofreezer) ou em etanol absoluto refrigerado a -20°C (freezer). As extrações de DNA foram realizadas a partir de dois métodos: 1- extração salina utilizando NaCl/SDS/Proteinase K (Bruford *et al.*, 1992) e 2- sistema de purificação Wizard® SV Genomic DNA (Promega Corp.), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Corp.) ou em gel de agarose 2% e foi diluído para a concentração de 20 ng/μl. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C (refrigerador) até o uso em etapas posteriores.

A amplificação de aproximadamente 800 pb da região *col* foi realizada com a utilização de *primers* táxon-específicos (LCO1490mod e HCO2288mod) que flanqueiam a região *barcode* do gene (Figura 4; Barban *et al.*, 2009). Para o gene *cytb* foram amplificados aproximadamente 900 pb também utilizando *primers* táxon-

específicos (MVZ05mod e MVZ16mod) (Figura 5; Jaqueline Vilella Barban, comunicação pessoal).

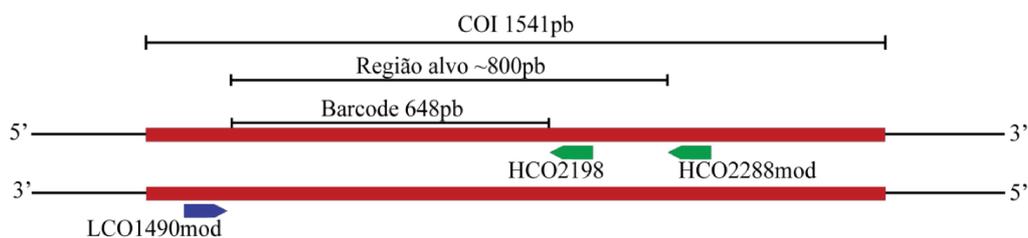


Figura 4. Ilustração representando a localização dos *primers* táxon-específicos que flanqueiam a região *barcode*. Os *primers* utilizados para a amplificação da região alvo estão indicados por setas azuis (LCO1490mod) e verdes (HCO2288mod) que estão localizadas nos sítios de hibridação de cada *primer*. O *primer* HCO2198, utilizado para a amplificação da região *barcode* segundo Herbert *et al.* (2003), está indicado como referência.

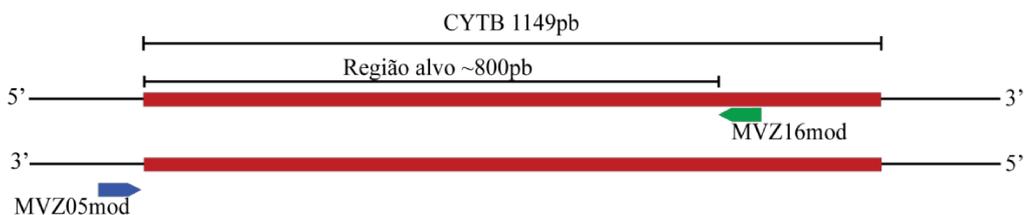


Figura 5. Ilustração representando a localização dos *primers* táxon-específicos para o gene *cytb* (Jaqueline Vilella Barban, comunicação pessoal). Os *primers* utilizados para a amplificação da região alvo estão indicados por setas azuis (MVZ05mod) e verdes (MVZ16mod) que estão localizados nos sítios de hibridação de cada *primer*.

A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25 μ l. Foram testadas diferentes concentrações de reagentes para otimizar as concentrações de *primers*, magnésio ($MgCl_2$), dNTP's e de *Taq* DNA polimerase na reação de amplificação. A amplificação de ambas as regiões alvo foi padronizada em 2 mM de $MgCl_2$, 0,25 μ M de *primers*, 50 μ M de dNTP's, 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase, 20 a 40 ng de DNA extraído e 1X tampão de reação.

A otimização das condições referentes aos ciclos de PCR no termociclador para a região alvo do gene *col* resultou em um programa contendo: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos com etapas de desnaturação de DNA a 94°C por 1 minuto, hibridação de *primers* a 45°C por 1 minuto e síntese de DNA a 60°C por 2 minutos; acrescido de um ciclo final de extensão da polimerização de 10 minutos a 60°C. Com relação à amplificação da região alvo do gene *cytb*, as condições programadas no termociclador foram: 94°C por 4 minutos; 30 ciclos com etapas de desnaturação de DNA a 94°C por 1 minuto, hibridação de *primers* a 52°C por 1 minuto e síntese de DNA a 72°C por 2 minutos; acrescido de um ciclo final de extensão da polimerização por 10 minutos a 72°C. As etapas de amplificação foram conduzidas em termocicladores Techne TC-5000 (Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK) e Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburg, GE).

A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando as enzimas *Exo I* (Exonuclease I) e *FastAP* (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) de acordo com o protocolo adaptado pelo Núcleo de Genética aplicada à Conservação da Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo, utilizando 1 µl de *Exo I* e 2 µl de *FastAP* diluídos em 4 µl de água miliQ autoclavada para 20 µl de produto de PCR. Esta reação foi incubada por meia hora a 37°C. O sistema de purificação Wizard SB Gel and PCR Clean-up system (Promega Corp.) também foi utilizado na etapa de purificação dos produtos de PCR, segundo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados contendo 20 ng/µl seguiram para serviço de sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

Análises das sequências nucleotídicas

Todos os cromatogramas foram analisados utilizando o programa Chromas Pro v.1.5 (Technelysium Pty, Ltd) e editados manualmente para conferir a qualidade do sequenciamento e definir a sequência nucleotídica final. Posteriormente, as sequências nucleotídicas foram traduzidas para verificar a presença de eventuais *stop*-códon. Os alinhamentos múltiplos e comparações par-a-par das sequências nucleotídicas foram realizados utilizando o programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) e MAFFT (Kato *et al.*, 2005) segundo os parâmetros pré-estabelecidos em cada programa.

Foram realizadas análises no banco de dados do NCBI (Genbank) com o recurso BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para caracterização inicial das sequências nucleotídicas e detecção de possíveis erros operacionais.

Análise de DNA barcode

Foram realizadas análises de divergências genéticas calculadas par-a-par utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura–dois–parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Considerando os valores de distância genética foram calculadas as distribuições das frequências dos intervalos de variação intra e interespecífica. A definição dos intervalos de variação como sendo intra ou interespecíficos depende de como será atribuída identidade taxonômica às amostras de *Cryptonanus*. Este aspecto está apresentado no próximo item “Critérios para delimitar as espécies”.

A matriz de distâncias K2P foi utilizada para reconstruir uma árvore a partir do método de Neighbor Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987). Os suportes dos ramos foram

calculados usando 1.000 réplicas de *bootstrap* a partir de aplicativos do MEGA v.5.05, (Tamura *et al.*, 2011).

As matrizes de distância K2P obtidas para as regiões alvo do gene *coI* e do *cytb* foram comparadas pelo teste de correlação de Mantel (Mantel, 1967) para verificar se existe correlação entres os dois conjuntos de dados analisados. Todas as estimativas de parâmetros para o teste de Mantel foram realizadas com o programa GENALEX6 (Peakall e Smouse, 2006).

Critérios para delimitar as espécies

Foram estabelecidas duas hipóteses para a delimitação das espécies com base nas linhagens genéticas recuperadas pela topologia resultante da análise de Neighbor-Joining utilizando os dados de distância genética. Na primeira hipótese, os membros dos agrupamentos mais basais e abrangentes foram identificados como sendo da mesma espécie, e a variação intraespecífica foi calculada com base nas comparações entre espécimes do mesmo agrupamento. A variação interespecífica foi considerada como sendo aquela encontrada nas comparações entre espécimes provenientes de agrupamentos distintos. O nome atribuído a cada agrupamento recuperado nesta primeira hipótese foi baseado na proximidade dos espécimes contidos em cada grupo bem suportado com a localidade tipo dos táxons reconhecidos como válidos por Voss *et al.* (2005). Portanto, as espécies do agrupamento composto por amostras geograficamente próximas ao Ceará (Crato, CE localidade tipo de *C. agricolai*) foram consideradas pertencentes ao táxon *C. agricolai* e aquelas do agrupamento contendo espécimes do Rio Grande do Sul foram consideradas como *C. guahybae* (a localidade tipo situa-se na Ilha Guaíba, perto de Porto Alegre, RS). O espécime GD 521 foi considerado como sendo da espécie *C. chacoensis* com base na análise de Voss *et al.*

(2005), além disso, situa-se próximo da localidade tipo desta espécie, em Sapucaí no Paraguai, de forma que os espécimes pertencentes a este agrupamento foram considerados *C. chacoensis*. Os espécimes NK 14234 e NK 12313 foram considerados como *C. unduaviensis* segundo Voss *et al.* (2005).

Na segunda hipótese os clados internos aos agrupamentos reconhecidos na hipótese anterior foram considerados táxons distintos, seguindo esta estrutura para definição das análises intra e interespecíficas. Os nomes atribuídos aos diferentes agrupamentos seguiram o mesmo critério definido anteriormente, porém, as categorias foram subdivididas e identificadas com letras maiúsculas baseadas no nome da espécie reconhecida nestes agrupamentos (ex. *Cryptonanus agricolai* da hipótese 1 foi subdividido em *C. agricolai* A – incluindo o espécime mais próximo da localidade tipo, *C. agricolai* B e *C. agricolai* C).

Análises filogenéticas

A edição dos arquivos de entrada para os programas TNT v.1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) e Mr. Bayes v.3.2.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) foram realizadas no programa Mesquite v. 2.75 (Maddison e Maddison, 2010). O modelo evolutivo mais adequado para cada conjunto de dados foi definido utilizando o programa JModeltest v.0.1.1 (Posada, 2008) com base no critério AIC (*Akaike information criterion* – Akaike, 1976).

As reconstruções filogenéticas foram realizadas por meio de três métodos: 1- Máxima Parcimônia (MP) utilizando o programa TNT v.1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) com uma busca tradicional, iniciada com uma árvore de Wagner e o método TBR para encontrar a melhor árvore. Foram feitas 10 réplicas e os suportes dos ramos foram determinados por 1.000 pseudo-réplicas de *bootstrap*; 2- Máxima Verossimilhança

(ML) utilizando o programa RAxML v.7.0.3 (Stamatakis, 2006) utilizando-se o teste não paramétrico de *bootstrap* com um total de 1.000 pseudo-replicações; e 3- análise Bayesiana (PBB) utilizando o programa Mr. Bayes v.3.2.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), mantendo o MCMC (Markov Chain Monte Carlo) em 10×10^6 gerações. Foi amostrada uma árvore a cada 1.000 gerações e os arquivos de saída do Mr. Bayes foram analisados no programa Tracer v.1.5 (Rambaut e Drummond, 2007), descartando-se 25% das primeiras árvores geradas (*burn-in*). As árvores obtidas nas análises de inferência bayesiana e máxima verossimilhança foram visualizadas e editadas no programa Fig Tree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

Mapas representando a estruturação geográfica

Os mapas com os registros de ocorrências dos espécimes de *Cryptonanus* analisados foram produzidos utilizando o programa Global Mapper v.13 (Blue Marble Geographics Software LLC.). Foram utilizados as ecorregiões delimitadas de acordo com Olson *et al.*, (2001).

RESULTADOS

Análise de DNA barcode

A análise de correlação entre as distâncias K2P obtidas para as sequências das regiões alvo dos genes *cytb* e *coI* foi estatisticamente significativa ($R=0,871$; $P < 0,001$), indicando que a variação genética observada na região analisada para estes dois marcadores apresenta alta correlação ($R^2=75,9\%$) (Figura 6).

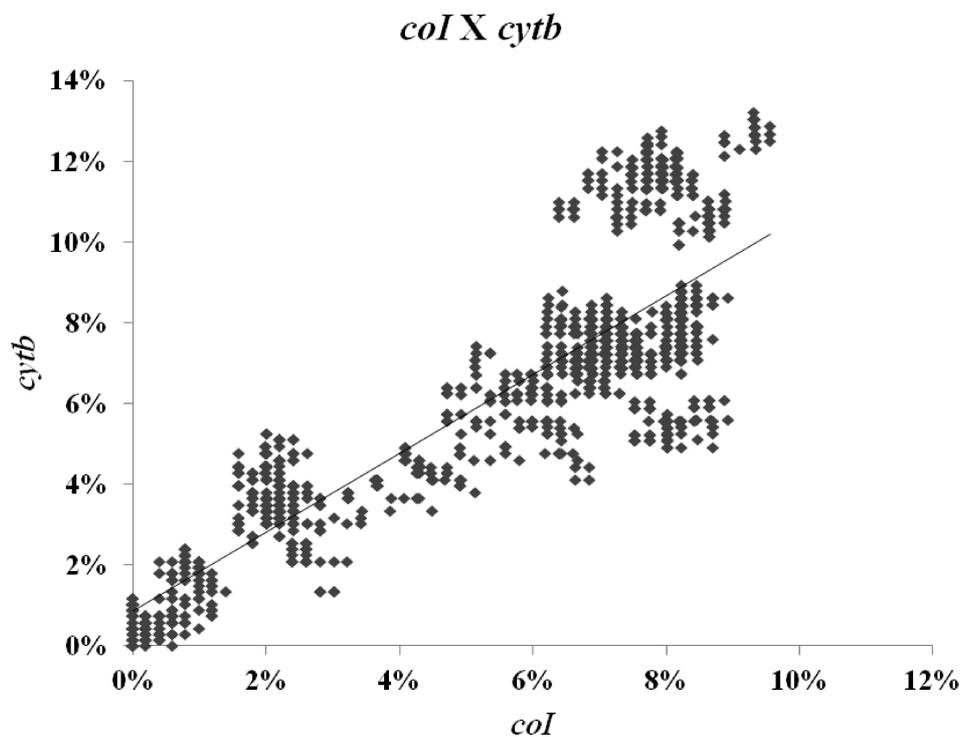


Figura 6. Correlação entre as divergências genéticas calculadas par a par pelo modelo de distância K2P para as sequências de *coI* e *cytb* para 51 amostras de *Cryptonanus*.

Na análise de correlação é possível distinguir três grupos de dados, o primeiro com valores de distância inferiores a 2%, o segundo com valores entre 2 a 10% e o terceiro com valores acima de 10% encontrado apenas para o *cytb*.

Todos os espécimes de *Cryptonanus* formaram um único grupo monofilético, fortemente suportado (99% de *bootstrap* para *cytb* e 100% para *coI*) nas análises de Neighbor-Joining. Os resultados referentes às relações co-genéricas das espécies do gênero *Cryptonanus* estão apresentados considerando um cenário mais conservador (Hipótese 1), mantendo a identificação das espécies válidas de *Cryptonanus* conforme proposto por Voss *et al.* (2005); e um cenário que reconhece uma maior diversidade de táxons neste gênero (Hipótese 2).

Hipótese 1

Os agrupamentos considerados na primeira hipótese estão representados nas topologias recuperadas pelas análises de Neighbor Joining (NJ) para *coI* e *cytb* (Figuras 7 e 8). As espécies de *Cryptonanus* foram agrupadas em quatro grupos principais com elevados suportes de *bootstrap* (variaram de 97 a 100%) tanto na árvore recuperada pela região alvo do *cytb* quanto para a de *coI*: 1- *C. unduaviensis*; 2- *C. gualhybae*; 3- *C. agricolai*; 4- *C. chacoensis*. O espécime LBCE 7486 está identificado como *C. agricolai* no Genbank, entretanto, agrupa-se com espécimes aqui reconhecidos como *C. chacoensis* (Figura 7).

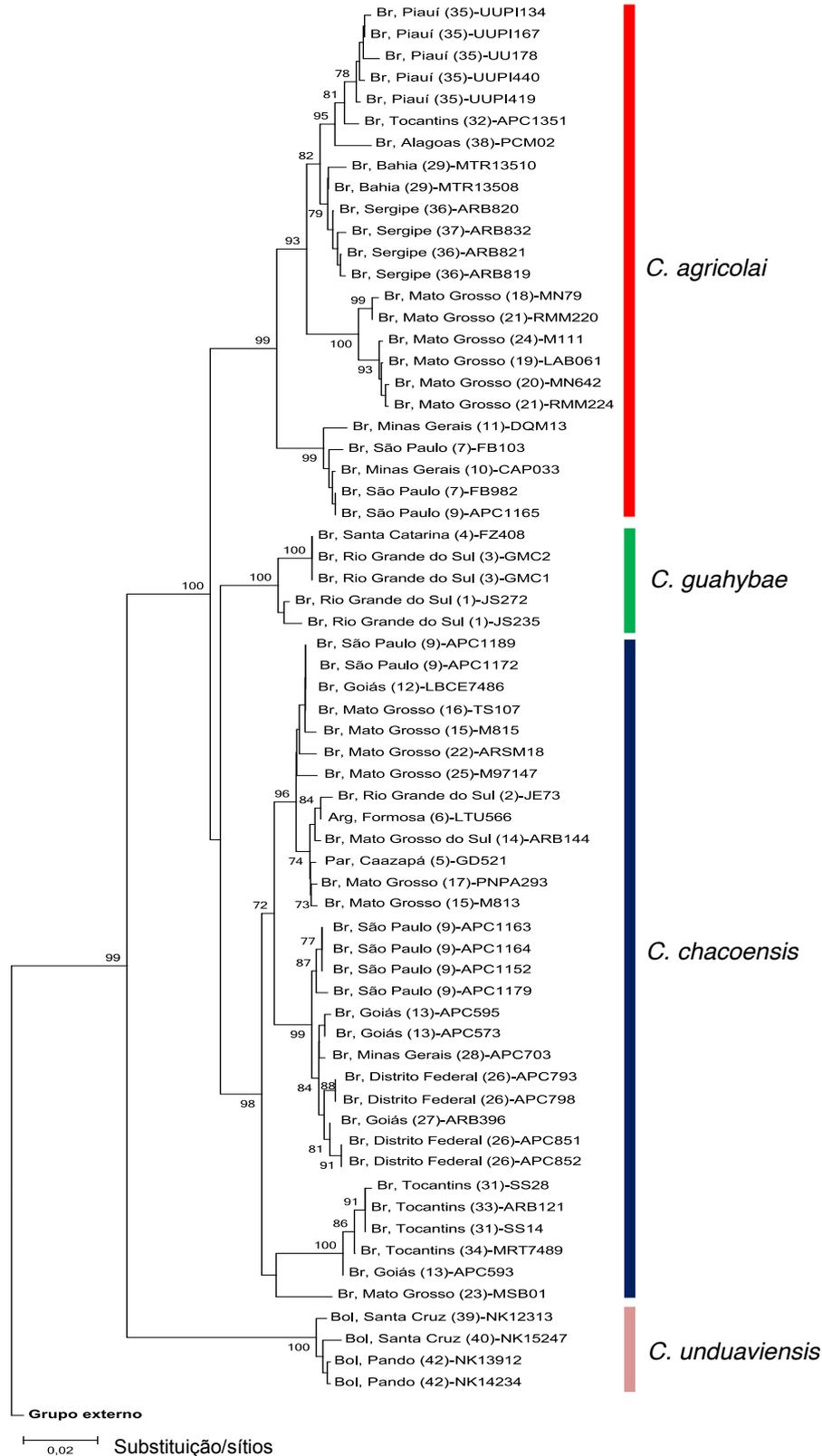


Figura 7. Topologia obtida a partir da análise de 781 pb de uma região do gene *cytb* para 64 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 1. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

