



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**BIOGEOGRAFIA E SISTEMÁTICA DE TRÊS ESPÉCIES DE
PEQUENOS MAMÍFEROS (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA)
DO CERRADO E CAATINGA**

LEONARDO FERREIRA MACHADO

BRASÍLIA, OUTUBRO DE 2016

**BIOGEOGRAFIA E SISTEMÁTICA DE TRÊS ESPÉCIES DE
PEQUENOS MAMÍFEROS (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA)
DO CERRADO E CAATINGA**

LEONARDO FERREIRA MACHADO

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA, DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM ZOOLOGIA.

ORIENTADOR: PROF. DR. JADER MARINHO-FILHO

BRASÍLIA, OUTUBRO DE 2016



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Zoologia

Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Tese de Doutorado

Leonardo Ferreira Machado

Título:

Biogeografia e sistemática de três espécies de pequenos mamíferos
(Rodentia e Didelphimorphia) do Cerrado e Caatinga

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jader Marinho-Filho

Presidente / Orientador

ZOO/UnB

Prof. Dr. Alexandre Reis Percequillo

Membro Titular

ESALQ/USP

Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano

Membro Titular

GEM/UnB

Prof. Dr. Antônio Aguiar

Membro Titular

ZOO/UnB

Prof. Dr. Eliécer Gutiérrez

Membro Titular

ZOO/UnB

“...o verdadeiro mundo natural, feito de silêncio, caos e noite antiga, prossegue tão hostil e inóspito quanto na aurora dos tempos, maldição a ser combatida com todas as forças e todos os meios, por mais que os discursos vigentes afirmem o contrário. Apenas sua derrota permitirá a plenitude do mito, pois é em torno desse adversário vencido e inerme que se consolida a visão idílica da paisagem natural como um autêntico jardim das delícias, fantasia construída sobre tristes remanescentes domesticados que variam entre a casa de campo, o bosque suburbano e o parque nacional”.

Papavero & Teixeira (2001, p. 1032)¹

¹ Papavero, N. & Teixeira, D. M. (2001). Os viajantes e a biogeografia: *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, vol. VIII (suplemento), 1015-1037.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e ensinamentos ao longo da vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. Jader Marinho-Filho e ao meu coorientador Dr. Fernando Pacheco Rodrigues pela orientação, oportunidade de trabalhar em conjunto e pela confiança depositada em mim.

Aos colegas e amigos pela colaboração no primeiro capítulo da tese, Ana Carolina Loss, Emerson Monteiro Vieira e Anderson Paz.

Aos colegas e amigos do Laboratório e Coleção de Mamíferos da UnB e do Laboratório de Genética e Biodiversidade agradeço pelo auxílio em laboratório e conversas sobre biogeografia, evolução e ecologia dos animais encontrados no Cerrado e biomas vizinhos.

Agradeço aos colegas e amigos que auxiliaram nas coletas de campo: Renato Rosa, Thales Magalhães, Tiago, Nárjara Veras, Lilian e Arthur.

Agradeço à Dra. Alexandra Bezerra, Dra. Ana Paula Carmignotto e Dra. Leonora Costa pela doação de tecidos de espécimes estudadas na presente tese.

Aos amigos e colegas Dr. Fabrícus Domingos e Dr. Yuri Luiz Reis Leite pelas valiosas sugestões e conselhos sobre análises e comentários sobre o trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília pelo apoio. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pela autorização de captura e coleta de espécimes.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu atingisse mais um objetivo na minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
Referências bibliográficas.....	15
Capítulo 1: A new species of tree rat (<i>Phyllomys</i> , Echimyidae) from Brazilian Cerrado supports Miocene connection between Amazon and Atlantic forests	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
Introduction.....	20
Material and methods.....	22
Results.....	26
Discussion	42
References.....	47
Appendix 1.1.....	54
Appendix 2.1.....	58
Appendix 3.1.....	59
Appendix 4.1	60
Appendix 5.1.....	61
Capítulo 2: Filogeografia e delimitação de espécies em <i>Gracilinanus agilis</i> (Didelphimorphia, Didelphidae) nos biomas Cerrado e Caatinga	72
Introdução	73
Materiais e Métodos.....	75
Resultados	80
Discussão	86
Referências bibliográficas.....	90
Anexo 1.2.....	96
Anexo 2.2.....	97
Anexo 3.2.....	101
Anexo 4.2	104
Capítulo 3: Expansão demográfica de <i>Calomys tener</i> (Rodentia, Cricetidae) durante o Quaternário tardio no Cerrado: respostas ao efeito do fogo e ocupação humana pré-histórica.....	105
Introdução	106
Materiais e métodos	107
Resultados	114
Discussão	120
Referências bibliográficas.....	122
Anexo 1.3.....	127
Anexo 2.3.....	129
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130

RESUMO

Os domínios morfoclimáticos da Caatinga e do Cerrado possuem características únicas tanto em termos climáticos, quanto físicos e biológicos. Apresentam ambientes e fitofisionomias particulares que sofreram alterações históricas em seus limites de distribuição geográfica em consequência de mudanças climáticas, eventos geológicos e até mesmo devido a ocupação humana e efeitos de queimadas. Apesar deste passado dinâmico, a história evolutiva e a diversificação dos organismos com distribuição nestes ambientes são pouco exploradas em estudos modernos que utilizam sequências de DNA e métodos biogeográficos, filogeográficos e de demografia histórica. Esta condição é ainda mais evidente em relação aos roedores e marsupiais de pequeno porte, que apesar de serem os grupos de mamíferos com maior diversidade de espécies da América do Sul, são pouco representados em investigações sobre suas diversificações e relações históricas com o Cerrado e a Caatinga. É neste contexto que a presente tese procura contribuir. Foram utilizadas sequências de DNA e métodos filogenéticos e filogeográficos para investigar a relação entre a diversificação de espécies de pequenos mamíferos com a evolução de seus habitats inseridos em fitofisionomias do Cerrado e Caatinga. O primeiro capítulo explora hipóteses filogenéticas e biogeográficas no gênero *Phyllomys* e contém a descrição de uma nova espécie com distribuição em matas de galerias do Cerrado e áreas de transição com a Floresta Atlântica. Além disso, com base em análise de distribuição ancestral de *Phyllomys* e outros gêneros distribuídos na Amazônia, é proposta uma hipótese de que habitats apropriados para a ocorrência de ratos de espinho arborícolas se estendem na atual região sul e central do Cerrado promovendo uma conexão entre Amazônia e Floresta Atlântica durante o Mioceno. O segundo capítulo investiga as relações filogeográficas entre populações de *Gracilianus agilis* da Caatinga e Cerrado. Propõe que as alterações demográficas sofridas por esta espécie tem relação com a evolução das Matas Secas da região e que *G. agilis* pode abrigar mais de uma espécie. Por último, o terceiro capítulo avalia se houve alterações demográficas ao longo do tempo em populações de *Calomys tener* e propõe que eventos de fogo e a ocupação humana na região do Cerrado são fatores que alteram a paisagem natural, criando habitats que possibilitaram o crescimento populacional desta espécie.