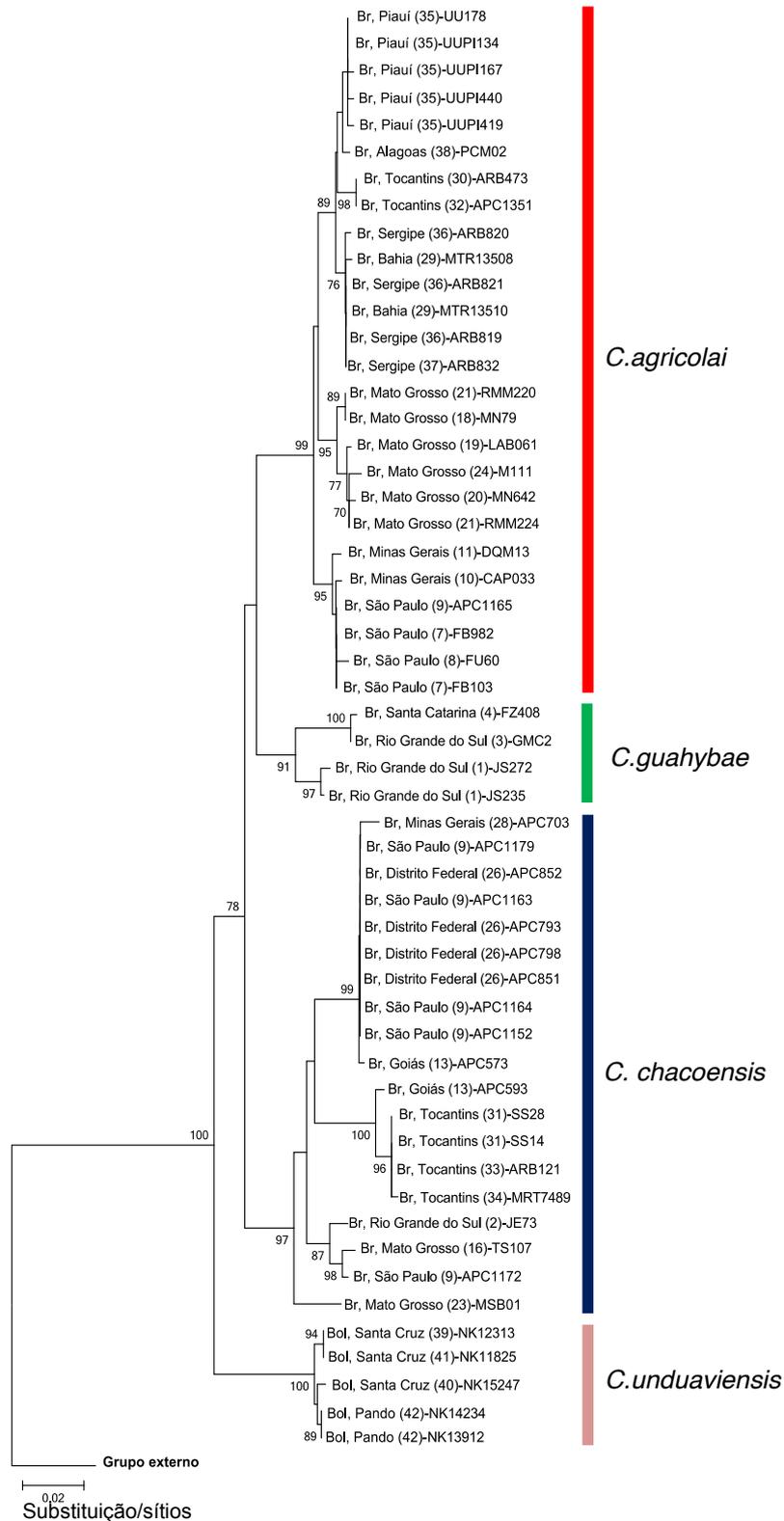


Figura 8. Topologia obtida a partir da análise de 743 pb de uma região do gene *col* para 54 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 1. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

Os valores de distância genética intraespecíficos nessa primeira hipótese variaram de 0 a 5,3% e de 0 a 5,1% nas análises das sequências de *cytb* e *col*, respectivamente. Os valores de distância interespecífica variaram de 4,1 a 13,2% para o *cytb* e de 4,7 a 9,6% para o *col* (Figura 9; Tabelas 2 e 3). As médias dos valores intraespecíficos calculadas para cada agrupamento da hipótese 1 encontram-se na Tabela 4.

Ao analisar os intervalos das distâncias intra e interespecíficas referentes às sequências de *col* e *cytb* não foi observado um *barcoding gap*, ou seja, não foi identificada uma lacuna entre o maior valor de distância intra e o menor valor de distância interespecífica (Figura 9). Porém, a sobreposição entre intervalos de valores intra e interespecíficos foi pequena (de 4,7% a 5,3% em *cytb* e de 4,7% a 5,1% em *col*). As análises comparativas que caracterizam esta sobreposição incluem valores de distâncias intraespecíficas em *C. chacoensis* (máximo de 5,1% para *col* e 4,9% para *cytb*) e distâncias interespecíficas entre espécimes de *C. guahybae* e *C. agricolai* (mínimo de 4,7% para *col* e 4,6% para *cytb*). Para os dados de *cytb* também houve sobreposição entre valores intraespecíficos em *C. agricolai* (máximo de 5,3%) e distância interespecífica encontrada entre *C. guahybae* e *C. chacoensis* (mínimo de 4,6%).

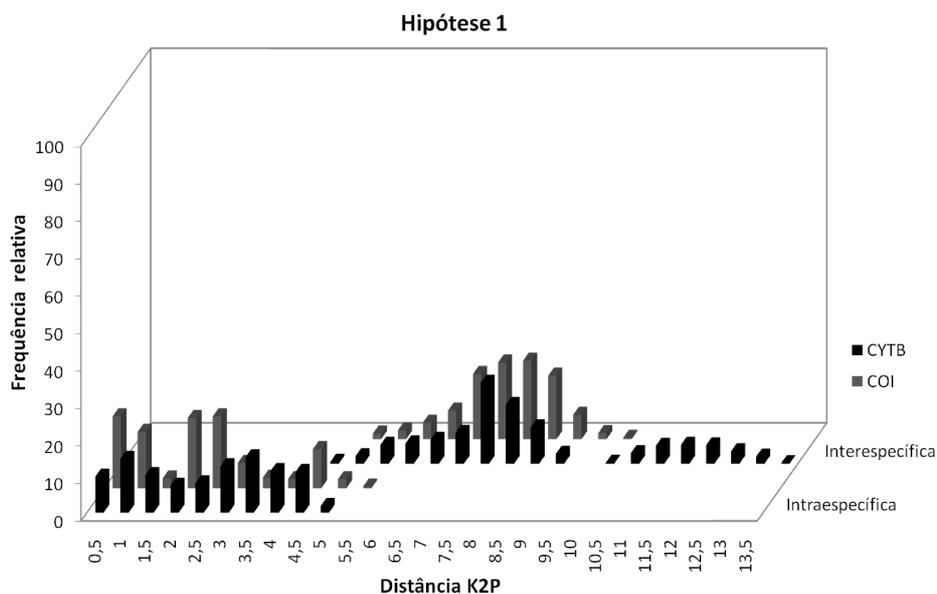


Figura 9. Distribuição das frequências de valores de divergência genética intra e interespecíficas baseadas no modelo de distância K2P para as sequências de *col* e *cytb* considerando a Hipótese 1.

É possível observar que os valores interespecíficos de *cytb* são maiores em relação aos valores interespecíficos de *col* (Figura 10).

Os intervalos de variação intra e interespecífica descritos anteriormente foram calculados considerando simultaneamente os dados das quatro espécies de *Cryptonanus*, entretanto, quando os dados de *col* são analisados separadamente (por espécie) não há sobreposição entre os intervalos de distribuição destes valores, caracterizando o *barcoding gap* nestas análises (Figuras 10 a 13; Tabelas 2 e 3). Para os dados de *cytb* foi possível verificar *barcoding gap* apenas nas análises realizadas separadamente para *C. unduaviensis* e *C. guahybae* (Figuras 10 e 11). Nas análises interespecíficas, as comparações envolvendo espécimes de *C. unduaviensis* resultaram nos intervalos com maiores valores de distância genética dentro do gênero *Cryptonanus* (6,4 a 9,6% para o *col* e de 10 a 13,2% para o *cytb*), sem sobreposição com os intervalos de variação intraespecífica (Figura 10). Para *C. guahybae*, também não houve sobreposição entre os intervalos de distribuição das distâncias calculadas nas análises de ambos os

marcadores. Esta espécie apresenta, ainda, dois agrupamentos distintos, um deles contendo espécimes registrados no extremo sudeste do Rio Grande do Sul (JS235 e JS272) e outro contendo amostras oriundas da região noroeste do Rio Grande do Sul e sudoeste de Santa Catarina (GMC2 e FZ408, respectivamente) (Figuras 7, 8 e 11).

Tabela 2. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região *cytb* considerando-se a Hipótese 1. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica.

	1	2	3	4
1 <i>C. agricolai</i>	0 ~ 0,053			
2 <i>C. chacoensis</i>	0,062 ~ 0,089	0 ~ 0,049		
3 <i>C. guahybae</i>	0,046 ~ 0,074	0,041 ~ 0,061	0 ~ 0,013	
4 <i>C. unduaviensis</i>	0,110 ~ 0,126	0,100 ~ 0,132	0,103 ~ 0,110	0,003 ~ 0,009

Tabela 3. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região *coI* considerando-se a Hipótese 1. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica.

	1	2	3	4
1 <i>C. agricolai</i>	0 ~ 0,026			
2 <i>C. chacoensis</i>	0,064 ~ 0,087	0 ~ 0,051		
3 <i>C. guahybae</i>	0,047 ~ 0,067	0,062 ~ 0,089	0,002 ~ 0,030	
4 <i>C. unduaviensis</i>	0,071 ~ 0,084	0,073 ~ 0,096	0,064 ~ 0,075	0 ~ 0,006

Tabela 4. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências das regiões alvo dos genes *cytb* e *coI* considerando a Hipótese 1. Estão representadas as médias, o mínimo e o máximo, o número amostral (n) e o número de localidades (N) para cada agrupamento.

Espécies	n/N	<i>cytb</i> distância genética (%)			<i>coI</i> distância genética (%)		
		Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
<i>C. agricolai</i>	24/19	0	5,3	3,2	0	2,6	1,8
<i>C. chacoensis</i>	19/10	0	4,9	3,2	0	5,1	3,0
<i>C. guahybae</i>	4/3	0	1,3	1,3	0,2	3,0	2,8
<i>C. unduaviensis</i>	4/3	0,3	0,9	0,7	0	0,6	0,5

A análise da distribuição dos valores de frequência e distância genética intraespecífica para o agrupamento com espécimes de *C. agricolai* permitiu verificar a ocorrência de duas modas para o *coI* e três para o *cytb* (Figura 12). Esta mesma situação ocorreu no grupo de *C. chacoensis*, porém com três modas para os dois marcadores (Figura 13).

É possível observar que nos grupos representados por *C. agricolai*, *C. chacoensis* e *C. guahybae* os valores interespecíficos separaram-se em duas modas. A moda com valores maiores representa as comparações entre as outras espécies e *C. unduaviensis* (Figuras 11, 12 e 13).

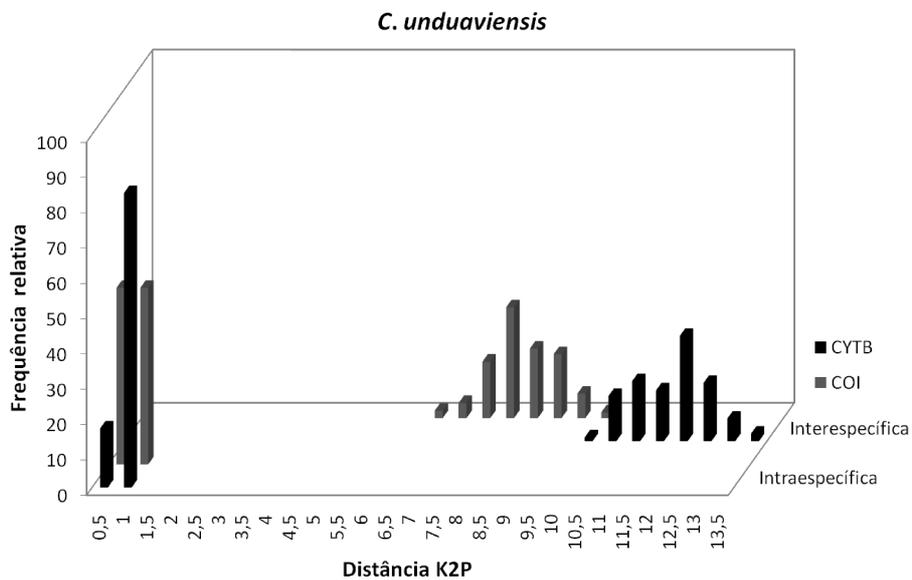


Figura 10. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. unduaviensis* (análise intraespecífica) e entre *C. unduaviensis* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.

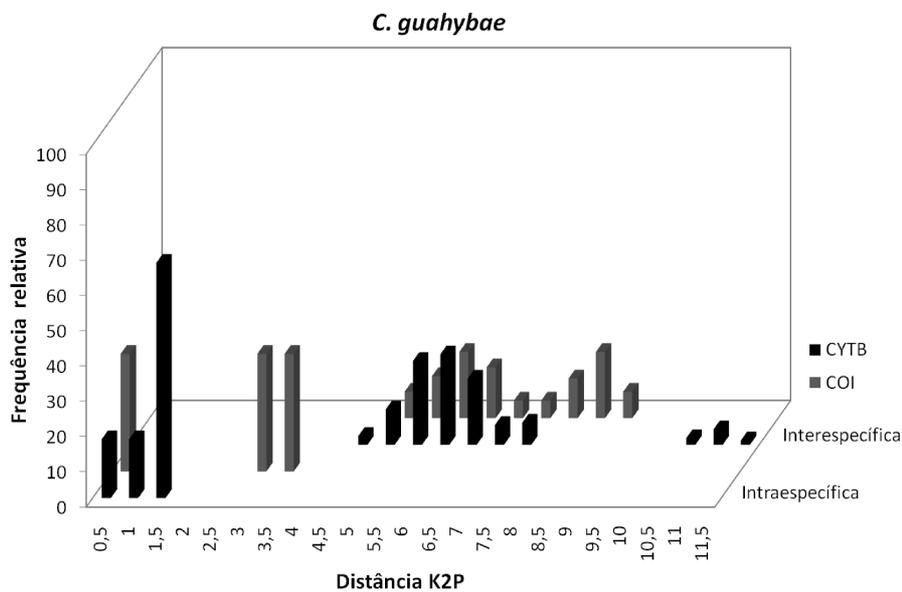


Figura 11. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. guahybae* (análise intraespecífica) e entre *C. guahybae* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.

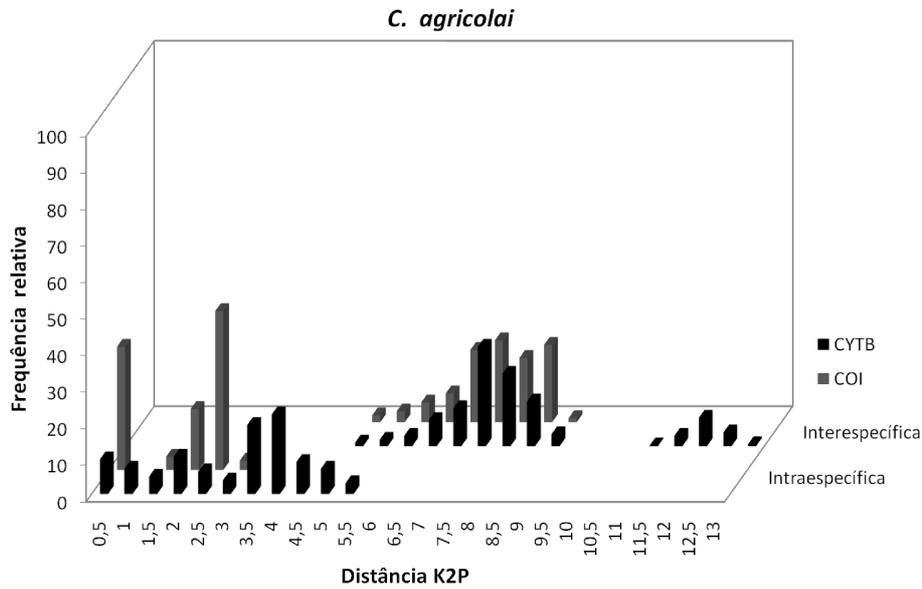


Figura 12. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. agricolai* (análise intraespecífica) e entre *C. agricolai* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.