ABSTRACT

The morphoclimatic domains of Cerrado and Caatinga are unique in terms of biotic, climatic, and geological features. The phytophysiognomies of Cerrado and Caatinga suffered multiple changes in their geographic distribution during the last millions years as a consequence of climatic and geologic modifications, fire in natural environments, and pre-historic human settlements. However, the diversification and historical evolution of organisms distributed in these regions are poorly studied. This is much more clearly if one tries to find Cerrado and Caatinga biogeographical studies based in small mammals (rodents and marsupials) as models, and using modern phylogenetic and phylogeographic methods. In this thesis, I used DNA sequences and phylogenetic and phylogeographic methods to investigate small mammals evolution and their relationship with the Cerrado and Caatinga phytophysiognomies. The first chapter propose phylogenetic and biogeographic hypothesis for the genus *Phyllomys*. It contains a description of a new species of *Phyllomys* and a hypothesis of past link between Amazon and Atlantic forest of South America through where the central/southern Cerrado biome is today. The second chapter investigates phylogeographical relationships of *Gracilinanus agilis* populations distributed in the Cerrado and Caatinga. I propose that historical expansions and retractions of dry forests of Cerrado and Caatinga are drivers for the diversification of this species, and that populations under *G. agilis* may represent more than one species. The third chapter focus on historical demographic changes in populations of *Calomys tener*. The results indicates that burning in natural areas, as well as the pre-historic human settlements may have favored the population expansion of *Calomys tener* during the late Quaternary.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.1: Bayesian inference phylogram 1 based on concatenated (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, *COI*, and *Cytb*) molecular data set. Numbers near nodes represent Bayesian posterior probabilities.....28
- Figure 2.1: Live holotype of *Phyllomys centralis* sp. n. (UNB 3820) after been captured in a live trap installed in a canopy of gallery forest located in the southern portion of APA Gama Cabeça-de-Veados - Federal District, central Brazil. Foto: André Mendonça.30
- Figure 3.1: Dorsal and ventral views of skins of specimens of *Phyllomys centralis* sp. n. The holotype (UNB 3820 - above), and two paratypes (MCN-M 2709 - center; MCN-M 2027 - below). Scale bar = 11cm32
- Figure 4.1: Dorsal, ventral, and lateral views of skull and lateral view of mandible of holotype of *Phyllomys centralis* sp. n. - UNB 3820. (scale bar = 1cm).34
- Figure 5.1: Right mandibular (left) and maxillary tooththrows of *Phyllomys centralis* sp. n. (paratype MCN-M2709).34
- Figure 6.1: Post cranium axial skeleton of *Phyllomys centralis* sp. n. A – atlas: dorsal tubercle (dt) and ventral tubercle (vt); B – axis: spinous process (sp); C – cervical vertebrae: lamina ventralis (lv) of the sixth cervical vertebra; E – neural process (np) of second thoracic vertebra; D – the eleventh thoracic vertebra (tv11), and the seventh lumbar vertebra (lv7); F – second sacral vertebra (sv2), ischium (isch), and iliac crest (ic); G – first caudal vertebra (cv1), neural process (np).35
- Figure 7.1: Sternum region and appendicular skeleton of *Phyllomys centralis* sp. n. A – sternum region: sternebrae (ste), manubrium (man), and xiphisternum (xiphi); B – scapula: infraspinous fossa (if), suprascapular fossa (sf); C – humerus: deltoid tuberosity (dt); D – radio and ulna: olecranon process (op), and trochlear notch (tn); E – femur: greater trochanter (gt), head of femur (hf), and lesser trochanter (lt); F – tibia and fibula; G – manus; H – pes.36
- Figure 8.1: Molecular dating chronogram of *Phyllomys* inferred from concatenated genes (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, and *Cytb*). Horizontal bars represent 95% credibility intervals for time estimates.40
- Figure 9.1: Map of South America showing the limits of the Cerrado, Amazon, and Atlantic Forest biomes. The Atlantic Forest is depicted in sub-regions (see Material and methods for detail). The red polygon refer to the geographic distribution of *Phyllomys blainvillii*, which is distributed in the relict of Atlantic Forest (Brejos). White star and circles represent collection localities of specimens of *Phyllomys centralis* sp. n. used in molecular analyses. White star represent the type locality (Brasília, Federal District – Brazil) of *Phyllomys centralis* sp. n. The chronogram is the result of molecular dating analysis inferred from concatenated genes (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, and *Cytb*). Colored circles near terminal names refers to geographical distribution of each taxon accordingly to associated biomes. Pie chart shows approximate probabilities of ancestral area distribution (only areas with probabilities higher than 30% are shown). Geological time limits are based in Gibbard *et al.* (2010).41
- Figura 1.2: A) Grupos genéticos indicados pela análise no programa BAPS; B) Filograma resultante da análise filogenética com base em sequências do *cyt-b* realizada no programa MrBayes. Nós com círculo preto apresentam

- probabilidade posterior $> 0,95$; C) Mapa mostrando Cerrado em bege, Caatinga em marrom e rio São Francisco em cinza. Cores das barras em figura A e dos terminais da filogenia em B indicam correspondência com as localidades de mesma coloração da figura C.....82
- Figura 2.2: A) Filogenias de genes nucleares, da esquerda para direita: OGT, P4HB e PPIC. Nós com círculo em preto significam probabilidade superior $> 0,95$; B) Filogenia de espécies (cytb e PPIC): terminais A, B e C são populações derivadas das localidades correspondentes na figura C. C) mapa indicando localidades de origem das sequências analisadas nas árvores de gene e de espécie. Caatinga em marrom e Cerrado em bege.83
- Figura 3.2: Tamanho efetivo populacional através do tempo das populações A (esquerda), B (centro), C (direita) de *G. agilis* com base em Bayesian Skyline Plots. Área em azul representa intervalo de 95% de HPD.....85
- Figura 1.3: Mapa destacando a região do Cerrado e pontos de coleta de espécimes de *Calomys tener* utilizados nas análises..... 109
- Figura 2.3: Modelos demográficos históricos de populações de *C. tener* testados no programa DIYABC. 1) população grande sem alteração demográfica ao longo do tempo; 2) população pequena sem alteração demográfica; 3) expansão demográfica no começo do Holoceno coincidindo com ocupação humana e registro de fogo no Cerrado – clima seco; 4) expansão demográfica há 32.000 anos atrás devido a existência de um Cerrado antigo frequentemente atingido por fogo – clima seco; 5) expansão demográfica a partir do último máximo interglacial, modelo alternativo – clima quente e úmido. Ne = tamanho da população efetiva. Tempo fora de escala. 113
- Figura 3.3: Redes de haplótipos com base nos marcadores ADH (A), Bfib (B) e cytb (C). Cada círculo representa um haplótipo. Quanto maior o tamanho do círculo maior o número de amostras apresentando o mesmo haplótipo. Cores representam localidades de coleta de acordo com a legenda a direita. Traços nos braços que ligam haplótipos representam números de mutações 115
- Figura 4.3: Filogenias resultantes da análise bayesiana com base em sequências do cytb (A), ADH (B) e Bfib (C). Retângulos indicam exemplares de *Calomys tener* (grupo interno). Probabilidade posterior (pp) para o monofiletismo de *C. tener*: pp=1 para cytb e ADH e pp=0.67 Bfib. 116
- Figura 5.3: Tamanho efetivo populacional através do tempo estimado com sequências do cytb de *C. tener* com base em Bayesian Skyline Plots. Área em azul representa intervalo de 95% de HPD. 117
- Figura 6.3: Árvore de espécies utilizando sequências de todos os marcadores (cytb, ADH e Bfib) e datação molecular. Número próximo ao nó significa probabilidade posterior. Probabilidade abaixo de 0,9 não apresentada. 118
- Figura 7.3: *Plots* do algoritmo de regressão logística para cada cenário demográfico estimado no programa DIYABC. Modelos 3 e 4 com maiores valores de probabilidade posterior. 119

LISTA DE TABELAS

Table 1.1: Cranial measurements of <i>Phyllomys centralis</i> sp. n. (UNB 3820, MCN-M2709, and MCN-M2153), <i>Phyllomys blainvillii</i> , and <i>Phyllomys brasiliensis</i> . Measurements taken from <i>Phyllomys blainvillii</i> , and <i>Phyllomys brasiliensis</i> were taken from Leite (2003).	37
Table 2.1: Table showing selected characters used to delimit <i>P. centralis</i> sp. n. in relation to the sister species (<i>P. mantiqueirensis</i>) and species with similar geographic distribution: <i>P. blainvillii</i> and <i>P. brasiliensis</i>	39
Tabela 1.2: Resultados obtidos nos testes de desvios do modelo neutro de evolução para as diferentes populações encontradas. Indicadores estatísticos utilizados: <i>D</i> Tajima, <i>F_s</i> Fu e <i>R₂</i> Ramos-Onsins and Rozas.....	84
Tabela 1.3: Valores das estatísticas <i>D</i> de Tajima, <i>F_s</i> de Fu e <i>R₂</i> de Ramos-Onsins e Rozas, que testam desvios do modelo neutro de evolução. Asterisco indica probabilidade < 0,05	118