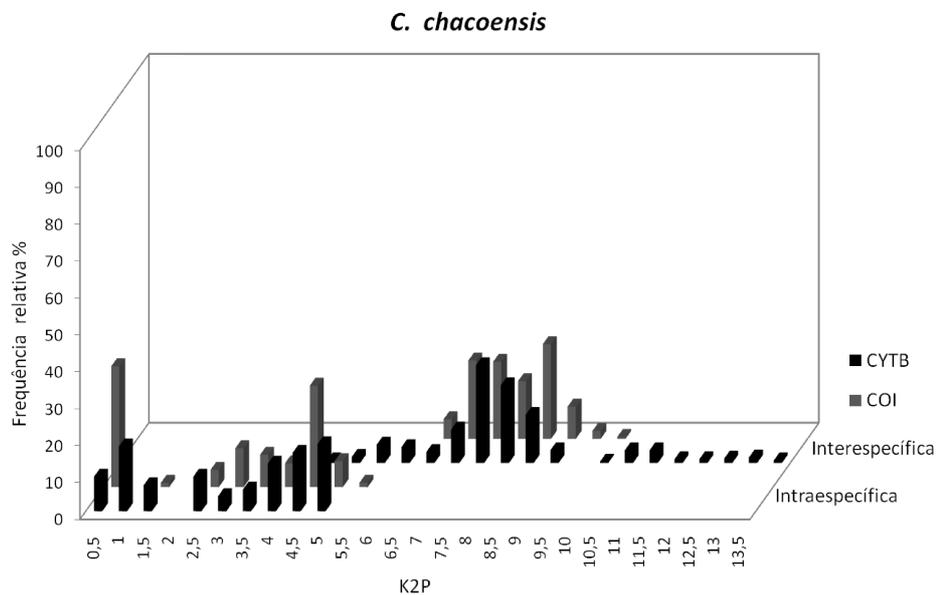
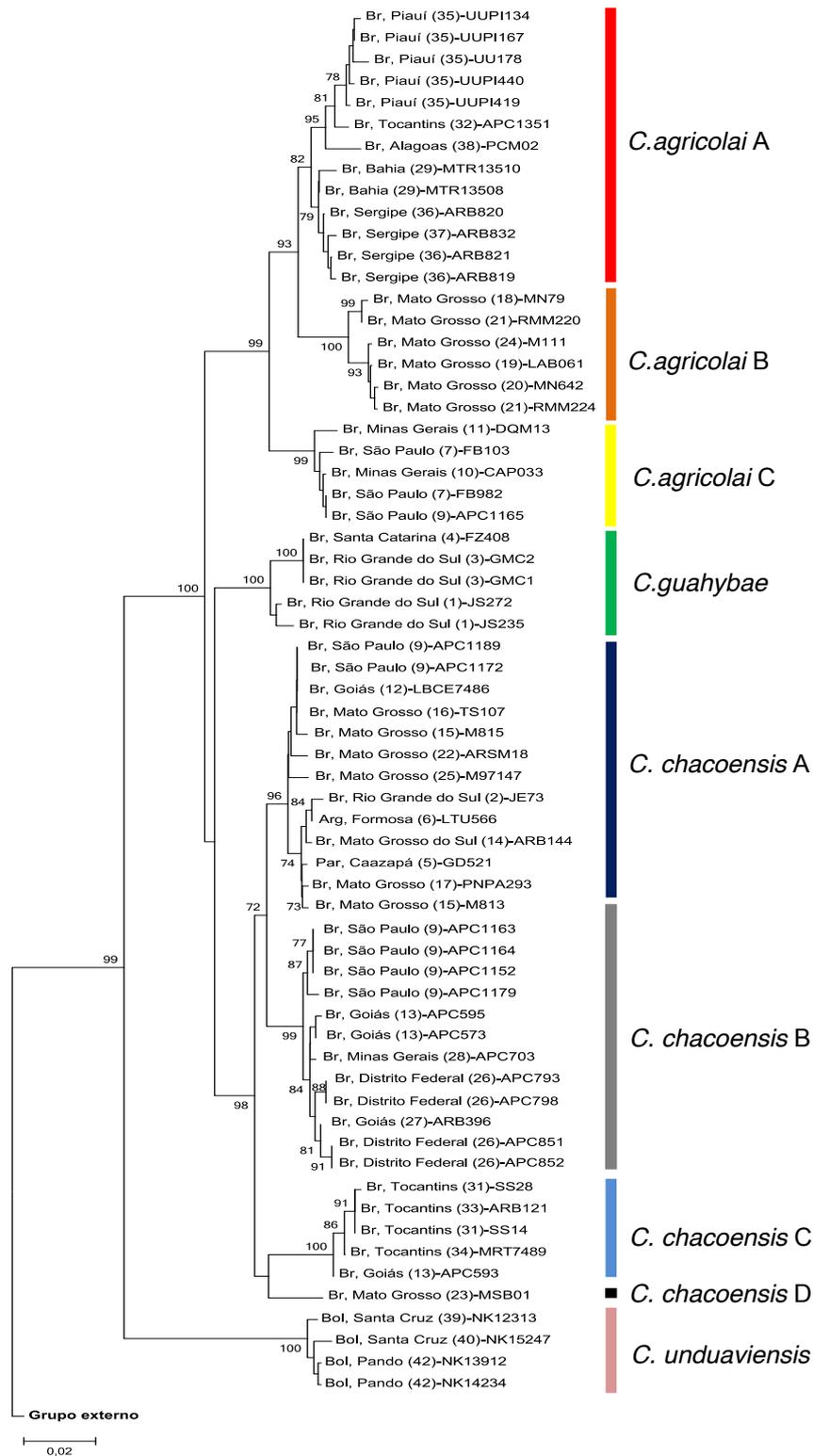


Figura 13. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. chacoensis* (análise intraespecífica) e entre *C. chacoensis* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 1.

Hipótese 2

Os agrupamentos analisados no contexto da segunda hipótese estão representados nas topologias das Figuras 14 e 15. Nesta hipótese, os agrupamentos caracterizados pelas espécies anteriormente denominadas de *C. agricolai* e *C. chacoensis* foram considerados complexos de espécies. Neste cenário, agrupamentos internos foram reconhecidos como linhagens genéticas independentes e identificados como haplogrupos, denominados: *C. agricolai* A, B e C; e *C. chacoensis* A, B, C e D. A hipótese 2 considera cada um dos nove agrupamentos distintos uma espécie de *Cryptonanus* (Figuras 14 e 15). Os valores de suporte dos ramos que definem estes haplogrupos variam valores de 87 a 100% considerando ambos os marcadores.



Substituição/sítios

Figura 14. Topologia obtida a partir da análise de 781 pb de uma região do gene *cytb* para 64 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 2. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

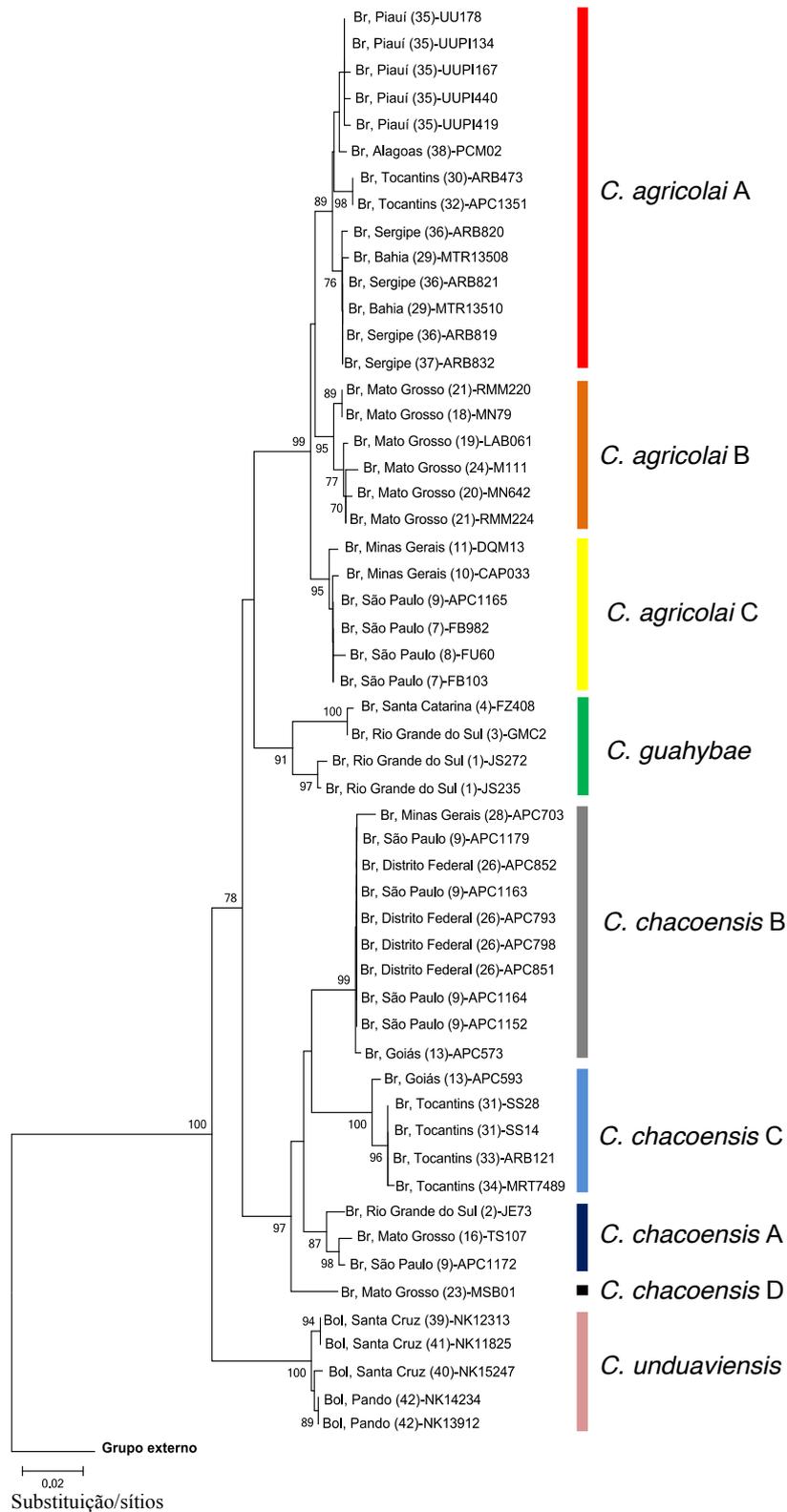


Figura 15. Topologia obtida a partir da análise de 743 pb de uma região do gene *col* para 54 espécimes de *Cryptonanus* utilizando o método de Neighbor Joining (NJ) com base no modelo de distância K2P considerando a Hipótese 2. Estão apresentados valores de *bootstrap* maiores que 70%. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

Os intervalos de distância intraespecífica foram de 0 a 2,4% e de 0 a 3% nas análises das sequências de *cytb* e *coI*, respectivamente (Figura 16, Tabelas 5 e 6). Os valores de distância interespecífica variaram de 2,1 a 13,2% para *cytb* e de 1,6 a 9,6% para *coI* (Figura 16, Tabelas 5 e 6). As médias dos valores intraespecíficos calculadas para cada grupo encontram-se na Tabela 7.

A análise dos intervalos de distâncias intra e interespecíficas das sequências de *coI* e *cytb* considerando todo o conjunto de dados apresentou sobreposição, não sendo identificado o *barcoding gap* (Figura 16). Alguns espécimes de *C. agricolai* A possuem valores de distância genética intraespecífica que se sobrepõem a valores de distância interespecífica obtido em comparações com *C. chacoensis* B com relação ao gene *cytb* (Tabela 5). Espécimes de *C. guahybae* tiveram o valor máximo de distância genética intraespecífica de 3% nas análises utilizando *coI*, também se sobrepondo aos valores de distância interespecíficos (Tabela 6).

Considerando que os agrupamentos de *C. chacoensis* e *C. agricolai* são complexos de espécie, os valores de distância de cada agrupamento foram separados para serem tratados como linhagens independentes. É possível observar *barcoding gap* entre todos os haplogrupos propostos para os dois conjuntos de dados (*cytb* e *coI*) (Figuras 17 e 18; Tabelas 5 e 6). Para *C. agricolai* a distribuição das distâncias intraespecíficas também apresentou curvas bimodal para o marcador *cytb* e uma única moda para o *coI* (Figura 17). No gráfico das distribuições de distância genética para o grupo de *C. chacoensis* o *barcoding gap* é nítido, e há somente uma moda (Figura 18).

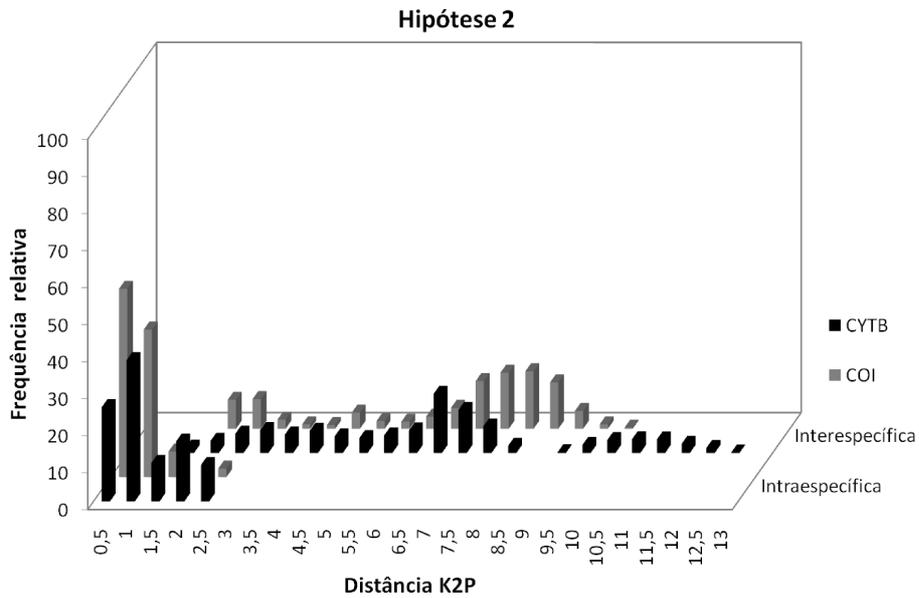


Figura 16. Distribuição das frequências de valores de divergência genética intra e interespecíficas baseadas no modelo de distância K2P para as sequências de *col* e *cytb* considerando a Hipótese 2.

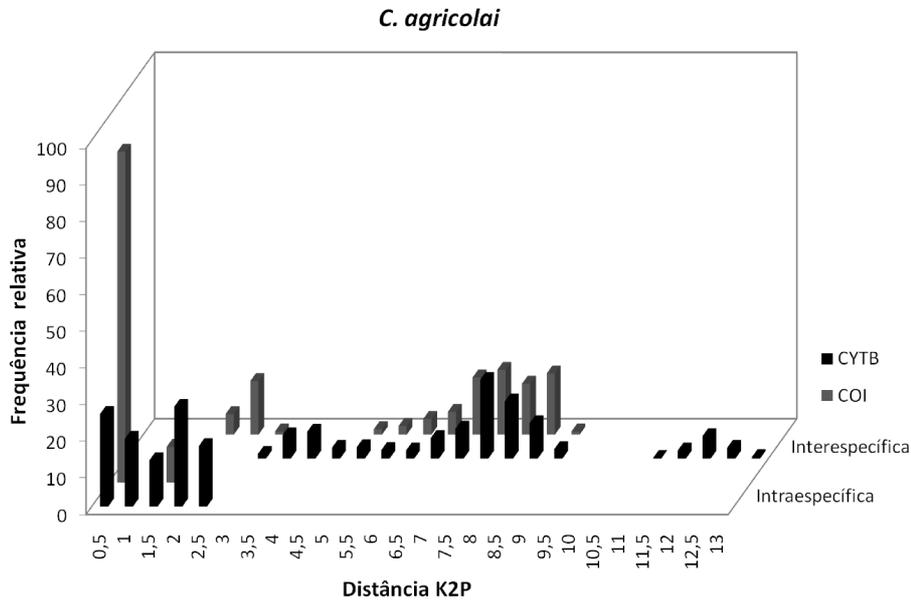


Figura 17. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *col* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. agricolai* (análise intraespecífica) e entre *C. agricolai* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 2.

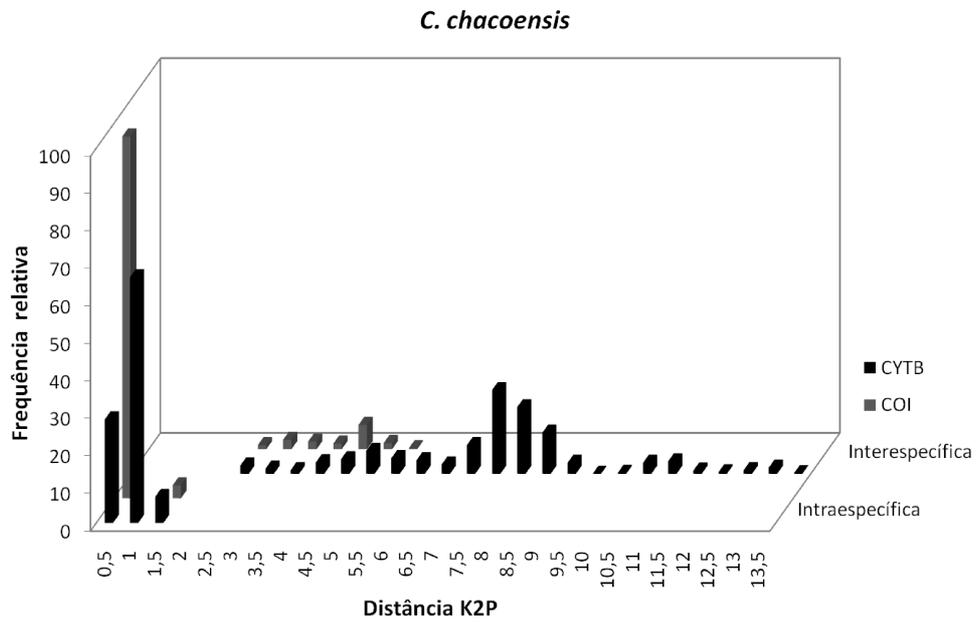


Figura 18. Distribuição das frequências de valores de divergência genéticas baseadas no modelo de distância K2P para *coI* e *cytb*, incluindo comparações entre espécimes de *C. chacoensis* (análise intraespecífica) e entre *C. chacoensis* e as demais espécies de *Cryptonanus* (análise interespecífica), considerando a Hipótese 2.

Tabela 5. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região alvo do gene *cytb* considerando a Hipótese 2. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>C. agricolai</i> A	0,001~0,024								
2 <i>C. agricolai</i> B	0,026 ~ 0,041	0,001 ~ 0,013							
3 <i>C. agricolai</i> C	0,027 ~ 0,048	0,043 ~ 0,053	0 ~ 0,012						
4 <i>C. chacoensis</i> A	0,062 ~ 0,084	0,078 ~ 0,083	0,062 ~ 0,071	0 ~ 0,013					
5 <i>C. chacoensis</i> B	0,067 ~ 0,079	0,074 ~ 0,086	0,067 ~ 0,076	0,021 ~ 0,037	0 ~ 0,012				
6 <i>C. chacoensis</i> C	0,073 ~ 0,089	0,078 ~ 0,088	0,068 ~ 0,078	0,037 ~ 0,049	0,037 ~ 0,049	0 ~ 0,007			
7 <i>C. chacoensis</i> D	0,066 ~ 0,077	0,081 ~ 0,088	0,066 ~ 0,073	0,030 ~ 0,041	0,033 ~ 0,038	0,033 ~ 0,041	0		
8 <i>C. guahybae</i>	0,046 ~ 0,067	0,062 ~ 0,074	0,056 ~ 0,068	0,041 ~ 0,056	0,049 ~ 0,061	0,051 ~ 0,061	0,048 ~ 0,054	0 ~ 0,013	
9 <i>C. unduaviensis</i>	0,112 ~ 0,128	0,110 ~ 0,124	0,112 ~ 0,121	0,106 ~ 0,117	0,100 ~ 0,112	0,121 ~ 0,132	0,114 ~ 0,119	0,103 ~ 0,110	0,003 ~ 0,009

Tabela 6. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências da região alvo do gene *col* considerando a Hipótese 2. Números em vermelho identificam sobreposições nos intervalos de distribuição intra e interespecífica. Os números em negrito indicam os intervalos de distância intraespecífica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>C. agricolai</i> A	0 ~ 0,012								
2 <i>C. agricolai</i> B	0,016 ~ 0,026	0 ~ 0,012							
3 <i>C. agricolai</i> C	0,016 ~ 0,024	0,020 ~ 0,026	0 ~ 0,006						
4 <i>C. chacoensis</i> A	0,062 ~ 0,073	0,064 ~ 0,071	0,066 ~ 0,071	0,006 ~ 0,014					
5 <i>C. chacoensis</i> B	0,071 ~ 0,082	0,069 ~ 0,076	0,064 ~ 0,075	0,024 ~ 0,034	0 ~ 0,008				
6 <i>C. chacoensis</i> C	0,080 ~ 0,087	0,078 ~ 0,089	0,076 ~ 0,085	0,041 ~ 0,051	0,037 ~ 0,049	0 ~ 0,010			
7 <i>C. chacoensis</i> D	0,065 ~ 0,069	0,062 ~ 0,065	0,060 ~ 0,062	0,032 ~ 0,036	0,032 ~ 0,039	0,045 ~ 0,051	0		
8 <i>C. guahybae</i>	0,049 ~ 0,064	0,051 ~ 0,064	0,047 ~ 0,062	0,062 ~ 0,069	0,075 ~ 0,087	0,082 ~ 0,089	0,080 ~ 0,087	0,002 ~ 0,030	
9 <i>C. unduaviensis</i>	0,077 ~ 0,084	0,068 ~ 0,079	0,077 ~ 0,084	0,073 ~ 0,082	0,082 ~ 0,089	0,089 ~ 0,096	0,079	0,064 ~ 0,075	0 ~ 0,006

Tabela 7. Intervalos de distância calculados par-a-par utilizando o modelo K2P nas análises das sequências das regiões alvo dos genes *cytb* e *coI* considerando a Hipótese 2. Estão representadas as médias, o máximo e o mínimo, o número amostral (n) e o número de localidades (N) para cada agrupamento.

Espécies	n/N	<i>cytb</i> distância genética (%)			<i>coI</i> distância genética (%)		
		Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
<i>C. agricolai</i> A	13/6	0	2,4	1,6	0	1,2	0,6
<i>C. agricolai</i> B	6/5	0,1	1,3	0,9	0	1,2	0,6
<i>C. agricolai</i> C	5/4	0	1,2	0,5	0	0,6	0,2
<i>C. chacoensis</i> A	3/3	0	1,3	1,3	0,6	1,4	1,0
<i>C. chacoensis</i> B	10/4	0	1,2	0,7	0	0,8	0,1
<i>C. chacoensis</i> C	5/3	0	0,7	0,4	0	1,0	0,4
<i>C. guahybae</i>	4/3	0	1,3	1,3	0,2	3,0	2,0
<i>C. unduaviensis</i>	4/3	0,3	0,9	0,7	0	0,6	0,5

Análises Filogenéticas

A topologia recuperada a partir da análise de Máxima Parcimônia (MP) utilizando as sequências de *cytb* resultou em uma árvore com 1.916 passos e com índices de retenção (IR) e de consistência (IC) de 0,728 e 0,283, respectivamente. Considerando a análise dos dados de *col*, o comprimento da árvore foi de 1.194 passos com IR= 0,778 e IC= 0,373. A topologia a partir dos dados concatenados apresentou 2.038 passos e IR= 0,785 e IC= 0,429.

O melhor modelo evolutivo utilizado para os dados de *cytb* nas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BPP) foi o de Hasegawa, Hishino e Yano (1985) seguindo a distribuição gamma (HKY+G). Para os dados de *col* o melhor modelo evolutivo foi o *General Time Reversible* (Rodríguez *et al.*, 1990), levando em conta a proporção de sítios invariáveis e os sítios variáveis seguindo a distribuição gamma (GTR+I+G).

As melhores árvores de ML obtidas nas análises das regiões *cytb* e *col* apresentaram valores de $-\ln=8860,251832$ e $-\ln=5904,098893$, respectivamente. Com relação às análises de BPP para o gene *cytb*, as cadeias convergiram com valores de verossimilhança da cadeia 1 de -7389,56 e de -7399,43 na cadeia 2. Para as análises das sequências de *col* as cadeias convergiram com valores de -4087,152 e -4099,232 na cadeia 2. A média do desvio padrão encontrado nas análises envolvendo dados de *cytb* e *col* foi de 0,026566 e de 0,010840, respectivamente.

Todas as reconstruções filogenéticas apresentaram topologias semelhantes e o gênero *Cryptonanus* sempre foi recuperado como um clado monofilético (Figuras 19 e 20). Nas topologias obtidas a partir da análise dos dados de *cytb*, que incluem uma

amostragem taxonômica maior com relação às análises com sequências de *colI*, o gênero *Cryptonanus* aparece como grupo irmão de *Marmosops* com baixo suporte de ramo (Figura 19). No caso das análises utilizando sequências de *colI*, *Cryptonanus* foi recuperado como grupo irmão de *Gracilinanus*, mas também com baixo suporte neste ramo (Figura 20).

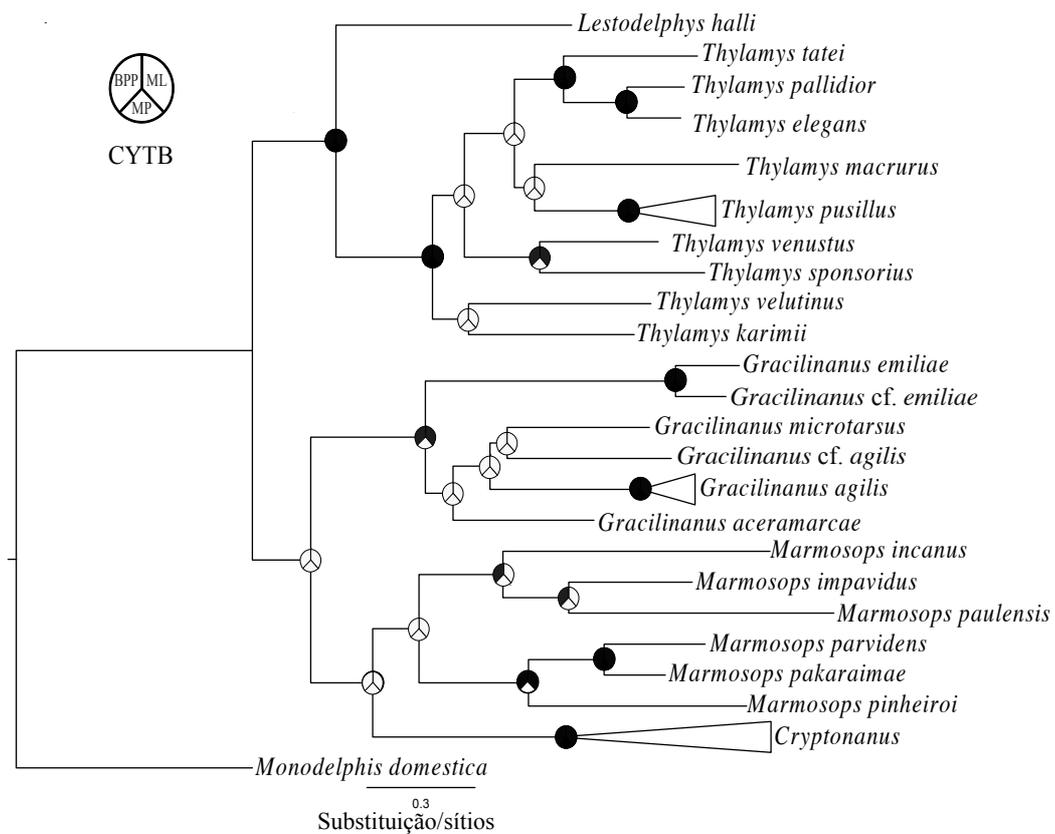


Figura 19. Topologia obtida a partir das inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP) entre os espécimes de *Cryptonanus* e do grupo externo, considerando a análise de sequências de *cytb*. Os valores de suporte de ramo acima de 75% (MP e ML) de *bootstrap* e 0.9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados por porções escuras nas circunferências presentes nos nós dos ramos.

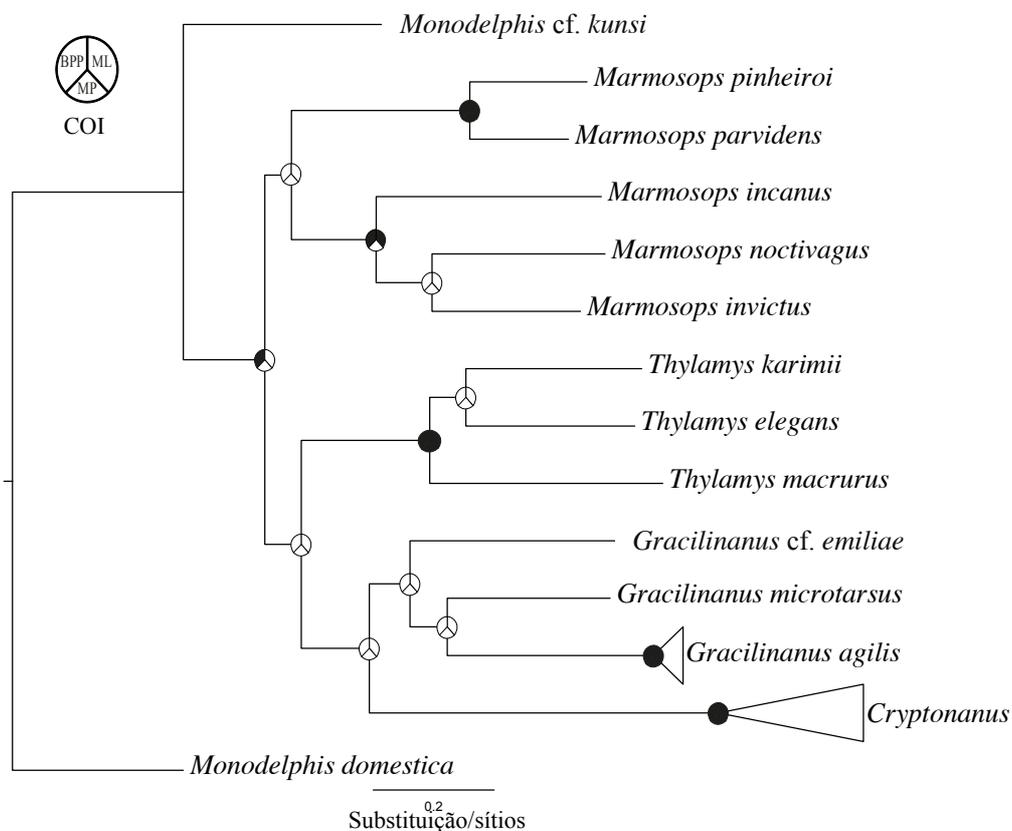


Figura 20. Topologia obtida a partir das inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP) entre os espécimes de *Cryptonanus* e do grupo externo, considerando a análise de sequências de *coI*. Os valores de suporte de ramo acima de 75% (MP e ML) de *bootstrap* e 0.9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados por porções escuras nas circunferências presentes nos nós dos ramos.

Nas topologias recuperadas pelas metodologias de reconstrução filogenética MP, BPP e ML para os dados de *cytb* (Figura 21), *coI* (Figura 22) e de ambos os marcadores concatenados (Figura 23), as espécies de *Cryptonanus* foram distribuídas em quatro clados principais, os mesmos obtidos nas análises de distância (Figuras 14 e 15). O clado mais externo foi composto por espécimes de *C. unduaviensis* com alto suporte de ramo nas três metodologias empregadas e para cada marcador separadamente e na análise concatenada (Figuras 21 a 23). O clado composto por espécimes de *C. guahybae* também foi recuperado com alto suporte de ramo em todas as topologias, porém não foi

possível estabelecer a relação de parentesco entre *C. guahybae* e os outros clados, dado que esta relação foi recuperada com baixo suporte de ramo em todas as análises (Figuras 21 a 23). O clado que reúne os espécimes de *C. agricolai* apresentou alto suporte de ramo em todas as metodologias de reconstrução filogenética, diferentemente do clado composto por espécimes de *C. chacoensis*, que apresentou baixo suporte de ramo nas análises dos dados para cada marcador separadamente (Figuras 21 e 22).

A relação de parentesco entre os haplogrupos de *C. agricolai* também não está bem resolvida, o haplogrupo A é mais próximo do haplogrupo B nas análises do gene *cytb* e na análise concatenada (Figuras 21 e 23), sendo que nas análises de *coI* observa-se uma politomia entre os haplogrupos A, B e C (Figura 22).

O haplogrupo D de *C. chacoensis* foi o mais externo dentro do complexo de *C. chacoensis* para as análises de *cytb* e *coI*, porém, com baixo suporte de ramo; na análise concatenada, este espécime (MSB-01) ficou mais próximo do agrupamento que reúne o haplogrupo A e B, mas também com baixo suporte estatístico. Sendo assim, não é possível estabelecer a relação de parentesco entre este espécime e os outros haplogrupos de *C. chacoensis*, provavelmente devido ao pequeno número de espécimes representando este clado (n=1) (Figuras 21 a 23). Os outros agrupamentos internos do complexo *C. chacoensis* apresentaram alto suporte de ramo em todas as análises realizadas, com exceção do haplogrupo A na análise de *cytb* (Figura 21).

A análise concatenada auxiliou a elevar os suportes dos ramos para alguns grupos que não estavam bem suportados nas análises de cada marcador separadamente, como para alguns clados dentro de *C. agricolai* e de *C. chacoensis* (Figura 23). Porém, a relação entre *C. guahybae* e *C. agricolai* permaneceu pouco suportada, assim como a relação entre os haplogrupos A, B e D de *C. chacoensis* (Figura 23).

Apesar de algumas relações filogenéticas não estarem bem estabelecidas, todos os nove agrupamentos foram recuperados como grupos reciprocamente monofiléticos com alto suporte de ramo nas análises realizadas, sendo *C. unduaviensis* o grupo mais divergente.

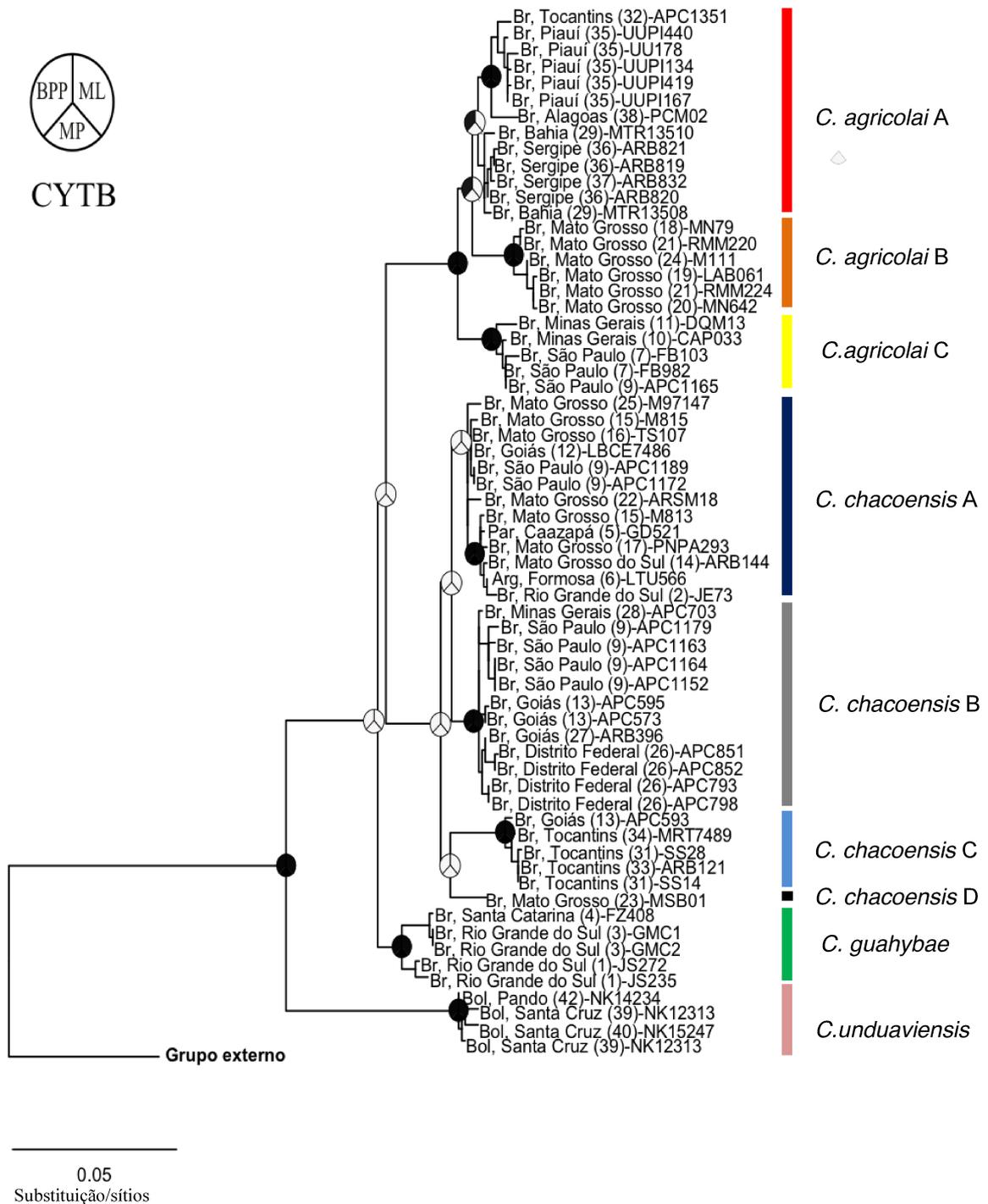


Figura 21. Topologia obtida a partir das análises de 781 pb de uma região do gene *cytb* para 64 espécimes de *Cryptonanus* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e 0,9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados pelas circunferências escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

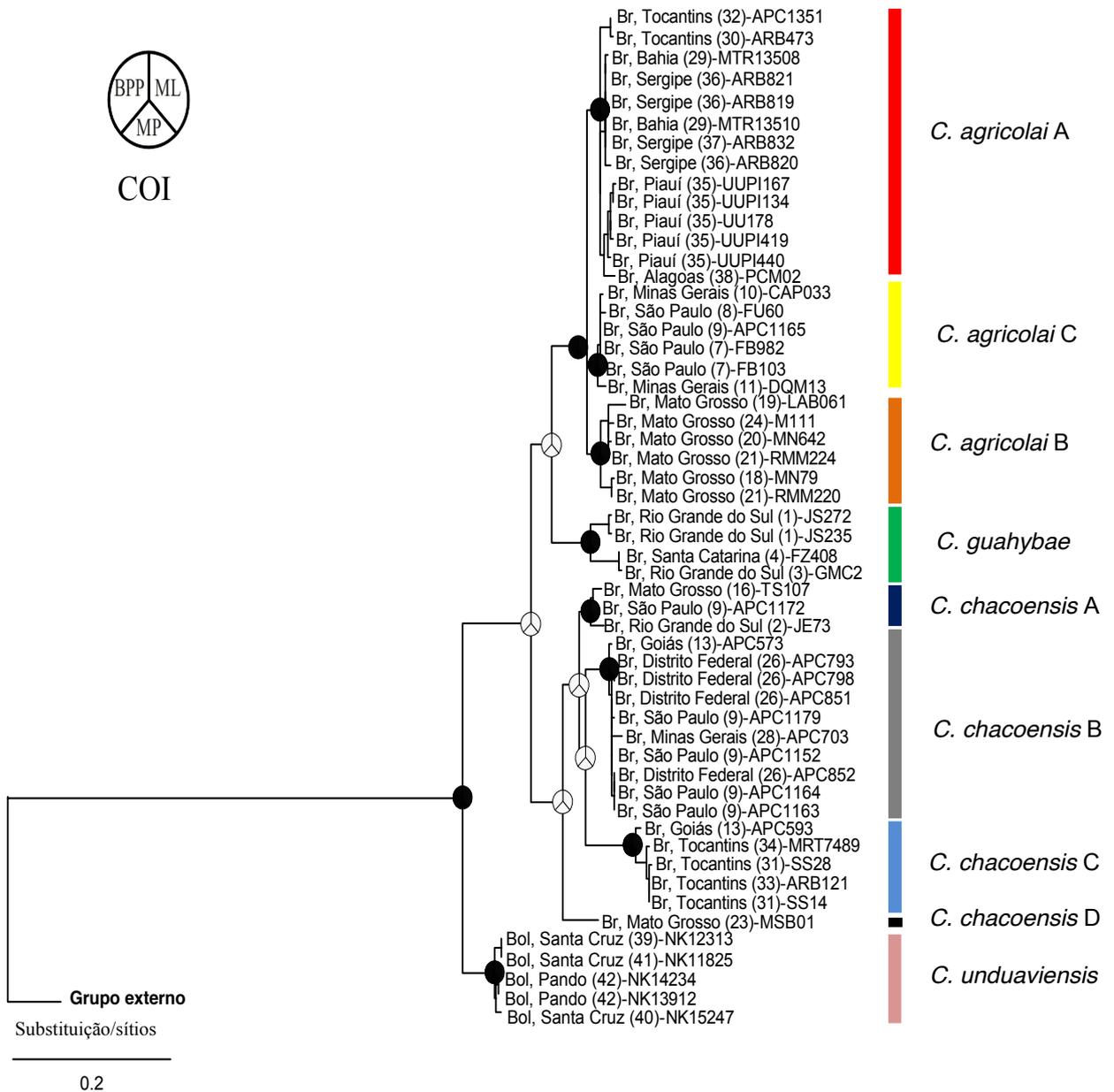


Figura 22. Topologia obtida a partir das análises de 743 pb de uma região do gene *coI* para 54 espécimes de *Cryptonanus* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e 0,9 de probabilidade posterior (PPB) estão representados pelas circunferências escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Província (localidade no mapa) – número de campo.