INTRODUÇÃO GERAL

O corredor de formações abertas da América do Sul forma uma diagonal de ambiente secos composta pela Caatinga no nordeste do Brasil, Cerrado no Brasil central e Chaco, que ocupa porções da Argentina, Paraguai e Bolívia (Werneck, 2011). Em especial, o Cerrado e a Caatinga possuem características climáticas, geológicas e biológicas únicas (Ab'Sáber, 2000) e isolam as duas maiores regiões de florestas úmidas da América do Sul, Amazônia e Floresta Atlântica. A Caatinga é formada em grande parte por florestas decíduas (matas secas) e considerada como maior remanescente de uma vegetação estabelecida de maneira relictual na América do Sul, América Central e sul da América do Norte (Prado & Gibbs, 1993). O Cerrado, por sua vez, é caracterizado por um gradiente horizontal de fitofisionomias e basicamente composto por savanas, campos, matas secas e florestas de galerias (Ratter *et al.* 1997; Ribeiro & Walter 2008). Em especial, as florestas de galerias do Cerrado compartilham componentes vegetais com a Amazônia no norte/nordeste e com Floresta Atlântica no sul/sudeste (Oliveira-Filho & Ratter 1995) formando corredores de vegetação mais úmida ocupados por organismos autóctones e derivados dos biomas vizinhos. Além disso, são propostas conexões históricas entre florestas da Amazônia e Floresta Atlântica em regiões em que hoje em dia o Cerrado e a Caatinga estão estabelecidos (Oliveira-Filho & Ratter 1995). Eventos de contato e isolamento entre estas florestas estariam relacionados com o histórico de retrações e expansões ao longo do tempo das fitofisionomias do Cerrado e da Caatinga que ocorreram em função de mudanças climáticas e geológicas (Andrade-Lima, 1982; Auler *et al.* 2004; Bigarella *et al.* 1975; Rizzini, 1963; Werneck *et al.* 2011). Esta dinâmica histórica estabelece um complexo cenário evolutivo para a biota destas regiões pouco explorado em estudos biogeográficos (Werneck, 2011).

Informações provenientes de sequências de DNA representam dados robustos para estudos biogeográficos. A filogeografia é uma disciplina que faz uso deste conjunto de dados e permite inferir processos evolutivos intraespecíficos e analisar a estruturação geográfica com base em genealogias (Avice *et al.* 1987). Uma derivação desta disciplina, a demografia histórica, permite testar cenários de contato entre populações, expansão e retração demográfica ao longo do tempo fornecendo indícios da ocorrência de seleção natural, deriva e gargalos genéticos numa perspectiva geográfica (Avice, 2009; Hickerson *et al.* 2010). Além disso, sequências de DNA viabilizam estudos de biogeografia histórica (Yu *et al.* 2010; Yu *et al.* 2015) e datação

molecular (Drummond *et al.* 2006), permitindo compreender quais seriam as áreas de distribuição dos ancestrais de táxons viventes e em que épocas ocorreram os eventos de diversificação, dispersão e extinção que foram determinantes para a configuração do cenário biogeográfico atual. A aplicação de tais métodos com base em sequências de DNA pode contribuir decisivamente para o entendimento da história biogeográfica das formações abertas da diagonal seca, bem como permitir o teste de hipóteses propostas em estudos pioneiros na região (e.g. Werneck *et al.* 2011).

Pequenos mamíferos das ordens Didelphimorphia e Rodentia representam os grupos com maior diversidade de espécies da América do Sul (Gardner & Creighton, 2007; Lessa *et al.* 2014, Patton *et al.* 2015) e com grande número de gêneros e espécies endêmicas da Caatinga e Cerrado (Carmignotto *et al.* 2012). Pequenos roedores e marsupiais tem servido de modelos de estudo para investigações biogeográficas em escalas regional (Giarla *et al.* 2014), continental (Leite *et al.* 2014) e global (Schenk *et al.* 2013). Contudo, hipóteses filogeográficas e de demografia histórica no Cerrado e Caatinga utilizando estes grupos como modelos são escassas, podendo ser enumeradas algumas poucas pesquisas com *Calomys* (Almeida *et al.* 2007; Nascimento *et al.* 2011), *Trichomys* (Nascimento *et al.* 2013) e *Gracilinanus agilis* (Faria *et al.* 2013). Neste contexto, estudos que relacionem a dinâmica evolutiva do Cerrado e Caatinga com evidências de estruturação genética e diversificação de pequenos mamíferos é uma demanda evidente e um campo pouco investigado nas formações vegetais da diagonal de ambientes secos.

O objetivo da presente tese foi investigar a diversificação de pequenos mamíferos no Cerrado, Caatinga e florestas de galeria do Cerrado e suas conexões com Amazônia e Floresta Atlântica. Para isso utilizou-se dados de sequências de DNA e métodos filogeográficos, demografia histórica, datação molecular e biogeografia histórica tendo como grupos de estudo as espécies *Calomys tener* (Rodentia, Cricetidae), *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) e o gênero *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae). A obtenção de amostras foi conduzida através de coletas em campo em diversas localidades inseridas no Cerrado e adjacências deste bioma, precisamente nas seguintes localidades: Parque Nacional (PARNA) de Emas – GO; PARNA da Chapada dos Guimarães – MT; PARNA Serra da Canastra – MG; PARNA Grande Sertão Veredas – BA, MG; PARNA do Araguaia – TO; PARNA Chapada das Mesas – MA; Parque Estadual Serra de Ricardo Franco – MT; e região do rio das Mortes, nas proximidades do município de Nova Xavantina –

MT. Adicionalmente, por meio de doações de colegas e coleções científicas, foram obtidas amostras de tecidos de animais de diversas outras localidades compreendendo um conjunto de dados totalmente original e representativo em relação ao conhecimento da distribuição geográfica dos organismos estudados.

A tese está estruturada em três capítulos. O primeiro trata da biogeografia histórica do gênero *Phyllomys* e descreve uma espécie nova para a região do Cerrado e áreas de transição com a Floresta Atlântica. O segundo capítulo investiga as relações entre estruturação geográfica de populações de *G. agilis* do Cerrado e Caatinga e a dinâmica histórica de expansões e retrações das Matas Secas, principal habitat desta espécie. Por último, o terceiro capítulo avalia se houve alterações demográficas ao longo do tempo em populações de *C. tener* no Cerrado, e se tais alterações tem relação com a incidência de fogo em seu habitat.

Referências bibliográficas

- Ab'Sáber, A. N. (2000). The natural organization of Brazilian inter-and subtropical landscapes. *Revista Do Instituto Geológico*, 21, 57–70.
- Andrade-Lima, D. de. (1982). Present-day forest refuges in northeastern Brazil. In G. T. Prance (Ed.), *Biological diversification in the Tropics* (pp. 245–251). New York: Columbia University Press.
- Auler, A. S., Wang, X., Edwards, R. L., Cheng, H., Cristalli, P. S., Smart, P. L., & Richards, D. A. (2004). Quaternary ecological and geomorphic changes associated with rainfall events in presently semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Quaternary Science*, 19, 693–701.
- Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Bigarella, J. J., Andrade-Lima, D. de, & Riehs, P. J. (1975). Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. In J. J. Bigarella & R. D. Becker (Eds.), *Simpósio internacional sobre o Quaternário* (47th ed., pp. 411–464). Curitiba - Porto Alegre: Anais da Academia Brasileira de Ciências.
- Carmignotto, A. P., Vivo, M. De, & Langguth, A. (2012). Mammals of the Cerrado and Caatinga: distribution patterns of the tropical open biomes of central South America. In B. D. Patterson & L. P. Costa (Eds.), *Bones, clones and biomes. The history and geography of recent Neotropical mammals* (pp. 307–350). Chicago, Illinois: University of Chicago Press.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4, 699–710.
- Faria, M. B., Nascimento, F. F., Oliveira, J. A., & Bonvicino, C. R. (2013). Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity*, 104, 613–626.
- Giarla, T. C., Voss, R. S., & Jansa, S. A. (2014). Molecular Phylogenetics and Evolution Hidden diversity in the Andes: Comparison of species delimitation methods in montane marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 137–151.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. a, Graham, C. H., Johnson, J. B., ... Yoder, a D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avice, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291–301.
- Leite, R. N., Kolokotronis, S., Almeida, F. C., Werneck, F. P., Rogers, D. S., & Weksler, M. (2014). In the wake of invasion: tracing the historical biogeography of the South American cricetid radiation. *Plos One*, 9, 1–12.
- Lessa, E. P., Cook, J. A., D'Elía, G., & Opazo, J. C. (2014). Rodent diversity in South

- America: transitioning into the genomics era. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 1–7.
- Nascimento, F. F., Lazar, A., Menezes, A. N., Durans, M., Moreira, J. C., Salazar-Bravo, J., ... 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*, 8, 1–13.
- Oliveira-Filho, A. T., & Ratter, J. A. (1995). A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburg Journal of Botany*.
- Patton, J. L., Pardiñas, U. F. J. & D'Elía, G. (2015). *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*. University of Chicago Press. Chicago (1384 pages)
- Prado, D. E., & Gibbs, P. E. (1993). Patterns of species distribution in the Dry Seasonal Forest of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 902–927.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., & S., B. (1997). The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*, 80, 223–230.
- Rizzini, C. T. (1963). Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia*, 1, 3–64.
- Schenk, J. J., Rowe, K. C., & Stepan, S. J. (2013). Ecological opportunity and incumbency in the diversification of repeated continental colonizations by Muroid rodents. *Systematic Biology*, 62, 837–640.
- Werneck, F. P. (2011). The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30, 1630–1648.
- Werneck, F. P., Costa, G. C., Colli, G. R., Prado, D. E., & Sites Jr, J. W. (2011). Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidences. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 272–288.
- Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., & He, X. (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87, 46–49.
- Yu, Y., Harris, A. J., & He, X. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 848–850.

Capítulo 1

A new species of tree rat (*Phyllomys*, Echimyidae) from Brazilian Cerrado supports Miocene connection between Amazon and Atlantic forests

RESUMO

As florestas de galeria localizadas no Cerrado do Brasil central possuem intensa presença de elementos vegetais da Amazônia e da Floresta Atlântica. Diversas hipóteses são propostas sobre conexões históricas entre Amazônia e Floresta Atlântica em locais onde hoje o Cerrado e a Caatinga estão estabelecidos, e que tais conexões seriam determinantes para a diversificação de organismos presentes nestas regiões. Neste estudo foram investigadas as relações filogenéticas do rato de espinho da Floresta Atlântica (*Phyllomys*, Echimyidae) e feita a descrição de uma nova espécie oriunda de florestas de galerias do Cerrado e áreas de transição entre Cerrado e Floresta Atlântica. Foram realizadas análises de datação molecular e distribuição geográfica dos ancestrais das espécies viventes de *Phyllomys* e grupos externos (*Echimyys* e *Makalata*) distribuídos na Amazônia, com o objetivo de gerar hipóteses sobre possíveis rotas de dispersão e locais que poderiam abrigar conexão entre a Floresta Atlântica e a Amazônia. Durante o Mioceno, o ancestral comum mais recente de *Phyllomys* e *Echimyys* provavelmente ocupava a região em que hoje está situada a porção central/sul do Cerrado, enquanto que a maioria dos eventos de diversificação em *Phyllomys* ocorreram durante o Plioceno e Pleistoceno. Os resultados indicam uma possível existência de conexão florestal durante o Mioceno entre Amazônia e Floresta Atlântica na região atual central/sul do Cerrado, favorecendo uma hipótese de conexão pretérita nesta região entre as duas formações florestais. A espécie nova de *Phyllomys* é a única do gênero com distribuição na região *core* do Cerrado, indicando que houve uma especiação *in situ* de uma linhagem derivada de divergência antiga na árvore de *Phyllomys* e implicando em expansões e contrações de florestas durante o período Terciário.

ABSTRACT

The gallery forests in the Brazilian Cerrado, a vast tropical savanna in South America and a biodiversity hotspot, are composed by biotic elements derived from the adjacent Amazon (AM) and the Atlantic Forest (AF) biomes. Past connections between AM and AF took place through the region where the dry Cerrado and Caatinga domains occur today. Here we describe and name a new species of Atlantic Forest tree rat, *Phyllomys centralis* sp. n., from the gallery forests of the Cerrado and transitional areas. We inferred molecular phylogenies, divergence dates, and ancestral ranges of *Phyllomys* species and their close relatives from the AM, *Echimys* and *Makalata*. The most recent common ancestor of *Phyllomys* and *Echimys* probably occupied the central/southern region of the Cerrado during the Miocene, while the diversification within *Phyllomys* species in the AF occurred during the Plio-Pleistocene. These results favor the hypothesis of a past link between AM and AF where the central/southern Cerrado biome is today. The new species found in the gallery forests of Cerrado indicate *in situ* speciation of a lineage derived from an ancient divergence and implying that forest expansion and contractions occurred during the Tertiary.

Introduction

The Amazon (AM) and Atlantic Forest (AF) in South America are separated by a “diagonal of open formations” (Ab’Sáber 1977), a corridor of drylands composed by the Argentinean and Paraguayan Chaco, the Caatinga in north-eastern Brazil, and the Cerrado. The Cerrado domain lies over 2,000,000 km² in central Brazil with, basically, three main vegetation types: savannas, dry forests (both deciduous and semi-deciduous forests), and gallery forests (Ratter *et al.* 1997; Ribeiro & Walter 2008). In particular, floristic elements from forested formations of the Cerrado are shared with the AM in the north/west and with AF at east/southern portion of the Cerrado (Oliveira-Filho & Ratter 1995).

There is evidence indicating biotic similarities between AF and central Brazilian forests that extend over the Cerrado, leading to the hypothesis of a past forest link between AM and AF (Rizzini 1963; Oliveira-Filho & Ratter 1995). Recent studies reinforced this idea by showing phylogeographic affinities between forest trees from AF and gallery forests of Cerrado (Ramos *et al.* 2009), bird lineages shared by AF and Cerrado gallery forests (Silva 1997), and sister group relationships among lineages of mammals (Costa 2003) and amphibians (Fouquet *et al.* 2012) distributed in AM and AF. Time and place where the connections between AM, AF, and Cerrado forests occurred are variable, indicating a number of events of expansions and retractions of forested and non-forested environments during the Tertiary and Quaternary (e.g. Oliveira-Filho & Ratter 1995; Auler *et al.* 2004). Basically, there are three main hypothetical routes that likely played a role in the dynamics of contacts between AF and AM: the northeastern route (Bigarella *et al.* 1975; Andrade-Lima 1982; Auler *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004) where the semi-arid Caatinga is nowadays the dominant ecosystem; the central route which could have run through central Brazil, either as a continuous forest corridor or as a series of forest patches (Por 1992; Oliveira-Filho & Ratter 1995; Costa 2003); and the southern route (Por 1992; Costa 2003; Batalha-Filho *et al.* 2013), where organisms from AF could have reached Amazonian formations through the Paraná hydrographic basin (Por 1992).

A clear case of sister lineages with disjunct distributions in the AM and AF occurs within the tree-dwelling sister genera *Echimyys* and *Phyllomys*, members of the family Echimyidae of spiny rats. Species of *Echimyys* are mainly distributed in AM forest and *Phyllomys* species are found in the AF (Leite & Patton 2002; Galewski *et al.* 2005; Upham *et al.* 2013) domain. After diverging from the common ancestor

shared with *Echimys*, the lineage leading to *Phyllomys* experienced an impressive diversification and, currently, species of *Phyllomys* are found in almost the entire range of the AF (Leite 2003), although there are no hypotheses regarding probable routes or geographic directions to the diversification of this genus. Systematics and taxonomy of *Phyllomys* is still very confuse, and only in the beginning of the 21th century species names attributed to morphotypes became more clearly recognized (Emmons *et al.* 2002). Thirteen nominal species of *Phyllomys* are recognized: *P. mantiqueirensis*, *P. medius*, *P. nigrispinus*, *P. pattoni*, *P. thomasi*, *P. unicolor*, *P. blainvillii*, *P. brasiliensis*, *P. dasythrix*, *P. kerri*, *P. lamarum*, *P. lundi*, and *P. sulinus* (Leite 2003; Leite *et al.* 2008). The great morphological similarities shared by them is seemingly resulted from a rapid event of diversification of the genus (Leite, 2003), and the recognition of some of these species is somewhat possibly based on karyotype information and molecular phylogenetics. More recently, phylogenetic analyses of nuclear and mitochondrial DNA detected other four monophyletic lineages of *Phyllomys*, representing species awaiting for formal description (Loss & Leite 2011; Araújo *et al.* 2014).