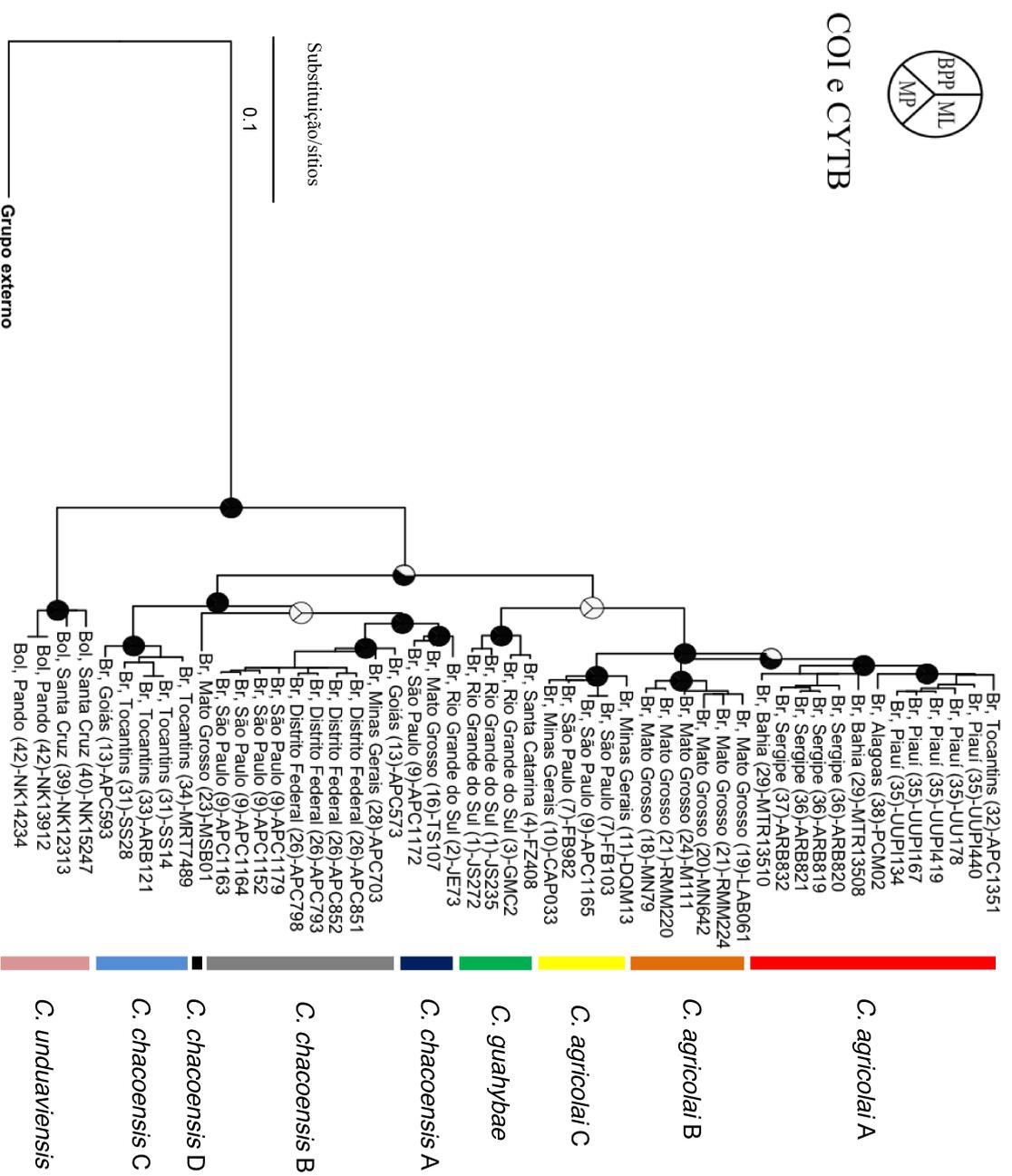


Figura 23. Topologia obtida a partir das análises de 1524 pb referente à análise concatenada dos genes *cytb* e *coi* para 51 espécimes de *Cryptomonas* considerando as inferências de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BPP). Os valores de suporte de ramo acima de 75% de *bootstrap* (MP e ML) e de 0,9 de probabilidade posterior (BPP) estão representados pelas circunstâncias escuras nos nós dos ramos. Os espécimes estão representados pelo País, Estado/Provincia (localidade no mapa) – número de campo.

Estruturação geográfica

A distribuição geográfica dos espécimes analisados nesse estudo complementa e amplia a distribuição geográfica atualmente conhecida para o gênero *Cryptonanus* (Ver Figura 2).

A distribuição geográfica de *C. unduaviensis* em relação às outras espécies de *Cryptonanus* está representada na Figura 24. O clado de *C. unduaviensis* esteve representado por espécimes que ocorrem na Bolívia, associados às áreas de Chiquitano (Florestas Estacionais Sazonalmente Secas) e a áreas de transição entre esta fitofisionomia a as Florestas da região Amazônica.

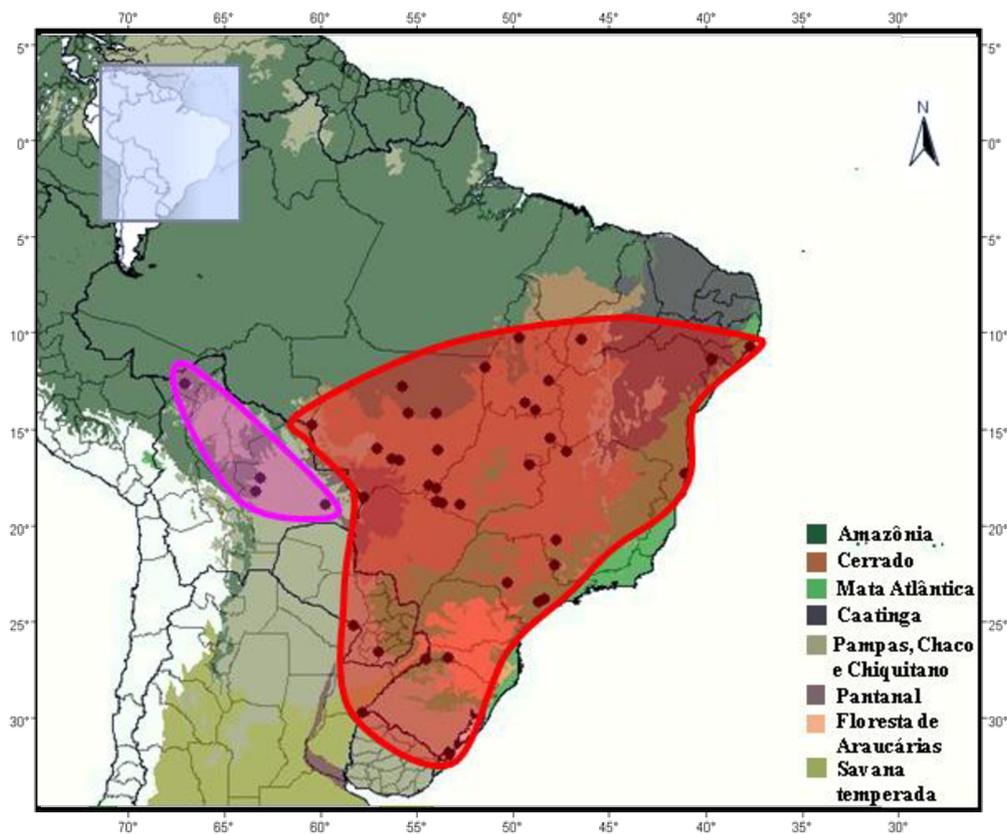


Figura 24. Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição dos agrupamentos compostos por espécimes de *C. unduaviensis* (rosa) com relação aos grupos contendo espécimes de *C. agricolai* + *C. chacoensis* + *C. guahybae* (vermelho).

A distribuição dos espécimes de *C. guahybae* foi restrita ao sul do Brasil com ocorrência no oeste de Santa Catarina e noroeste e sudeste do Rio Grande do Sul, registros às regiões de Floresta de Araucária, de Florestas Estacionais inseridas no interior da Mata Atlântica e aos Pampas (Figura 25).

A área de distribuição do grupo que inclui os espécimes de *C. agricolai* está mais concentrada na porção centro-oeste e nordeste do Brasil e contorna a área de distribuição do grupo que inclui espécimes de *C. chacoensis*, que também ocorre na porção centro-oeste com espécimes mais ao sul e oeste da distribuição do gênero (Figura 25). Há um registro de simpatria entre espécimes de *C. agricolai* e *C. chacoensis* na localidade da Estação Ecológica de Santa Bárbara no Estado de São Paulo (seta branca na Figura 25; localidade 9 da Figura 3 e Anexo IV).

Os haplogrupos de *C. agricolai* tiveram ocorrência associada às áreas de Caatinga, aos enclaves de áreas abertas no interior da Mata Atlântica (áreas de agricultura e de restinga, por exemplo) e ao Cerrado. Para esse agrupamento foi observado uma distribuição parapátrica com relação ao agrupamento que reúne os espécimes de *C. chacoensis*, já que os limites das distribuições foram bem próximos, incluindo o registro de simpatria citado acima. O agrupamento que reúne os espécimes de *C. chacoensis* apresentou registros associados ao Cerrado, às áreas de transição com a Floresta Amazônica e às áreas de Pampas, Chaco e Chiquitano (Figura 25).

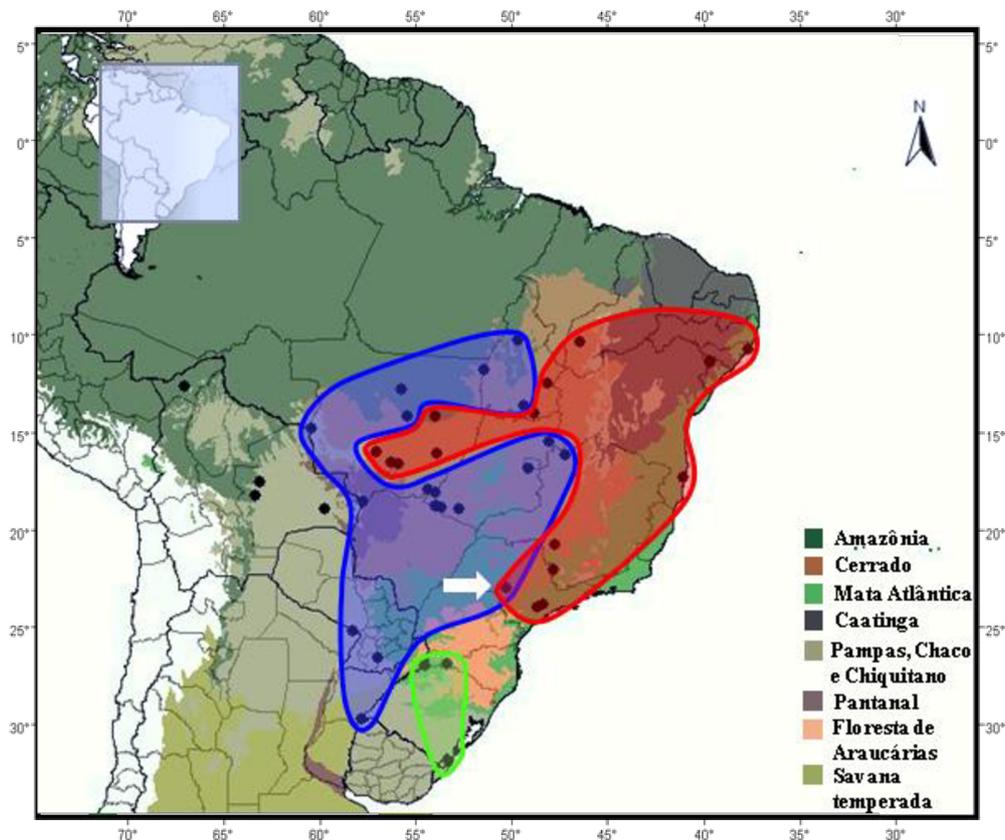


Figura 25. Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição dos agrupamentos compostos por espécimes de *C. agricolai* (vermelho), *C. chacoensis* (azul) e *C. guahybae* (verde). A seta indica a localidade 9, onde há a simpatria entre *C. chacoensis* e *C. agricolai*.

Os haplogrupos de *C. agricolai* estão bem delimitados geograficamente, com os indivíduos apresentando distribuição disjunta, ocorrendo em alopatria. O haplogrupo A está distribuído na região nordeste do Brasil, com espécimes ocorrendo no Piauí, Alagoas, Bahia, Sergipe e leste do Tocantins, associados a áreas de Cerrado, Caatinga e áreas de Restinga na Mata Atlântica; o haplogrupo B apresentou distribuição restrita à porção leste e sul do Mato Grosso em áreas de Cerrado e de transição com a Amazônia; e o haplogrupo C com distribuição ao sul de Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em áreas de Cerrado e áreas antropizadas de Floresta Estacional na Mata Atlântica (Figura 26).

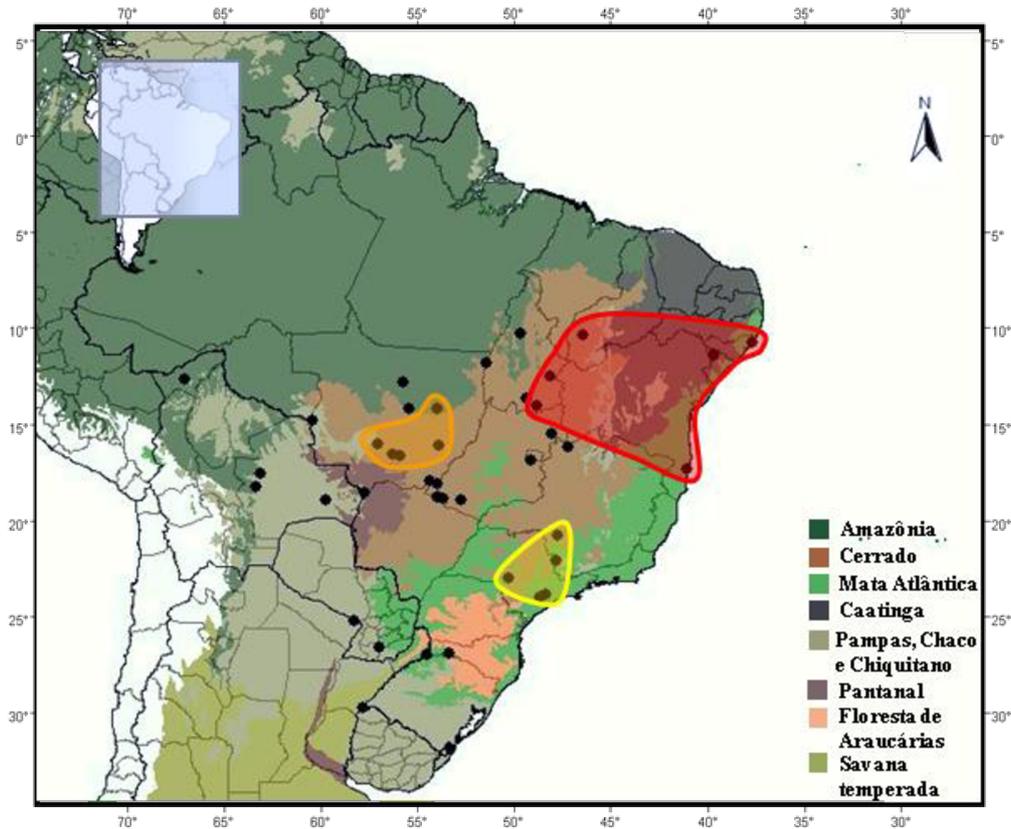


Figura 26. Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja) e *C. agricolai* C (amarelo).

No caso de *C. chacoensis*, a distribuição geográfica dos haplogrupos foi parapátrica, inclusive com pontos de simpatria. O haplogrupo A apresentou ampla distribuição com espécimes ocorrendo no nordeste da Argentina, sul do Paraguai, sudeste do Rio Grande do Sul, leste do Mato Grosso do Sul, norte do Mato Grosso, Goiás e porção central de São Paulo; o haplogrupo B distribuiu-se na porção central de São Paulo, Goiás, norte de Minas Gerais e Distrito Federal; o haplogrupo C distribuiu-se na porção oeste do Tocantins e Goiás e *C. chacoensis* D está restrito a uma localidade no extremo oeste do Mato Grosso (Figura 27). Os haplogrupos A, B e C de *C. chacoensis* possuem dois pontos de simpatria, um deles na Estação Ecológica de Santa Bárbara no Estado de São Paulo (localidade 9, da Figura 3 e Anexo IV- entre

haplogrupos A e B) e outro no Parque Nacional das Emas em Goiás (localidade 13, da Figura 3 e Anexo IV - entre haplogrupos B e C) (Figura 27).