Recent small mammal collections in central Brazil revealed an unexpected record of an exemplar of *Phyllomys* in a gallery forest in the core area of the Cerrado biome. Evidences based in morphological and molecular genetics indicate this specimen as conspecific to *Phyllomys* specimens founded in transitional areas between Cerrado and AF, and identified as the fourth undescribed *Phyllomys* species by Araújo *et al.* (2013). We named and describe this new species in this present paper, and perform ancestral reographical range analyses of *Phyllomys* and related taxa from AM in order to explore hypotheses on the dynamic contact of forests within the Cerrado, AF, and AM. To verify the best-fit hypothesis among the three available alternative hypotheses regarding the routes and connections between the Cerrado forests, AM, and AF, we predict that if the ancestral range of the most recent common ancestor of *Phyllomys* and *Echimys* is estimated to be located at northeastern AF, then the northeastern contact route is likely to have played a role in the diversification of these genera. Otherwise, if the ancestral range of the most recent common ancestor of *Phyllomys* and *Echimys* is estimated to have occurred in the central or southern AF, then the two alternative contact routes (central and southern) are more likely to have played a role in the diversification of these genera.

Material and methods

Taxonomic sampling and morphological description

To investigate the phylogenetic relationship of the *Phyllomys* specimens, we used DNA sequences from the specimen collected in the Cerrado biome along with other 25 specimens as terminal taxa distributed in 13 recognized *Phyllomys* species (*sensu* Loss & Leite 2011; Araújo *et al.* 2014): *P. blainvillii*, *P. brasiliensis*, *P. dasythrix*, *P. lamarum*, *P. lundi*, *P. mantiqueirensis*, *P. nigrispinus*, *P. pattoni*, *P. sulinus*, *Phyllomys* sp. 1, *Phyllomys* sp. 2, *Phyllomys* sp. 3, and *Phyllomys* sp. 4. The Echimyidae species, *Echimyus chrysurus* and *Makalata didelphoides* were used as outgroups, given the closest relationship of these species and *Phyllomys*, typically retrieved as sister clades in previous studies (Loss & Leite 2011; Upham *et al.* 2013; Upham & Patterson 2015). Other four valid species of *Phyllomys* were not included in the present study (as any other molecular phylogenetic study) given the inexistence of DNA samples: *P. medius*, *P. kerri*, *P. thomasi*, and *P. unicolor*. However, the combination of morphological information and known geographic distribution of these four species suggest non-synonymies regarding to all other species of *Phyllomys* considered in our analyses (Leite, pers. comm.).

For the molecular clock analyses we included other clades of the Infraorder Hystricognathi, in order to accept multiple calibration points and composed by the Echimyidae *Dactylomys boliviensis*, *Mesomys hispidus*, *Isothrix bistrata*, *Thrichomys apereoides*, *Proechimys cuvieri*, *Myocastor coypus*, *Callistomys pictus*, *Trinomys iheringi*, *Euryzygomatomys spinosus*, *Clyomys laticeps*; the Octodontidae *Octodontomys gliroides*; the Ctenomyidae *Ctenomys coyhaiquensis*; the Abrocomidae; *Abrocoma bennettii*; and the Chinchillidae *Chinchilla lanigera*. For a complete list of specimens analyzed and museum catalog number see appendix 1.1.

For the morphological description of the new species we use the terminology of Argot (2004) and Carrizo & Díaz (2013) for post-cranial anatomy; for external and cranial morphology we follow Emmons *et al.* (2002) and Leite (2003); the dental nomenclature according to Iack-Ximenes *et al.* (2005). Morphological comparisons were made between *Phyllomys* sp. n. (specimens UNB3820, MCN-M2709, MCN-M2153), *P. brasiliensis* (specimens MCN-M1733, MCN-M1734), literature information for *P. blainvillii* (Leite, 2003) given the close geographic range of these species, and literature information (Leite, 2003) of the sister species *P. mantiqueirensis*.

Twenty-three cranial measurements were taken with a digital caliper to the nearest 0.01 mm. These are the same used by Leite (2003): greatest skull length (GSL), nasal length (NL), rostral length (RL), orbital length (OL), rostral breadth (RB), interorbital constriction (IOC), mastoid breadth (MB), zygomatic breadth (ZB), condyloincisive length (CIL), basilar length (BaL), diastema length (D), maxillary toothrow length (MTRL), total palatal length (PLa), posterior palatal length (PLb), incisive foramina length (IFL), bullar length (BuL), postpalatal length (PPL), mesopterygoid fossa width (MPF), maxillary breadth (MaxB), occipital condyle width (OccW), rostral depth (RD), cranial depth (CD), and cranial depth at M1 (CDM1). External measurements were obtained from skin tags or field notes: total length (TOL), tail length (TAL), hind-foot length (HF), and ear length (E).

Molecular data, phylogenetic reconstructions and dating

DNA extractions from tissue samples preserved in ethanol were made following Bruford *et al.* (1992). Five DNA fragments were used for the molecular phylogenetic reconstructions: the two mitochondrial genes cytochrome-*b* (*cytb*) and cytochrome-*c* oxidase I (*COI*); and three nuclear genes, the exon 28 of the nuclear von Willebrand factor (*vWF*), the exon 10 of the growth hormone receptor (*GHR*), and the recombination activating gene 1 (*RAG1*). Primers used in the amplification process were the MVZ05 and MVZ16 (Smith & Patton 1993) for the *cytb*; LCO and HCO (with a tail M13: LepF1_t1, VF1d_t1, LepR1_t1 e VR1d_t1) (Ivanova *et al.* 2007) for *COI*; V10 and W13 (Galewski *et al.* 2005), V2 and W1 (Huchon *et al.* 1999) for *vWF*; GHREND and GHR50F (Adkins *et al.* 2001), GHR10F, GHR11F e GHR14R (Upham *et al.* 2013) for *GHR*; RAG1F1705 and RAG1R2864 (Teeling *et al.* 2000), FMNH2b and FMNH3a (Patterson & Velazco 2008) for *RAG1*.

Concentration and volume of reagents used for each polymerase chain reaction (PCR) were variable for each species and can be obtained under request to the authors. Thermocycling conditions for the amplification process of each marker can be found at appendix 2.1.

PCR products were purified using ExoSAP enzymes (GE Healthcare Life Sciences). The cycle-sequencing reactions were performed using BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Inc.) and same primers used for PCR. Samples were sequenced in both directions using the automated DNA sequencer ABI 3500 (Applied Biosystems Inc.) following manufacturer's protocol for sequencing reaction.

Sequences were aligned in Geneious 6.1 (Biomatters, Auckland, New Zealand). Appropriate models of evolution for each gene partition were determined in jModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.* 2012), allowing for three substitutions schemes and gamma parameter estimate using Bayesian Information Criterion (see appendix 3.1 for selected evolutionary model for each partition). All obtained sequences were deposited in GenBank. Accession numbers of the sequences obtained here and additional sequences downloaded from GenBank are available in appendix 1.1.

We used Bayesian Inference (BI) implemented in MrBayes v.3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) to reconstruct phylogenetic relationships within *Phyllomys* species. This analysis was performed using a concatenated data set of all molecular markers (*cytb*, *COI*, *vWF*, *GHR*, *RAG1*) from 26 *Phyllomys* specimens and two outgroups (*Makalata didelphoides* and *Echimys chrysurus*) totaling 3,996 base pairs (bp) for each terminal taxa. The dataset was partitioned by gene allowing each partition to evolve under an independent model. We used two chains of Markov chain Monte Carlo (MCMC) in MrBayes running for 100 millions generations, sampling one tree every 500 generations, and resulting in 200,000 trees. We discarded the first 25% samples as burn-in and estimated a 50% majority-rule consensus from the remaining trees.

In order to calibrate the molecular clock, we included sequences from other Caviomorpha taxa (appendix 1.1). Since there are no *COI* sequences available for most of the outgroups used in this analysis we excluded this marker for the divergence time estimative, resulting in a data matrix with 44 terminal taxa and 3,330 bp (*cytb*, *vWF*, *GHR*, *RAG1*) for each taxa.

We estimated the time to most recent common ancestor (with SD and 95% credibility interval) among *Phyllomys* lineages using relaxed clock with Log normal distribution and Yule prior as implemented in BEAST 2.3.2 (Drummond *et al.* 2012) with unlinked evolutionary models and clock rates between partitions. We used a constraint topology by forcing the monophyly of groups according to our previous analysis with all molecular markers for *Phyllomys* species and following Upham and Patterson (2015), Upham *et al.* (2013) and Loss *et al.* (2014) for other Caviomorpha phylogenetic relationships. The software TRACER v1.3 (Rambaut & Drummond 2007) was used for check convergence in the log likelihood of retrieved trees.

Relaxed clock analysis performed in the BEAST software was used to date the phylogenetic tree. We used three fossils to calibrate the molecular clock following

Upham *et al.* (2013) and Upham and Patterson (2015). All calibration points were set as minimum dates (offset) with lognormal priors, mean =0 and standard deviation (SD) = 1. First calibration point represents the most recent common ancestor (MRCA) of Chinchilloidea/Octodontoidea. The minimum age was constrained at 29.5 million years ago using the oldest stem octodontoid, *Draconomys verai* from the early Oligocene Sarmiento Formation at Gran Barranca, Argentina, pre-Deseadan SALMA – South American Land Mammal Age (Vucetich *et al.* 2010; Antonie *et al.* 2012). Second calibration point represents MRCA of Octodontidae/Ctenomyidae. The minimum age was constrained at 5.7 Ma using the stem ancestor of *Ctenomys*, *Xenodontomys simpsoni* from the late Miocene Los Salitres Formation at Laguna Chasicó, Argentina, late Huayquerian SALMA (Verzi 2008; Verzi *et al.* 2013). Third calibration point represents MRCA of the *Thrichomys-Callistomys-Myocastor-Proechimys* clade. The minimum age was constrained at 6.0 Ma using the stem ancestor of the *Thrichomys* lineage, *Pampamys emmonsae* from the late Miocene Cerro Azul Formation at Laguna Chillhué, Argentina, Chasicuan-Huayquerian SALMA (Verzi *et al.* 1995, 2013; Olivares & Verzi 2014).

The Markov chains ran for 10^7 generations sampling 1 tree every 10^3 generations, which resulted in 10^4 trees. Tracer v1.6 (Rambaut *et al.* 2014) was used to visualize BEAST output files and check for convergence. This analysis indicated effective sample size values all higher than 200.

Biogeographic analyses

We constructed a map (Appendix 4.1) showing occurrence localities of *Phyllomys* species based in a series of records obtained in museum collections. A complete list of specimens used to construct the map and details are provided in Appendix 5.1).

The ancestral geographical distribution of *Phyllomys* species were inferred using the Bayesian approach - Bayesian Binary MCMC (BBM) Method For Ancestral State in the software RASP 3.1 (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies; Yu *et al.* 2015). Using this approach we can track what region of AF played a role in the contact with AM and forest areas of Cerrado during the diversification of *Phyllomys* and related outgroups. For this analysis the tree chronogram resulting from the dating analyses of BEAST software was used as input. We pruned the tree terminals so each species were represented by one sole terminal, and outgroups were represented by

Makalata didelphoides and *Echimys chrysurus*. The analysis was conducted using four areas of occurrence kept as maximum, ten chains of 5 millions generations, sampling every 100 generations, and discarding 25% of samples.

We used biomes (*biome* in the definition of Whittaker 1968: a grouping of communities of similar physiognomy and related environmental conditions within a single continent or region) to delimit the geographic ranges of the living *Phyllomys* species as follows: AM (the outgroups *Makalata didelphoides* and *Echimys chrysurus*); the Cerrado biome (*P. brasiliensis*, the specimen collected in the core area of Cerrado – UNB 3820, and *Phyllomys* sp. 4 from areas in the transition of AF and Cerrado); south AF (*P. nigrispinus*, *P. sulinus*, and *P. dasythrix*); south-central AF (*P. pattoni*, *P. lundi*, *P. mantiqueirensis*, *Phyllomys* sp. 1, and *Phyllomys* sp. 3); north-central AF (*P. pattoni* and *P. lamarum*); northeast AF (*Phyllomys* sp. 2); and the relicts of AF enclaves in the dry biome Caatinga – called “Brejos” (*P. blainvillii*). The sense for this regionalization in the distribution of *Phyllomys* in the AF is based in clades of *Phyllomys* associated to particular regions of the Atlantic forest (Leite *et al.* 2003; Loss & Leite 2011) and also by independent source of evidence for such regionalization of AF biota (Carnaval *et al.* 2009; Silva *et al.* 2012). Given that *Phyllomys brasiliensis* and *Phyllomys* sp. n. are recorded in transitional areas between Cerrado and AF, we conduct an alternative analyses considering these taxa to occur in transitional areas of Cerrado and AF as well.

Results

Phylogenetic analysis

The phylogeny resulted from Mr.Bayes analysis (Fig. 1.1) confirmed the monophyly of *Phyllomys* with high support. The lineage that leads to *Phyllomys pattoni* is derived from a basal dichotomy as the first divergence in *Phyllomys* tree. The specimens MCN-M 2027, MCN-M 2709 (referred as *Phyllomys* sp. 4 by Araújo *et al.* 2014) and UNB 3820 formed a well-supported clade sister to *P. mantiqueirensis*. These specimens display a unique combination of morphological characters, karyotype (Araújo *et al.* 2014), and distribution. Given these evidences we decided to name a new species as follows in the next sections. Specimens related to *Phyllomys* sp. 3 formed a well supported clade and is sister to a clade represented by remaining *Phyllomys* species. This clade is formed by two reciprocally monophyletic

clades that are represented by two unnamed species, *Phyllomys* sp. 1 and *Phyllomys* sp. 2, *P. blainvillii*, *P. lamarum*, *P. brasiliensis*, *P. lundii*, *P. nigrispinus*, *P. sulinus*, and *P. dasythrix*.