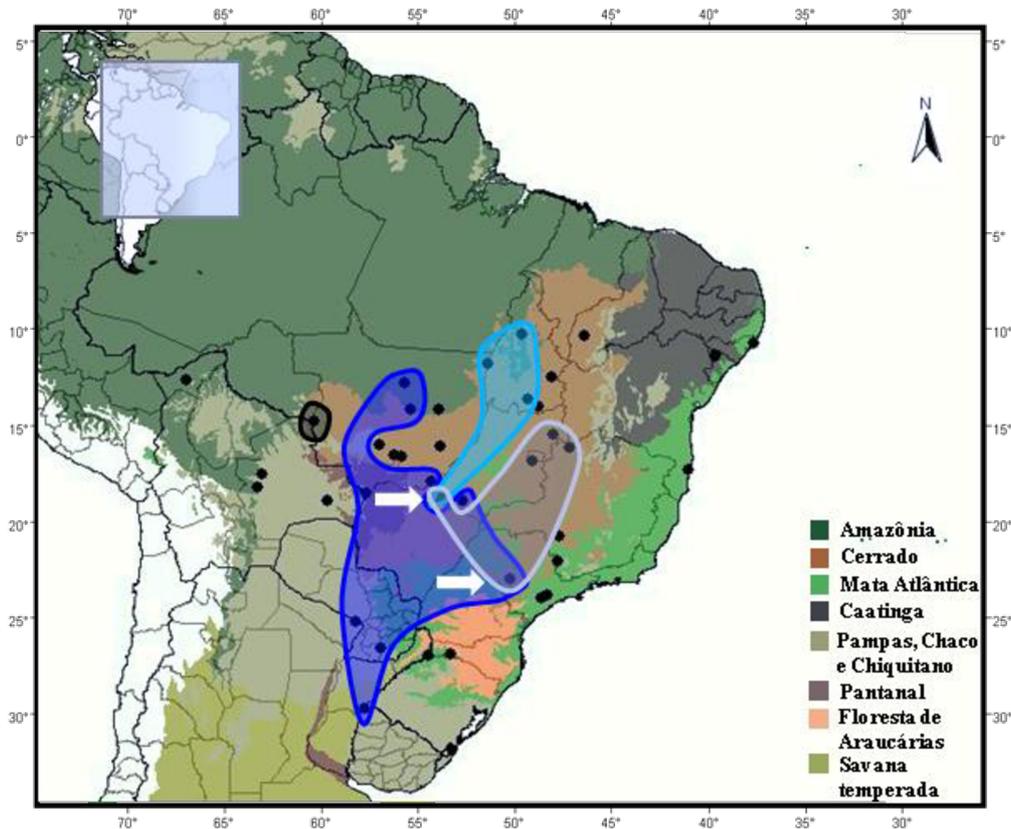


Figura 27. Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C (azul claro) e *C. chacoensis* D (preto). Setas em branco indicam pontos de ocorrência de simpatria.

A distribuição geográfica dos nove grupos de *Cryptonanus* está representada no mapa da Figura 28 incluindo os limites de Estados e ecorregiões, e da Figura 29 que indica os principais rios e diferentes níveis de elevação (de 0 a 4.000 metros de altitude).

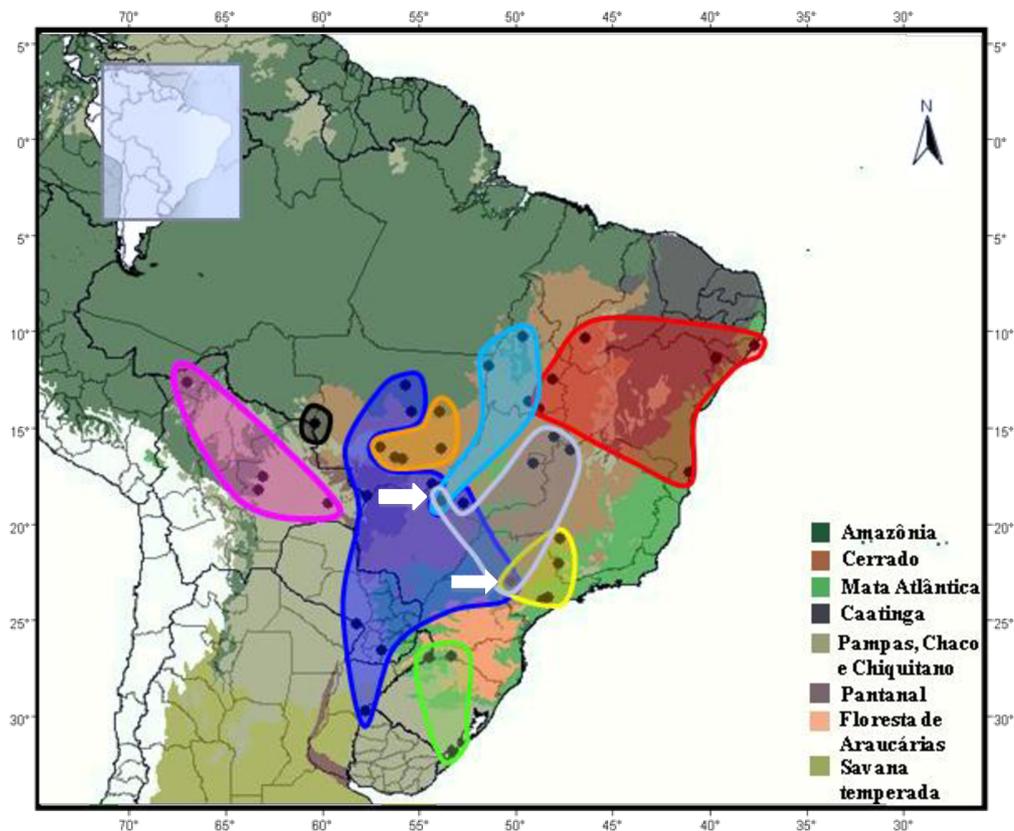


Figura 28. Mapa da região central da América do Sul mostrando as áreas de distribuição de *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja), *C. agricolai* C (amarelo), *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C (azul claro), *C. chacoensis* D (preto), *C. guahybae* (verde) e *C. unduaviensis* (rosa). Setas em branco indicam pontos de ocorrência de simpatria.

As distribuições geográficas das nove espécies de *Cryptonanus* são parapátricas na maioria dos casos, apresentando três registros de simpatria (Figura 28). É possível notar que grande parte dos pontos de ocorrência das espécies está associado a áreas de vegetação aberta (principalmente Cerrado e Chaco) na diagonal seca da América do Sul.

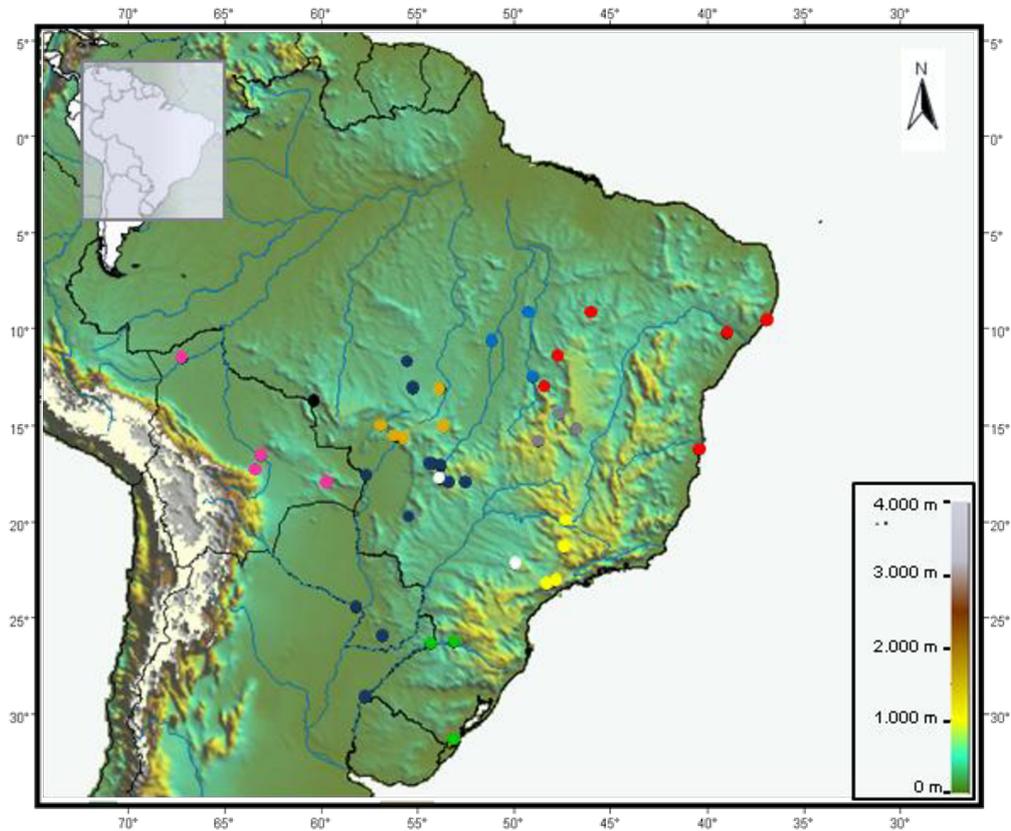


Figura 29. Mapa da região central da América do Sul mostrando a ocorrência dos rios e das áreas de altitude. A distribuição de *Cryptonanus* está representada pelos pontos coloridos: *C. agricolai* A (vermelho), *C. agricolai* B (laranja), *C. agricolai* C (amarelo), *C. chacoensis* A (azul escuro), *C. chacoensis* B (cinza), *C. chacoensis* C (azul claro), *C. chacoensis* D (preto), *C. guahybae* (verde) e *C. unduaviensis* (rosa). Os pontos em branco representam as localidades com registro de simpatria.

Para *C. unduaviensis* foi verificado que alguns espécimes estão separados dos demais táxons por uma faixa de Altiplanos na Bolívia e pela Floresta Amazônica (Figura 29).

A distribuição das espécies de *Cryptonanus* está associada, principalmente, a áreas de 0 m a 1.000 m de altitude. Além disso, é possível verificar que a distribuição das espécies não está associada com a delimitação dos principais corpos d'água da América do Sul. (Figura 29).

DISCUSSÃO

Análise de DNA barcode

As distâncias genéticas das análises envolvendo as regiões alvo dos genes *cytb* e *coI* apresentaram correlação estatística, o que indica que os dois marcadores não apresentam informações discordantes, e podem ser utilizados em conjunto para auxiliar na delimitação taxonômica. O gene *cytb* é tradicionalmente o marcador mais caracterizado para espécies de vertebrados por apresentar variabilidade genética suficiente, na maioria dos casos, para a resolução de relações interespecíficas (Meyer, 1994; Johns e Avise, 1998, Giarla *et al.* 2010; Solari, 2011). A existência de um amplo banco de dados estimula novos estudos a incorporarem a caracterização deste marcador para ampliar e conduzir análises sobre uma mesma base comparativa. Por outro lado, estudos utilizando o marcador *coI* para a delimitação de táxons em Didelphidae ainda são escassos (Agrizzi *et al.*, 2012). Porém, iniciativas como o iBOL (<http://ibol.org/barcoding-bibliography>) tem contribuído para ampliar a representatividade de sequências da região *barcode* em uma ampla diversidade de espécies.

Nos resultados obtidos considerando a hipótese 1, observa-se a ocorrência de duas a três modas nas análises da distribuição dos valores de distância genética intraespecífica para os agrupamentos compostos por espécimes de *C. agricolai* (Figura 12) e *C. chacoensis* (Figura 13) para os genes *coI* e *cytb*. Em muitos táxons de metazoários foi documentado que os valores de distância genética referentes à variabilidade intraespecífica distribuem-se numa curva normal unimodal de forma a não se sobrepor com a curva de distância dos valores interespecíficos (Hebert *et al.*, 2003b; Zehner *et al.*, 2004; Ball *et al.*, 2005; Barrett e Hebert, 2005; Smith *et al.*, 2005;

Hajibabaei *et al.*, 2006). Diversos exemplos ilustram a presença de um *barcoding gap* que define uma lacuna entre as curvas de distribuição dos intervalos de valores de distâncias intra e interespecíficas (Moritz e Cicero, 2004; Meier *et al.*, 2008). A presença do *barcoding gap* não é obrigatoriamente necessária para validar a delimitação de espécies, havendo exemplos de ocorrência de sobreposição de valores de variação intra e interespecífica envolvendo diferentes espécies (Funk e Omland, 2003; Meyer e Paulay, 2005; Wiermers e Fiegler, 2007; Elias *et al.*, 2007; Austerlitz *et al.*, 2009). Os dados que mais se aproximam ao padrão unimodal descrito na literatura foram os relacionados com a hipótese 2 (Figuras 16, 17 e 18).

Os menores valores do intervalo de distância interespecífica obtidos a partir da hipótese 2 foram inferiores quando comparados aos valores apresentados em análises similares envolvendo outras espécies da Tribo Thylamyini. No estudo de Loss *et al.* (2011), valores de variação intraespecífica foram estimados como sendo 10% em média, bem maiores que o valor de aproximadamente 2% que representa o limite inferior do intervalo de variação interespecífica apresentado pela hipótese 2 defendida neste estudo. Esse amplo intervalo de variação intraespecífica reconhecido por Loss *et al.* (2011) foi justificado como sendo consequência de evidente estruturação genética nas populações de *Gracilinanus microtarsus*, somando-se à ausência de evidências morfológicas que sustentassem a caracterização de novas espécies.

Giarla *et al.* (2010), em estudo do gênero *Thylamys*, registrou o valor de 6,4%, como o limite inferior do intervalo de distância interespecífica nas análises de sequências de *cytb*. Valores de distância de 5,1% relativos a diferentes haplogrupos dentro da espécie *Thylamys pusilus* foram associados a intervalos de variação intraespecífica e, novamente, interpretados como resultantes de estruturação genética em populações desta espécie. Entretanto, Giarla *et al.* (2014), com base na análise de 15

marcadores nucleares e do gene *cytb* evidenciaram linhagens geneticamente independentes, condição favorável para reconhecer como espécies os haplogrupos identificados anteriormente (Giarla *et al.*, 2010). Porém, estes autores decidiram não elevar os haplogrupos ao nível de espécies pela ausência de evidências fenotípicas associadas aos diferentes haplogrupos, e às lacunas de amostragem no padrão de distribuição dos espécimes de *Thylamys*.

O reconhecimento de que os limites dos intervalos de distância genética propostos no estudo de Giarla *et al.* (2010) possam ser aceitos também para o gênero *Cryptonanus* - por compartilharem um cenário evolutivo semelhante com relação à proximidade filogenética – suportam a hipótese 2 que reconhece cinco novas espécies neste gênero. Além disso, Patton e da Silva (1997) descreveram uma nova espécie de marsupial didelfídeo (*Philander mcilhennyi*) a partir de análises comparativas utilizando sequências de *cytb*, que apresentaram valores em torno de 4% como limite inferior de variação interespecífica, sendo corroboradas pela ocorrência de outra espécie do gênero, *P. opossum* em simpatria. Ditchfield (2000), Bradley e Baker (2001) e Clare *et al.* (2007), também consideraram valores de distância genética em torno de 2,5% como o limite inferior de variação interespecífica, reconhecendo novas espécies de morcegos e roedores a partir deste valor nas análises moleculares. Estes estudos também corroboram o cenário proposto pela hipótese 2 para delimitação de espécies no gênero *Cryptonanus*.

As análises genéticas indicam uma situação favorável ao reconhecimento dos haplogrupos definidos na hipótese 2 como espécies, de acordo com os valores de distância genética e os padrões de distribuição geográfica observados (Figuras 16, 17, 18, e 28), além dos elevados valores de *bootstrap* recuperados em cada um dos nove agrupamentos propostos (Figuras 21 a 23). Estas evidências dão suporte à proposta de

que valores de divergência genética acima de 2-3% são informativos para auxiliar a delimitação de espécies em *Cryptomanus*, inclusive fornecendo um indicativo de que o agrupamento *C. guahybae* pode ser composto por dois táxons distintos, a depender de análises futuras ampliando a amostragem desses espécimes, considerando a amplitude da sua distribuição geográfica.

Análises filogenéticas

Os resultados obtidos corroboram o *status* taxonômico do gênero *Cryptomanus* reconhecido por Voss *et al.* (2005) como distinto do gênero *Gracilinanus*, táxon no qual as espécies atualmente válidas de *Cryptomanus* foram previamente classificadas (Gardner e Creighton, 1989; Diaz *et al.*, 2002).

A relação de parentesco entre *Cryptomanus* e os gêneros da Tribo Thylamyini continua incerta, uma vez que os dados das análises de *cytb* e *coI* não foram congruentes e nem tiveram altos suportes nos ramos. Nas análises de sequências de *coI* o gênero *Gracilinanus* foi posicionado como grupo irmão de *Cryptomanus* com baixo suporte de ramo, enquanto nas análises de sequências de *cytb*, este gênero foi agrupado com o gênero *Marmosops*, também com baixo suporte no ramo. Essa incerteza também foi discutida no trabalho de Voss e Jansa (2009) que utilizaram cinco marcadores nucleares e não obtiveram relações congruentes e nem bem suportadas em relação ao posicionamento de *Cryptomanus* e estes mesmos grupos irmãos. Sendo assim, ressalta-se a importância da escolha do marcador molecular a ser utilizado para investigar estas relações filogenéticas (Funk e Omland, 2003).

Estruturação geográfica

Com relação à *C. guahybae*, Voss *et al.* (2005) consideraram a distribuição geográfica dessa espécie restrita à porção litorânea do Rio Grande do Sul, com ausência de registros para a porção continental do Estado, ou em Santa Catarina. Em nossos dados, *C. guahybae* distribuiu-se no sudoeste de Santa Catarina e noroeste e sudeste do Rio Grande do Sul. Esta espécie apresentou uma subdivisão separando espécimes ao sul do Rio Grande do Sul (JS235 e JS272) e amostras oriundas da região noroeste dos Estados do Rio Grande do Sul e sudoeste de Santa Catarina (GMC2 e FZ408) (Figura 25). Essa distribuição geográfica aliada à distribuição dos valores de distância intraespecífica para análises das sequências do gene *coI* pode sinalizar estruturação genética entre esses grupos (Figuras 11 e 25).

Uma distribuição geográfica semelhante, envolvendo um padrão similar ao de *C. guahybae* foi registrada para os táxons *Bothrops diporus* e *B. pubescens*. O táxon *B. diporus* foi registrado na porção continental do Rio Grande do Sul e em um ponto próximo ao litoral de Santa Catarina e *B. pubescens* relacionado à parte litorânea do Rio Grande do Sul (Machado *et al.*, 2013). Os dados aqui apresentados indicam que se deve ampliar a amostragem das populações nessa região para compreender melhor este padrão, que poderia indicar a ocorrência de um complexo de espécies em *C. guahybae*. Devido à limitação de amostragem de espécimes destas populações, e também pela incongruência entre os resultados obtidos para os dois marcadores moleculares analisados, consideramos os espécimes de *C. guahybae* como uma única espécie.