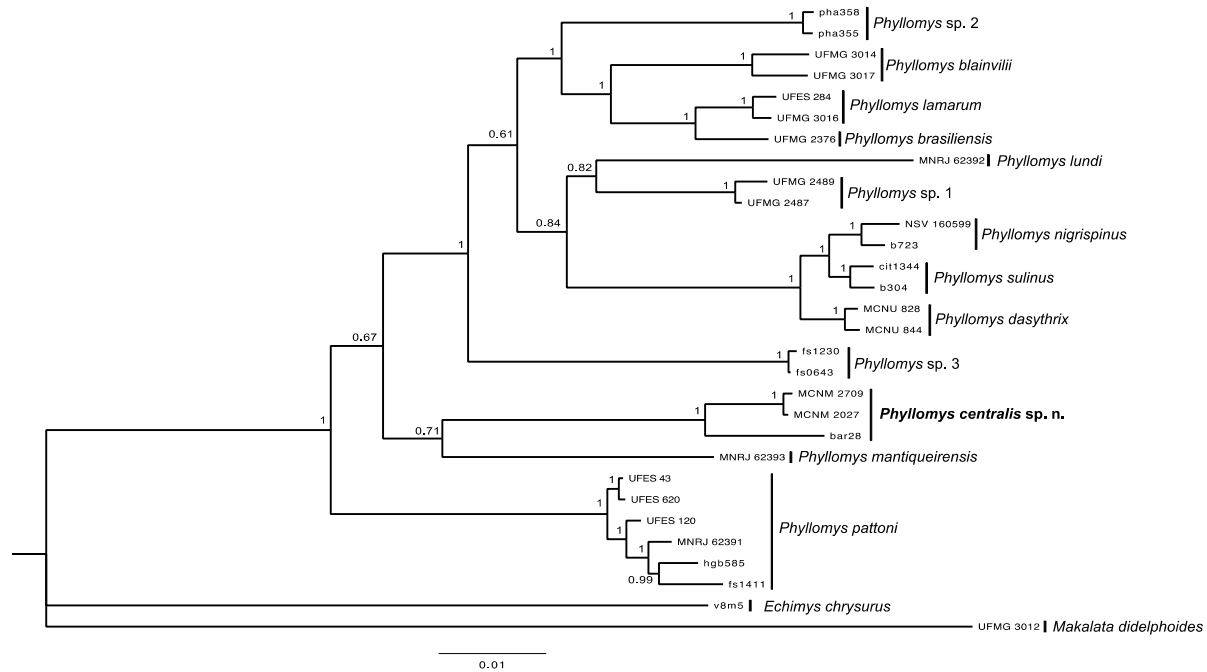


Figure 1.1: Bayesian inference phylogram 1 based on concatenated (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, *COI*, and *Cytb*) molecular data set. Numbers near nodes represent Bayesian posterior probabilities.

Description of the new species

Genus *Phyllomys* Lund, 1839

Phyllomys centralis sp. n. (Fig. 2.1)

Holotype. UNB 3820, adult female; skin, skull, partial skeleton, and tissue in ethanol. Collected by Anderson Paz, 5 March 2012. Deposited in the Mammals collection, Universidade de Brasília (UnB) under the catalog number UNB 3820 *cytb* sequence, GenBank acc. no. KX852221; *COI* sequence, GenBank acc. no. KX852223; *GHR* sequence, GenBank acc. no. KX852229; *RAG1* sequence, GenBank acc. no. KX852256; *vWF* sequence, GenBank acc. no. KX852279.

Type locality. BRAZIL, Distrito Federal, APA Gama Cabeça de Veado, 15°57'04.42"S, 47°57'48.85"W, 1100 m.

Paratypes. MCN-M 2027, young female collected by Kátia R. da Silva, 9 December 2010, BRAZIL, Minas Gerais, Santa Bárbara, 19°57'32"S, 43°24'54"W (skin, skull, partial skeleton, tissue in ethanol). MCN-M 2709, adult male, collected by Kátia R. da Silva, 26 January 2012, BRAZIL, Minas Gerais, Catas Altas, 20°4'27"S, 43°23'53"W (skin, skull, partial skeleton, tissue in ethanol). MCN-M 2153, adult, sex unknown, collected by Luciana Barçante, BRAZIL, Minas Gerais, Belo Horizonte, 19°49'S, 43°54'W (skin, skull, partial skeleton).

Etymology. The name *centralis* refers to the geographic distribution, which extend to the most central region of BRAZIL compared to the geographic distribution of other *Phyllomys* species.

Diagnosis. A medium sized species of *Phyllomys* with coarse dorsal pelage, reddish-brown speckled with black. Pelage color gradually changing to reddish-brown or beige toward the venter, with inguinal, gular and axillary white patches. Dorsal pelage on pes and manus light-brown to silver-white. Aristiforms on rump medium in length (ca. 24 mm) and thin (<0.5 mm), wider and paler at the base, thinning gradually toward the tip, which is either black or orange. Tail shorter than or equal to head and body length, covered with light-brown hairs to the tip, forming a bushy tuft. Upper toothrow parallel to slightly divergent posteriorly; palatine wider than M1. Supraorbital ridges well developed, interorbital region slightly divergent posteriorly.

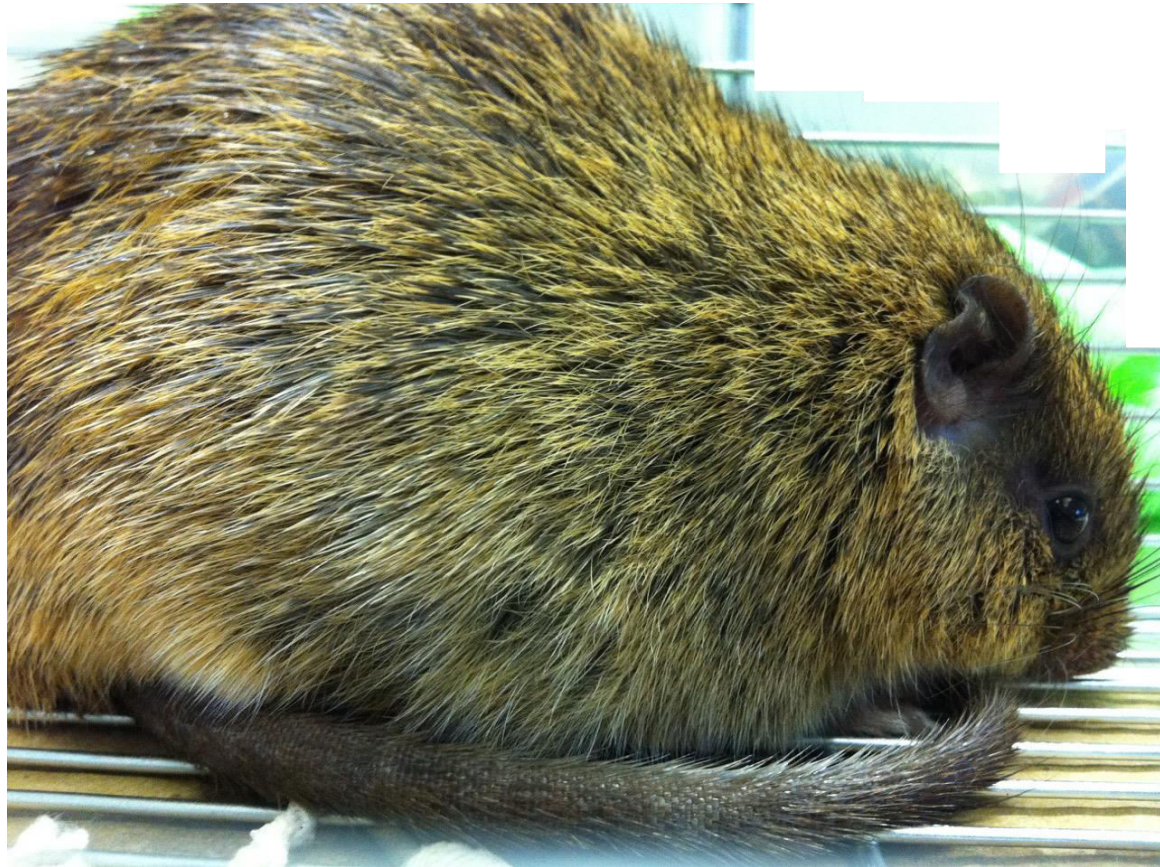


Figure 2.1: Live holotype of *Phyllomys centralis* sp. n. (UNB 3820) after been captured in a live trap installed in a canopy of gallery forest located in the southern portion of APA Gama Cabeça-de-Veado - Federal District, central Brazil. Foto: André Mendonça.

Zygomatic arch robust, maximum height approximately equal to or less than one third of jugal length. Postorbital process of zygoma well developed, formed exclusively by the jugal. Lateral process of supraoccipital short, extending to the midline of the external auditory meatus. Incisive foramen ovate, upper incisors orthodont. Karyotype (MCN-M2027): $2n = 76$, $FN = 140$ (Araújo *et al.* 2013, referred to as “*Phyllomys* sp. 4”).

Description

External measurements. Female (UnB UNB 3820, holotype). Total body length 471.5 mm, tail 224 mm, hindfoot 43 mm, ear 18.5 mm, weight 340 g. Male (MCN-M 2709, paratype). Total body length 425 mm, tail 211 mm, hindfoot 39 mm, ear 16 mm, weight 250 g. There are no external measurements for the specimen MCN-M2153 and the young female MCN-M 2027.