Com relação ao espécime APC1165 (registrado na localidade 9, na Estação Ecológica de Santa Bárbara), que foi posicionado no clado do haplogrupo C de *C. agricolai*, foi considerada a possibilidade de introgressão gênica, referente a um híbrido de *C. chacoensis* A e *C. agricolai* C. Esta proposta baseia-se no fato de espécimes da

mesma localidade (9) terem sido reconhecidos como pertencentes a *C. chacoensis* (haplogrupos A e B). Os espécimes pertencentes aos haplogrupos *C. chacoensis* A (APC1172 e APC1189) e *C. chacoensis* B (APC1152, APC1163, APC1164 e APC1179) podem ser considerados como espécies distintas, uma vez que não apresentaram sobreposição de caracteres diagnósticos nas análises morfológicas quantitativas e qualitativas realizadas por Carmignotto (2013), e apresentaram intervalos de valores de variação interespecífica de 2,1% a 3,7% para o *cytb* e de 2,4 a 3,4% para o *col* (Tabelas 5, 6 e 7). Erros operacionais foram desconsiderados dado que o procedimento experimental foi repetido para estas amostras. Análises em andamento com um marcador nuclear (íntron do gene *ogt*) (Guilardi *et al.*, 2014) corroboram a hipótese de introgressão, apontando para um processo de hibridização. Portanto, a distribuição de *C. agricolai* seria mais restrita, apresentando um padrão de especiação alopátrica entre estes haplogrupos, e corroborando a delimitação proposta na hipótese 2. Essas análises também serão realizadas para os espécimes de *C. chacoensis* B e *C. chacoensis* C que apresentaram simpatria na região do Parque Nacional das Emas, em Goiás (localidade 13, da Figura 3) para verificar se também há possibilidade de introgressão entre os espécimes destes haplogrupos.

É importante ressaltar que se fossemos considerar a distribuição geográfica de *Cryptonanus* apresentada por Voss *et al.* (2005), os espécimes que foram registrados nos Estados de Minas Gerais, Ceará e Goiás receberiam o nome de *C. agricolai*. Essa denominação foi observada para o espécime LBCE 7486 obtido do Genbank (Faria *et al.*, 2013) classificado como *C. agricolai*, pertencente à Serranópolis em Goiás (localidade 12, Figura 3). Porém, esse mesmo espécime foi agrupado, e reconhecido, como *C. chacoensis* nas análises apresentadas na Figura 7. Portanto, a distribuição geográfica de *C. agricolai*, e conseqüentemente de *C. chacoensis*, também diferem da

apresentada anteriormente por estes autores. A ocorrência de *C. agricolai*, aqui chamado de *C. agricolai* A, esta restrita à região nordeste e ao leste do Tocantins e Piauí no presente estudo, e para *C. chacoensis*, aqui chamado de *C. chacoensis* A, há a ampliação da distribuição, que anteriormente era conhecida para a Argentina, Paraguai, Uruguai e extremo oeste do Brasil, e nesse estudo foi ampliada para os Estados de São Paulo, Mato Grosso e Goiás (Figuras 26 e 27).

Machado *et al.* (2013) descreveram um padrão de distribuição geográfica para o gênero de jararaca *Bothrops* muito semelhante ao de *Cryptonanus*. Por meio de metodologias de datação foi possível estimar o tempo em que ocorreram os eventos de cladogênese no gênero *Bothrops* que se originou no Neógeno e se diversificou a partir das mudanças climáticas que aconteceram durante o período Quaternário. Os clados que não apresentaram resolução filogenética foram considerados resultantes de processo de especiação recente. Esses clados compartilham o mesmo padrão de distribuição geográfica de alguns espécimes dos haplogrupos A, B e C de *C. chacoensis*, que também podem ser resultado de processos de especiação recente, associados à baixa resolução filogenética observada neste estudo (Figuras 21 e 22). Werneck (2011) também sugeriu que os padrões de diversidade encontrados em espécies de áreas abertas da América do Sul tenham sido gerados por eventos tectônicos do Neógeno e pelas mudanças climáticas do Quaternário que influenciaram a distribuição dos diferentes tipos de vegetação nessa área, como as florestas *versus* as áreas de cerrado ou de caatinga, sendo estes últimos os ambientes preferidos pelas espécies de *Cryptonanus*.

Para outros táxons de pequenos mamíferos de áreas abertas como *Gracilinanus* e *Thrichomys* (roedor), têm-se discutido a importância do Rio São Francisco no processo de especiação (Nascimento *et al.* 2013; Faria *et al.* 2013). Porém, o padrão encontrado nesses estudos não foi recuperado nas análises em *Cryptonanus*. De modo geral, as

espécies de *Cryptonanus* mantêm-se agrupadas e estruturadas geograficamente e os rios não parecem estar atuando como barreiras geográficas para a distribuição das diferentes espécies (Figuras 28 e 29).

Com base neste estudo é possível propor uma hipótese de diversificação em que *C. unduaviensis* se diferenciou anteriormente, a partir de uma linhagem mais basal, dado que é o mais divergente dentre as espécies de *Cryptonanus* analisadas. No entanto, a ordem de surgimento dos outros clados de *Cryptonanus* não pôde ser resolvida a partir das análises realizadas, o que indica uma diversificação muito recente desses táxons. Essa falta de resolução é o resultado do curto período de tempo disponível para o acúmulo de mutações nas sequências de DNA mitocondrial, mantendo a similaridade genética entre os táxons caracterizados com estes marcadores (Funk e Omland, 2003).

CONCLUSÕES

Baseado nas análises genéticas, o gênero *Cryptonanus* é monofilético. Entretanto, a relação de parentesco entre *Cryptonanus* e os outros gêneros da Tribo Thylamyini continua incerta.

A hipótese 2 é aquela que melhor estabelece a delimitação das espécies de *Cryptonanus*, com base: 1) na congruência entre a distribuição geográfica e a reconstrução filogenética; 2) nos intervalos de valores caracterizados nas análises de distância genética intra e interespecífica e 3) no reconhecimento de linhagens genéticas reciprocamente monofiléticas nas análises filogenéticas. Concluimos, portanto, que os haplogrupos reconhecidos nos clados de *C. agricolai* (haplogrupos A, B e C) e de *C. chacoensis* (haplogrupos A, B, C e D) representam sete espécies distintas (duas previamente reconhecidas e cinco novas). Os dois nomes atualmente válidos, *C.*

agricolai e *C. chacoensis*, aplicam-se apenas aos clados seguidos da letra “A”. As espécies novas não possuem nomes disponíveis na literatura corrente. Por isso, indicamos a necessidade de revisão taxonômica do grupo para identificação de caracteres diagnósticos tomando como base os novos táxons identificados neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Agrizzi, J., Farro, A.P.C., Duda, R., Costa, L.P., Leite, Y.C.R., 2012. Molecular Diagnosis of Atlantic Forest Mammals using mitochondrial DNA sequence: Didelphid Marsupials. *Open Zool. J.* 5, 2-9.
- Akaike, H. An information criterion (AIC)., 1976. *Math. Scien.* 153, 5-9.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Austerlitz, F., David, O., Schaeffer, B., Bleakley, K., Olteanu, M., Leblois, R., Veuille, M., Laredo, C., 2009. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics* 10 Suppl 14S10.
- Avise, J.C., 1994. *Molecular markers, natural history, and evolution.* Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36, 3-15.
- Baker, R.J., Bradley, R.D., 2006. Speciation in mammals and the Genetic Species Concept. *J. Mammal.* 87, 643-662.
- Ball, S.L., Hebert, P.D.N., Burian, S.K., Webb, J.M., 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 24, 508-524.
- Barban, J.V., Carmignotto, A.P., Lessinger, A.C., 2009. Caracterização de “*primers*” táxon-específicos para otimizar a amplificação da região denominada “DNA Barcode” em marsupiais neotropicais. *Resumo do 55º Congresso Brasileiro de Genética.* Águas de Lindóia, SP. ISBN 978-85-89109-06-2.
- Barrett, R.D.H.; Hebert, P. D. N., 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zoo.* 83, 481-491.

- Borisenko, A.V., Lim, B.K., Ivanova, N.V., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Resour.* 3, 471–479.
- Bradley, R. D., Baker, R. J., 2001. A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-b sequences and mammals. *J. Mammal.* 82, 960–973.
- Bradley, R. D., Carroll, D. S., Haynie, M. L., Martinez, R. M., Hamilton, M. J., Kilpatrick, C. W., 2004. A new species of *Peromyscus* from western Mexico. *J. Mammal.* 85, 184–1193.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T., 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting, in: A.R. Hoelzel (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, pp. 225-269
- Cáceres, N.C., Carmignotto, A.P., Fischer, E., Santos, C.F., 2008. Mammals from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List.* 4, 321-335.
- Carmignotto, A.P., 2009. Taxonomy and phylogeny of the Brazilian species of *Cryptonanus* Voss et al., 2005 (Didelphimorphia: Didelphidae). Abstracts in Symposium: Systematics of New World Marsupials: Recent Progress and Future Prospects (Revised), Conveners: R.S. Voss and S.A. Jansa. 10th International Mammalogical Congress, Mendoza, Argentina.
- Carmignotto, A.P., 2013. The importance of sexual dimorphism and continuous growth in *Cryptonanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) species delimitation. Resumo do 11° Internacional Mammalogical Congress. Irlanda, Belfast.
- Carmignotto, A.P., Monfort, T., 2006. Taxonomy and distribution of the Brazilian species of *Thylamys* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Mamm.* 126-144.

- Clare, E.L., Lim, B.K., Engstrom, M.D., Eger, J.L., Hebert, P.D.N., 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*, 7, 184-190.
- Costa, L.P., 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic forests of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J. Biogeogr.* 30, 71-86.
- Coyne, J. A., Price, T. D., 2000. Little evidence for sympatric speciation in island birds. *Evolution*, 54, 2166–2171.
- Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. *Speciation*. Sinauer Press, Massachusetts.
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithol.* 1, 159-187.
- D'Elía G., Martínez J.A., 2006. Registros uru- 2006. Registros uruguayos de *Gracilinanus Gardner* y *Creighton*, 1989 y *Cryptonanus Voss*, Lunde y Jansa, 2005 (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mastozoo. Neotrop.* 13,245-249.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Bio. J. Linn. Soc.*, 8, 407-415.
- de la Sancha, N.U.; D'Elia, G., Teta P., 2011. Systematics of the subgenus of mouse opossums *Marmosa (Micoureus)* (Didelphimorphia, Didelphidae) with noteworthy records from Paraguay. *Mamm. Biol.* 77, 229-236.
- de Queiroz, K., 1998. The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation, in: *Endless Forms: Species and Speciation*, Oxford University Press, Cambridge, pp. 57-75.
- Diaz, M., Barquez, R., 2008. *Cryptonanus ignitus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 November 2013.

- Díaz, M.M., Flores, D.A, Barquez, R.M., 2002. A New Species Of Gracile Mouse Opossum (Didelphimorphia: Didelphidae), From Argentina. *J. Mammal.* 83, 824-833.
- Ditchfield, A.D., 2000 The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Mol. Ecol.* 9, 1307–1318.
- Elias, M., Hill, R.I., Willmott, K.R., Dasmahapatra, K.K., Brower, A.V.Z., Mallet, J., Jiggins, C.D., 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proc R Soc B* 274: 2881–2889.
- Faria, M.B., Nascimento, F.F., de Oliveira, J.A., Bonvicino, C.R., 2013. Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *J. Hered.* 104, 613-626.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 34, p. 397-423.
- Gardner, A.L., 2008. Cohort Marsupialia, in: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.). *Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats*, third ed. Chicago, University of Chicago Press. A taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press. Pp 1-116
- Gardner, A.L., G.K. Creighton., 1989. A new generic name for Tate's (1933) microtarsus group of South American mouse opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 102, 3-7.
- Giarla, T.C., Voss, R.S., Jansa, S.A., 2010. Species limits and phylogenetic relationships in the Didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 346, 1-67.

- Giarla, T.C., Voss, R.S., Jansa, S.A., 2013. Hidden diversity in the Andes: Comparison of species delimitation methods in montane marsupials. *Mol. Phylogenet. Evol.* 70, 137-151.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786
- Goto, S.G., Kimura, M.T., 2001. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 404-422.
- Guilardi, M. D., Carmignotto, A.P., Lessinger, A.C, 2014. Caracterização de três regiões do genoma nuclear em *Cryptonanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) para obtenção de marcadores filogenéticos. Resumo 30º Congresso Brasileiro de Zoologia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Gutiérrez, E.E., Jansa, S. A., Voss, R. S., 2010. Molecular systematics of mouse opossums (Didelphidae: *Marmosa*): assessing species limits using mitochondrial DNA sequences, with comments on phylogenetic relationships and biogeography. *Am. Mus. Novit.* 3692, 1–22.
- Hajibabaei, M., 2006. DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *P.N.A.S.* 103, 968–971.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Clare, E.L., Hebert. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *B.M.C. Biology.*, 5(24).
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160–74.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* 2, 312.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., 2003 a. Biological identification through DNA barcodes. *Pro. R. Soc. B.* 270, 313-321.

- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Sys. Biol.* 54, 852-859.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003 b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Pro. R. Soc. B.* 270, S96-S99.
- HersHKovitz, P., 1992. The South American gracile mouse opossums, genus *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989 (Marmosidae, Marsupialia): a taxonomic review with notes on general morphology and relationships. *Fieldiana Zoo.* 70, 1-56.
- Johns, G.C., Avise, J.C., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1481–1490.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. Myiata, T., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33, 511–518.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kramer, B., van der Bank, H., Flint, N., Sauer-Gürth, H.; Wink, M., 2003. Evidence for parapatric speciation in the Mormyrid fish, *Pollimyrus castelnaui* (Boulenger, 1911), from the Okavango–Upper Zambezi River Systems: *P. marianne* sp. nov., Defined by Electric Organ Discharges, Morphology and Genetics. *Environ. Biol. Fishes.* 67, 47-70.
- Loss, S., Costa, L.P., Leite, Y.L.R., 2011. Geographic variation, phylogeny and systematic status of *Gracilinanus microtarsus* (Mammalia: Didelphimorphia: Didelphidae). *Zootaxa.* 2761, 1-33.
- Machado, T., Silva, V.X., Silva, M.J., 2013. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages,

- evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification
Mol. Phylogenet. Evol. 71, 1-14.
- Maddison, W. P., Maddison, D. R., 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>.
- Mallet, J., Willmot, K., 2003 Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? Trends Ecol. Evol. 18, 57–59.
- Mantel, N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Canc. Res. v. 27, p. 209 – 220.
- Marshall, L.G., 1977. *Lestodelphys halli*. Mamm. Species. 81, 1-3.
- Mayr, E., 1963. Animal species and evolution. Cambridge, Harvard University Press.
- Meier, R., 2008. DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges, in: Wheeler, Q. The new taxonomy. CRC Press, Boca Raton.
- Meyer, A., 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. Trends Ecol. Evol. 9, 278–280.
- Meyer, C.P., Paulay, G., 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biol 3: 2229–2238.
- Mikkelsen, N.T., Schander, C., Willassen, E., 2007. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): a case study. Zool. Scr. 36, 455–463.
- Moojen, J., 1943. Alguns mamíferos colecionados no nordeste do Brasil. Bol. Mus. Nac. Zoo. 1, 1-14.
- Moritz, C. Cicero, C., 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biol: 2, 1529–31.
- Nascimento, F. F., Lazar, A., Menezes, A.N., Durans, A. M. , Moreira, J., Salazar-Bravo, J. , Dandrea, P. S., Bonvicino, C. R., 2013. The Role of Historical Barriers in the Diversification Processes in Open Vegetation Formations during the

- Miocene/Pliocene Using an Ancient Rodent Lineage as a Model. *Plos One*, v. 8, p. 61924.
- Nicolas, V., Schaeffer, B., Missouf, A.D., Kennis, J., Colyn, M., Denys, C., Tatard, C., Cruaud, C., Laredo, C., 2012. Assessment of Three Mitochondrial Genes (16S, Cytb, CO1) for Identifying Species in the Praomyini Tribe (Rodentia: Muridae). *PLoS ONE* 7(5): e36586.
- Nilsson, M.A., Gullberg, A., Spotorno, A.E., Arnason, U., Janke, A., 2003. Radiation of extant marsupials after the K/T boundary: evidence from complete mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 57, S3-S12.
- Othman, O.E.M., 2012. Mitochondrial DNA as a Marker for Genetic Diversity and Evolution. *Adv. Genet. Eng. Biotechnol.* 1, 1.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V.N., Underwood, E.C., D'amico, J.A., Itoua, I., Strand, H.E., Morrison, J.C., Loucks, C.J., Allnutt, T.F., Ricketts, T.H., Kura, Y., Lamoreux, J.F., Wettengel, W.W., Hedao, P., Kassem, K.R., 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience*. 51, 933-938.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M., 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* 7, 16.
- Padial, J.M.; de la Riva, I., 2007. Integrative taxonomists will use and produce DNA barcodes. *Zootaxa*. 1586, 67–68
- Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*, Blackwell Science, Oxford.
- Paglia, A.P., da Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Herrman, G., Aguiar, L.M.S., Chiarello, A.G., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Siciliano, S., Kierulff, M.C.M., Mendes,

- S.L., Tavares, V.C., Mittermeier, R.A., Patton, J.L., 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª edição. Occasional Paper, 6, 1-82.
- Patton, J.L., da Silva, M.N.F., 1997. Definition of species of pouched four eyed opossums (Didelphidae, *Philander*). J. Mamm., 78, 90-102.
- Patton, J.L., dos Reis, S.F., da Silva, M.N.F., 1996. Relationships among Didelphid Marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome B gene. J. Mamm. Evol. 3, 3-29.
- Peakall, R.O.D., Smouse, P.E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes, 6, 288-295.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25, 1253-1256.
- Quintela, F.M., Ibarra, C., Colares, E.P., 2011. Utilização de abrigos e latrinas por *Lontra longicaudis* (Olofers, 1818) em um arroio costeiro na Área de Proteção Ambiental da Lagoa Verde, Rio Grande do Sul, Brasil. Neotrop. Biol. Conserv. 6, 35-43.
- Rambaut, A., 2009. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: Tracer [Online]. Website last modified in 2009 (accessed on August 18, 2011). Available at <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.4. Disponível em : <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BoldSystems (Barcode of Life Data Systems). Mol. Ecol. Notes, 7, 355-364.
- Riedel, A., Sagata, K., Suhardjono, Y.R., Tänzler, R., Balke, M., 2013. Integrative taxonomy on the fast track - towards more sustainability in biodiversity research. Front. Zoo. 10, 15.

- Roca, A. L., Georgiadis, N., Pecon-Slattery, J., O'Brien, S. J., 2001. Genetic evidence for two species of elephant in Africa. *Science*, 293, 1473–1477.
- Ronquist, F., J.P. Huelsenbeck., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Rossi, R. V., Brandão, M.V., Carmignotto, A. P., Miranda, C. L., Gerem, J., 2012. Diversidade morfológica e taxonômica de Marsupiais Didelfídeos, com ênfase nas espécies Brasileiras, in: Cáceres, N. C. (Org.), *Marsupiais do Brasil*, segunda ed. UFMS, Campo Grande, v. 1. pp.23-72.
- Rossi, R.V., Bianconi, G.V., Carmignotto, A.P., Miranda, C.L., 2010, in: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Fregonezi, M.N., Rossaneis, B.K. (Orgs.), *Ordem Didelphimorphia*. In: *Mamíferos do Brasil - Guia de Identificação*. Technical Books Editora Ltda, Rio de Janeiro, pp. 19-74.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Savolainen, V., Anstett, M.C., Lexer, C.; Hutton, I., Clarkson, J.J., Norup, M.V., Powell, M.P., Springate, D., Salamin, N., Baker, W.J., 2006. Sympatric Speciation in Palms on an Oceanic Island. *Nature*. 441, 210–213.
- Schliewen, U., Kocher, T., McKaye, K.R., Seehausen, O., Tautz, D., 2006. Evidence for sympatric speciation? *Nature*. 444, E12–E13.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Sys. Biol.* 7, 539.
- Sites, J., Marshall, J., 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18, 462–470.

- Smith, M.A., Fisher, B.L., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: The ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc.* 360, 1825-1834.
- Solari, S., 2011. A molecular perspective of the diversification of short-tailed opossums (*Monodelphis*: Didelphidae). *Mastozool. Neotrop.* 17, 317-333.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690.
- Steiner, C., Catzeflis, F.M., 2004. Genetic variation and geographical structure of live mouse-sized opossums (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *J. Biogeogr.* 31, 959-973.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Tate, G.H.H., 1931. Brief diagnosis of 26 apparently new forms of *Marmosa* (Marsupialia) from South America. *Am. Mus. Nov.* 493, 1-14.
- Tauber, C. A., Tauber, M. J., 1977. Sympatric speciation based on allelic changes at three loci: evidence from natural populations in two habitats. *Science*, 197, 1298-99.
- Teta, P.; D'Elia, G.; Flores, D.; de la Sancha, N., 2009. Diversity and distribution of the mouse opossums of the genus *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) in north-eastern and central Argentina. *Gayana.* 73, 180-199.
- Teta, P.; Pardiñas, U.F.J. 2010. Mammalia, Didelphimorphia and Rodentia, central Santa Fe Province, Argentina. *Check List.* 6, 552-554.
- Tyndale-Biscoe, C.H., Renfree, M.B., 1987. *Reproductive Physiology of Marsupials.* Cambridge University Press, Oxford.

- Vanlentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24, 110-117.
- Voss, R.S., Gardner, A.L., Jansa, S.A., 2004. On the relationships of “*Marmosa*” formosa Shamel, 1930 (Marsupialia: Didelphidae), a phylogenetic puzzle from the Chaco of Northern Argentina. *Am. Mus. Nov.* 3442: 1-18.
- Voss, R.S., Jansa, S.A., 2009. Phylogenetic relationships and classification of Didelphid Marsupials, an extant radiation of new world Metatherian Mammals. *Bul. Am. Mus. of Nat. Hist.* 322, 1-177.
- Voss, R.S., Lunde, D.P., Jansa, S.A., 2005. On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *Am. Mus. Nov.* 3481, 1-34.
- Ward, R., Zemplak, T., Innes, B., Last, P., Hebert, P., 2005. DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil. Trans. R. Soc.* 360, 1847–1857.
- Werneck, F.P., 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quat. Sci. Rev.* 30, 1630–1648.
- Wiemers, M., Fiedler, K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4, 8.
- Wiens, J.J., Penkrot, T.A., 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*, 51, 69–91.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D., 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst. Biol.* 54, 844 - 851.
- Wood, T. K., Guttman, S. I., 1983. *Enchenopa binotata* complex: sympatric speciation? *Science*, 220, 310-312.

- Wund, M. E., Myers, P., 2012. The Animal Diversity Web (online). Disponível em:
<<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Metatheria.html>
>. Acessado 21 dez. 2013.
- Zehner, R., Amendt, J., Schütt, S., Sauer, J., Krettek, R., Povolný, D., 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). Intern. J. Leg. Med. 118, 245-247.

ANEXO I.

Lista dos espécimes de *Cryptonanus* analisados para a região *col* e *cytb*, incluindo o táxon, o número de campo, a instituição onde o material encontra-se depositado ou o nome do coletor (veja explicação para os acrônimos citados em Material e Métodos), a localidade e o número entre parênteses, citado na Figura 3 e no Anexo IV. Os espécimes sequenciados para cada marcador estão assinalados com “X”.

Táxon	N. de campo	Instituição	Localidade (nº gazetteer)	<i>col</i>	<i>cytb</i>
<i>C. agricolai</i> A	APC 1351	MZUSP	Rio da Conceição –TO (32)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	ARB 473	Coletor	Fazenda São João –TO (30)	X	-
<i>C. agricolai</i> A	ARB 819	Coletor	Monte Alegre de Sergipe –SE (36)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	ARB 820	Coletor	Monte Alegre de Sergipe –SE (36)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	ARB 821	Coletor	Monte Alegre de Sergipe –SE (36)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	ARB 832	Coletor	Porto da Folha –SE (37)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	MTR13508	IB-USP	Trancoso –Bahia (29)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	MTR13510	IB-USP	Trancoso –Bahia (29)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	PCM02	MZUSP	Barra do Camaragipe –AL (38)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	UU 178	IB-USP	E. E. Uruçui-Una –PI (35)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	UUPI 134	IB_USP	E. E. Uruçui-Una –PI (35)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	UUPI 167	IB-USP	E. E. Uruçui-Una –PI (35)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	UUPI 419	IB-USP	E. E. Uruçui-Una –PI (35)	X	X
<i>C. agricolai</i> A	UUPI 440	IB-USP	E. E. Uruçui-Una –PI (35)	X	X
<i>C. agricolai</i> B	RMM220	MZUSP	Novo São Joaquim-MT (21)	X	X
<i>C. agricolai</i> B	RMM224	MZUSP	Novo São Joaquim-MT (21)	X	X
<i>C. agricolai</i> B	MN79	MZUSP	Campo Verde-MT (18)	X	X
<i>C. agricolai</i> B	MN642	MZUSP	Jangada-MT (20)	X	X
<i>C. agricolai</i> B	M 111	IB-USP	Gaúcha do Norte –MT (24)	X	X
<i>C. agricolai</i> C	CAP 033	MZUSP	Poços de Caldas –MG (10)	X	X
<i>C. agricolai</i> C	DQM 013	IB-USP	Serra da Canastra –MG (11)	X	X
<i>C. agricolai</i> C	FB 982	Coletor	Tapiraí –SP (7)	X	X
<i>C. agricolai</i> C	FB103	Coletor	Tapiraí –SP (7)	X	X
<i>C. agricolai</i> C	FU 60/ FU 30	Coletor	Ibiúna –SP (8)	X	-
<i>C. agricolai</i> C	APC 1165	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> A	APC 1172	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> A	APC 1189	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	ARB 144	Coletor	P. E. Nascentes do Alto Taquari –MS (14)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	JE73	Coletor	P. E. do Espinilho –RS (2)	X	X
<i>C. chacoensis</i> A	LTU566	CENPAT	Formosa –Argentina (6)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	M813	MZUSP	Alto Araguaia-MT (15)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	M815	MZUSP	Alto Araguaia-MT (15)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	M 97147	IB-USP	Cláudia –MT (25)	-	X
<i>C. chacoensis</i> A	PNPA 293	MZUSP	P. N. do Pantanal –MT (17)	-	X

ANEXO 1-continuação.

N. de campo	Táxon	Instituição	Localidade	col	cytb
<i>C. chacoensis</i> A	TS107	UFMT	Alto Araguaia –MT (16)	X	X
<i>C. chacoensis</i> A	ARSM18	UFMT	Nova Ubiratã –MT (22)	-	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 1152	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 1163	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 1164	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 1179	MZUSP	Águas de Santa Bárbara –SP (9)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 573	IB-USP	P. N. das Emas –GO (13)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 595	IB-USP	P. N. das Emas –GO (13)	-	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 703	MZUSP	P. N Grande Sertão Veredas –MG (28)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 793	MZUSP	CIAB –DF (26)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 798	MZUSP	CIAB –DF (26)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 851	MZUSP	CIAB –DF (26)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	APC 852	MZUSP	CIAB –DF (26)	X	X
<i>C. chacoensis</i> B	ARB 396	Coletor	Fazenda Estância Paraná –GO (27)	-	X
<i>C. chacoensis</i> B	LAB061	UFMT	Cuiabá –MT (19)	X	X
<i>C. chacoensis</i> C	APC 593	IB-USP	P. N. das Emas –GO (13)	X	X
<i>C. chacoensis</i> C	ARB 121	Coletor	P. N. Araguaia –TO (33)	X	X
<i>C. chacoensis</i> C	MRT7489	IB-USP	Guaraí –TO (34)	X	X
<i>C. chacoensis</i> C	SS 14	MZUSP	São Salvador –TO (31)	X	X
<i>C. chacoensis</i> C	SS 28	MZUSP	São Salvador –TO (31)	X	X
<i>C. chacoensis</i> D	MSB01	MZUSP	Comodoro-MT (23)	X	X
<i>C. guahybae</i>	FZ 408	UFSC	Chapecó –SC (4)	X	X
<i>C. guahybae</i>	GMC 1	Coletor	P. E. do Turvo –RS (3)	-	X
<i>C. guahybae</i>	GMC 2	Coletor	P. E. do Turvo –RS (3)	X	X
<i>C. guahybae</i>	JS 235	Coletor	E. E. do Taim –RS (1)	X	X
<i>C. guahybae</i>	JS 272	Coletor	E. E. do Taim –RS (1)	X	X
<i>C. unduaviensis</i>	NK15247	MSB	Santa Cruz –Bolívia (40)	X	X
<i>C. unduaviensis</i>	NK13912	MSB	Pando –Bolívia (42)	X	X
<i>C. unduaviensis</i>	NK 11825	MSB	Santa Cruz –Bolívia (41)	X	-
<i>C. unduaviensis</i>	NK 12313	MSB	Santa Cruz –Bolívia (39)	X	X
<i>C. unduaviensis</i>	NK 14234	MSB	Pando –Bolívia (42)	X	X

ANEXO II

Dados das sequências extraídas do Genbank, incluindo o marcador, o número de acesso, o tamanho (pares de base) e a referência.

Táxon	n° acesso do Genbank	pb	Referência
<i>col</i>			
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	GU112803.1	657	Agrizzi <i>et al.</i> (2012)
<i>Marmosops incanus</i>	JQ030977.1	509	Sousa e Fonseca, dados não publicados
<i>Marmosops invictus</i>	JF444319.1	657	Eger <i>et al.</i> , dados não publicados
<i>Marmosops noctivagus</i>	EU095431.1	657	Borisenko I. (2008)
<i>Marmosops parvidens</i>	JQ599992.1	657	BOLD (<i>Barcode of Life</i>)
<i>Marmosops pinheiroi</i>	JF457808.1	657	Lim <i>et al.</i> , dados não publicados
<i>Monodelphis domestica</i>	AJ508398	1541	Nilsson <i>et al.</i> (2003)
<i>Thylamys elegans</i>	AJ508401.2	1541	Nilsson <i>et al.</i> (2003)
<i>cytb</i>			
<i>Cryptonanus agricolai</i>	LBCE7486 (12)	1149	Faria <i>et al.</i> (2013)
<i>Cryptonanus chacoensis</i>	GD521 (5)	713	Teta <i>et al.</i> (2009)
<i>Gracilinanus aceramarcae</i>	HQ622162.1	801	Loss <i>et al.</i> (2011)
<i>Gracilinanus emiliae</i>	HM583367.1	943	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	GU112891.1	801	Agrizzi <i>et al.</i> (2012)
<i>Lestodelphys halli</i>	HM583365.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Marmosops impavidus</i>	HM583368.1	1107	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Marmosops incanus</i>	GU112905.1	801	Agrizzi <i>et al.</i> (2012)
<i>Marmosops pakaraimae</i>	F47080	1149	Voss <i>et al.</i> (2013)
<i>Marmosops parvidens</i>	AJ487007.1	820	Steiner e Catzeflis (2003)
<i>Marmosops paulensis</i>	JLP16216	1149	Voss <i>et al.</i> (2013)
<i>Marmosops pinheiroi</i>	MDC589	1149	Voss <i>et al.</i> (2013)
<i>Monodelphis domestica</i>	AJ508398	1149	Nilsson <i>et al.</i> (2003)
<i>Thylamys elegans</i>	AJ508401.2	1149	Nilsson <i>et al.</i> (2003)
<i>Thylamys karimii</i>	HM583381.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys macrurus</i>	HM583383.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys pallidior</i>	HM583413.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys pusillus</i>	HM583419.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys pusillus</i>	GQ911595	801	Teta <i>et al.</i> (2009)
<i>Thylamys sponsorius</i>	HM583445.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys tatei</i>	HM583449.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys velutinus</i>	HM583451.1	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys venustus</i>	HM583499	1149	Giarla <i>et al.</i> (2010)

ANEXO III

Exemplares do grupo externo analisados, incluindo o táxon, o número de campo, a instituição onde o material está depositado e a localidade. Espécimes sequenciados para cada marcador estão assinalados com “X”.

Táxon	N. de campo	Instituição	Localidade	col	cytb
<i>Gracilinanus agilis</i>	ARB15	IB-USP	P. N. das Emas –GO	X	X
<i>Gracilinanus agilis</i>	ARB36	IB-USP	P. N. das Emas –GO	X	-
<i>Gracilinanus agilis</i>	ARB48	IB-USP	P. N. das Emas –GO	X	X
<i>Gracilinanus agilis</i>	ARB71	IB-USP	P. N. das Emas –GO	X	X
<i>Gracilinanus agilis</i>	ARP73	IB-USP	P. N. Serra das Confusões –PI	X	X
<i>Gracilinanus agilis</i>	DAM 23	IB-USP	P. N. Serra das Confusões –PI	X	X
<i>Gracilinanus cf. agilis</i>	MJ27	MZUSP	E. E. Mujica Nava –RO	-	X
<i>Gracilinanus cf. emiliae</i>	PCM05	MZUSP	Barra do Camaragipe –AL	X	X
<i>Monodelphis cf. kunsii</i>	MJ 502	MZUSP	UHE Jirau –RO	X	-
<i>Thylamys karimii</i>	DAM03	IB-USP	P. N. Serra das Confusões –PI	X	-
<i>Thylamys macrurus</i>	THY 3	MZUSP	Coxim –MS	X	X

ANEXO IV

Lista das localidades dos espécimes de *Cryptonanus* analisados no presente estudo.

PAÍS, *Estado*, Município, **Localidade** [coordenada geográfica].

- 1- BRASIL, *Rio Grande do Sul*, Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, **Estação Ecológica do Taim** [32°44'S, 52°34'W].
- 2- BRASIL, *Rio Grande do Sul*, Barra do Guarai, **Parque Estadual do Espinilho** [30°11'S, 57°30'W].
- 3- BRASIL, *Rio Grande do Sul*, **Parque Estadual do Turvo** [27°9'S, 53°53'W].
- 4- BRASIL, *Santa Catarina*, Chapecó, **Marechal Borman** [27°5'S, 52°37'W].
- 5- PARAGUAI, *Caazapá*, **Estancia Dos Marias** [26°46'S, 56°32'W].
- 6- ARGENTINA, *Formosa*, **Laguna Blanca** [25°12'S, 55°00'W].
- 7- BRASIL, *São Paulo*, Piedade, **Tapiraí** [27°9'S, 53°53'W].
- 8- BRASIL, *São Paulo*, Ibiuna, **Caucaia do Alto** [23°43'S, 47°5'W].
- 9- BRASIL, *São Paulo*, Águas de Santa Bárbara, **Estação Ecológica de Santa Bárbara** [22°48'S, 49°14'W].
- 10- BRASIL, *Minas Gerais*, Poços de Caldas, **Poços de Caldas** [21°47'S, 46°34'W].
- 11- BRASIL, *Minas Gerais*, São Roque de Minas, **Parque Nacional da Serra da Canastra** [20°21'S, 46°29'W].
- 12- BRASIL, *Goiás*, **Serranópolis** [18°18'S, 51°57'W].
- 13- BRASIL, *Goiás*, Mineiros, **Parque Nacional das Emas** [18°16'S, 52°53'W].
- 14- BRASIL, *Mato Grosso do Sul*, Alto Taquari, **Parque Estadual Nascentes do Alto Taquari** [18°8'S, 53°18'W].
- 15- BRASIL, *Mato Grosso*, Alto Araguaia, **LT Madeira** [17°25'S, 53°17'W].
- 16- BRASIL, *Mato Grosso*, Alto Araguaia, **Fazenda Araras** [17°14'S, 53°41'W].
- 17- BRASIL, *Mato Grosso*, Poconé, **Parque Nacional do Pantanal** [17°51'S, 57°25'W].
- 18- BRASIL, *Mato Grosso*, Campo Verde, **LT Madeira** [15°49'S, 55°24'W].
- 19- BRASIL, *Mato Grosso*, Cuiabá, **Cuiabá** [15°44'S, 55°46'W].
- 20- BRASIL, *Mato Grosso*, Jangada, **LT Madeira** [15°7'S, 56°38'W].
- 21- BRASIL, *Mato Grosso*, Novo São Joaquim, **Rio das Mortes** [15°13'S, 53°91'W].
- 22- BRASIL, *Mato Grosso*, Nova Ubiratã, **Nova Ubiratã** [13°6'S, 54°49'W].
- 23- BRASIL, *Mato Grosso*, Comodoro, **Morro sem Boné** [13°45'S, 60°20'W].
- 24- BRASIL, *Mato Grosso*, Gaúcha do Norte, **Gaúcha do Norte**, [13°5'S, 53°17'W].
- 25- BRASIL, *Mato Grosso*, Cláudia, **Cláudia** [11°35'S, 55°10'W].

- 26- BRASIL, *Distrito Federal*, Brasília, **Centro de Instrução e Adestramento de Brasília** [16°1'S, 47°57'W].
- 27- BRASIL, *Goiás*, Alvorada do Norte, **Fazenda Estância Paraná** [14°31'S, 46°47'W].
- 28- BRASIL, *Minas Gerais*, Formoso, **Parque Nacional Grande Sertão Veredas** [15°16'S, 45°52'W].
- 29- BRASIL, *Bahia*, Trancoso, **Fazenda Nova Alegria** [16°32'S, 39°7'W].
- 30- BRASIL, *Tocantins*, Paranã, **Fazenda São João** [12°55'S, 47°37'W].
- 31- BRASIL, *Tocantins*, São Salvador do Tocantins, **São Salvador do Tocantins** [12°28'S, 48°15'W].
- 32- BRASIL, *Tocantins*, Rio da Conceição, **Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins** [11°14'S, 46°51'W].
- 33- BRASIL, *Tocantins*, Pium e Lagoa da Confusão, **Parque Nacional do Araguaia** [10°27'S, 50°29'W].
- 34- BRASIL, *Tocantins*, Guaraí, **Guaraí** [8°38'S, 48°29'W].
- 35- BRASIL, *Piauí*, Baixa Grande do Ribeiro, **Estação Ecológica Uruçuí-Una** [8°51'S, 45°1'W].
- 36- BRASIL, *Sergipe*, Monte Alegre do Sergipe, **Fazenda do Sr. Eloy** [10°2'S, 37°36'W].
- 37- BRASIL, *Sergipe*, Porto da Folha, **Vaca Serrada** [9°59'S, 37°35'W].
- 38- BRASIL, *Alagoas*, Passo de Camaragipe, **Barra do Camaragipe** [9°19'S, 35°25'W].
- 39- BOLÍVIA, *Santa Cruz*, **4 km N e 1 km W Santiago de Chiquitos** [18°18'S, 59°36'W].
- 40- BOLÍVIA, *Santa Cruz*, **2 km S Caranda** [17°33'S, 63°32'W].
- 41- BOLÍVIA, *Santa Cruz*, **Estancia Cachuela Esperanza** [16°47'S, 63°14'W].
- 42- BOLÍVIA, *Pando*, **Independencia** [11°26'S, 67°34'W].