External morphology (Fig. 3.1) Medium sized body (*sensu* Emmons *et al.* 2002) with coarse pelage but not heavily spined. Dorsal head color similar to dorsum, nose reddish. Round and small ears densely covered by hairs two times larger than ears. Mystacial vibrissae exceeding the ears, varying from dark brown (MCN-M 2153; 2709) to whitish (UNB 3820). Dorsal pelage ranging from reddish brown (specimen MCN-M 2153) to yellowish brown (specimens UNB 3820; MCN-M 2709), both speckled with black. No clear distinction between dorsal and lateral pelage. Ventral pelage varies from reddish-brown to greyish-beige with inguinal and axillary white patches. Aristiforms on rump short (less than 26 mm) and narrow (less than 0,5 mm), paler at the base, gradually darkening toward the distal end. Aristiform tip either black or orange, whiplike tip (*filamentum apicalis*) present or absent. Tail dark brown above and slightly lighter below, but not conspicuously bicolor; shorter than or equal to head and body length in adult specimens; covered with light brown hairs throughout its length, ending in a bushy tuft. Tail scales visible, especially toward the proximal portion of tail. Dorsal surface of manus and pes covered with light-brown to silver-white hairs, giving a lighter aspect when compared to the rest of the body. Ungual tufts whitish, reaching claw tips, vestigial pollex bearing a nail. Plantar surface of hindfoot covered by small scales, bearing long hypothenar and thenar pads, and four interdigital pads.

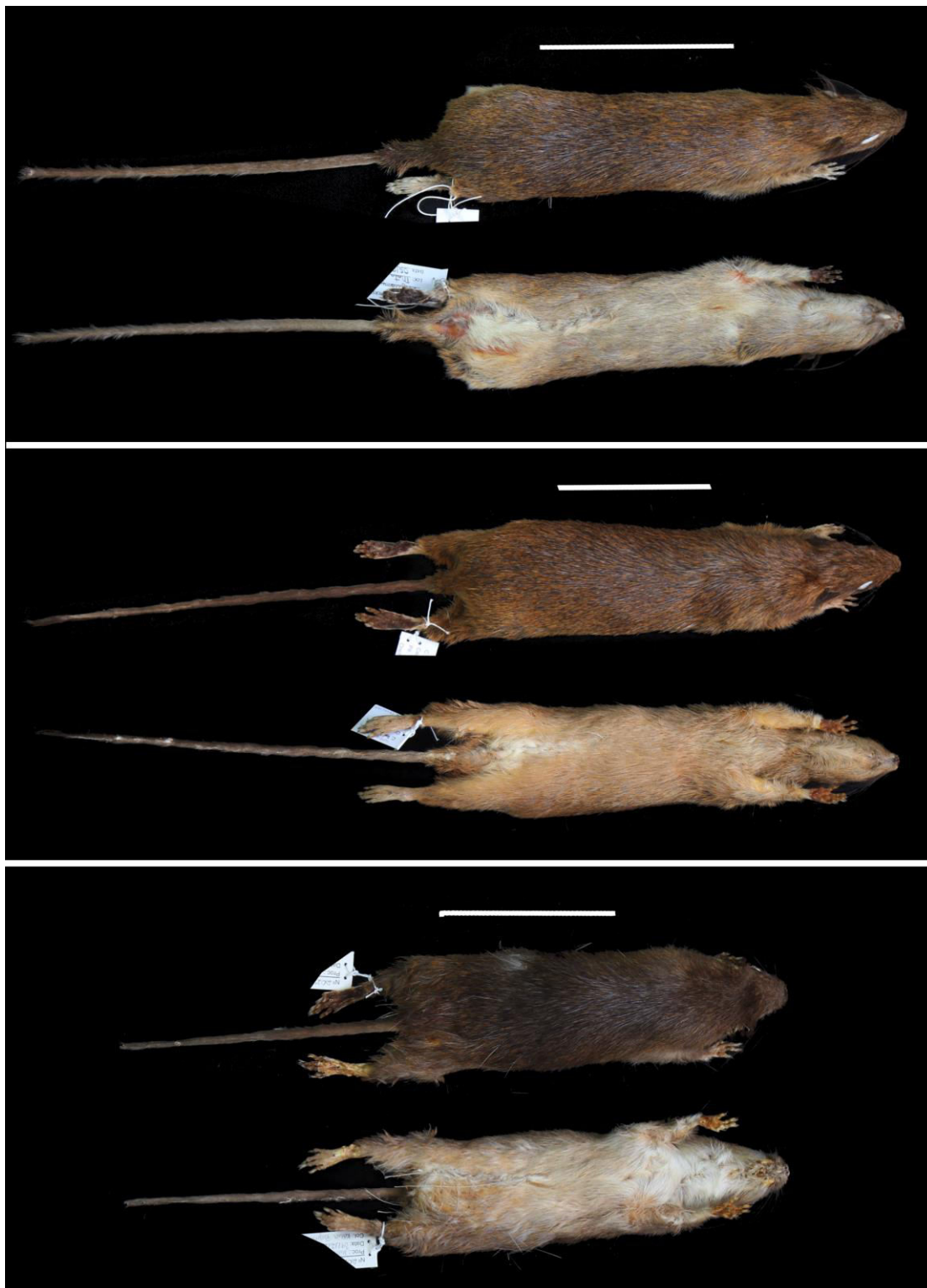


Figure 3.1: Dorsal and ventral views of skins of specimens of *Phyllomys centralis* sp. n. The holotype (UNB 3820 - above), and two paratypes (MCN-M 2709 - center; MCN-M 2027 - below). Scale bar = 11cm

Cranium (Fig. 4.1). Skull robust and long. Nasal bones widen gradually toward anterior end in dorsal view. Interorbital region diverging posteriorly, with a very small postorbital process. Supraorbital ridges well developed. Zygomatic arch robust, maximum height approximately equal to or less than one third of the jugal length. Postorbital process of zygomatic prominent and formed only by jugal. Incisive foramen ovate present. Palatine width wider than tooth width at M1. Mesopterygoid fossa variable in size and shape, forming an angle of 45–60°, and reaching anterior lamina of M3 or posterior lamina of M2. Lateral process of supraoccipital short, extending to the midline of the external auditory meatus. Ventral root of the angular process laterally deflected or not. Ventral mandibular spine present or absent. Skull measurements presented in Table 1.1.

Dental morphology (Fig. 5.1). Upper incisors orthodont; upper toothrows parallel to slightly divergent posteriorly. Upper cheek teeth rectangular, consisting of 4 simple parallel lophs separated by 3 labial flexi: para-, meta-, and posteroflexus. Lower premolar pentalophodont and lower molars trilophodont. Meso-, postero-, and hypoflexid angled; murid present on m3 and also visible on worn m2, separating hypo- and posteroflexid.

Post-cranial skeleton (Figs. 6.1; 7.1): Vertebrae count: 7 cervical, 14 thoracic, 7 lumbar, 3 sacral, and 36 caudal. Dorsal tubercle present on atlas, but smaller than ventral tubercle. Spinous process of axis well developed and projected posteriorly. Lamina ventralis present on sixth cervical vertebra. Neural process of second thoracic vertebra long and distally broad. Eleventh thoracic vertebra is the anticlinal. Anapophyses present on all but the seventh lumbar vertebra. Second sacral vertebra fused to third and first vertebrae, which is also fused to the ilium. Six proximal caudal vertebrae show well-developed neural and transverse processes, pre- and post-zygapophyses, and neural foramen. Sternum formed by a shovel-shaped manubrium, four wide sternbrae, and a rectangular xiphisternum. Scapula with infraspinous fossa wider than suprascapular, cranial border round and vertebral border pointed, spinous process long, acromion and metacromion well developed. Humerus slightly shorter than ulna, deltoid tuberosity well developed positioned on the proximal half. Size of olecranon process similar to trochlear notch. Iliac crest well developed and projected laterally, posterodorsal margin of ischium pointed, sciatic notch well developed.



Figure 4.1: Dorsal, ventral, and lateral views of skull and lateral view of mandible of holotype of *Phyllomys centralis* sp. n. - UNB 3820. (scale bar = 1cm).



Figure 5.1: Right mandibular (left) and maxillary tooththrows of *Phyllomys centralis* sp. n. (paratype MCN-M2709).

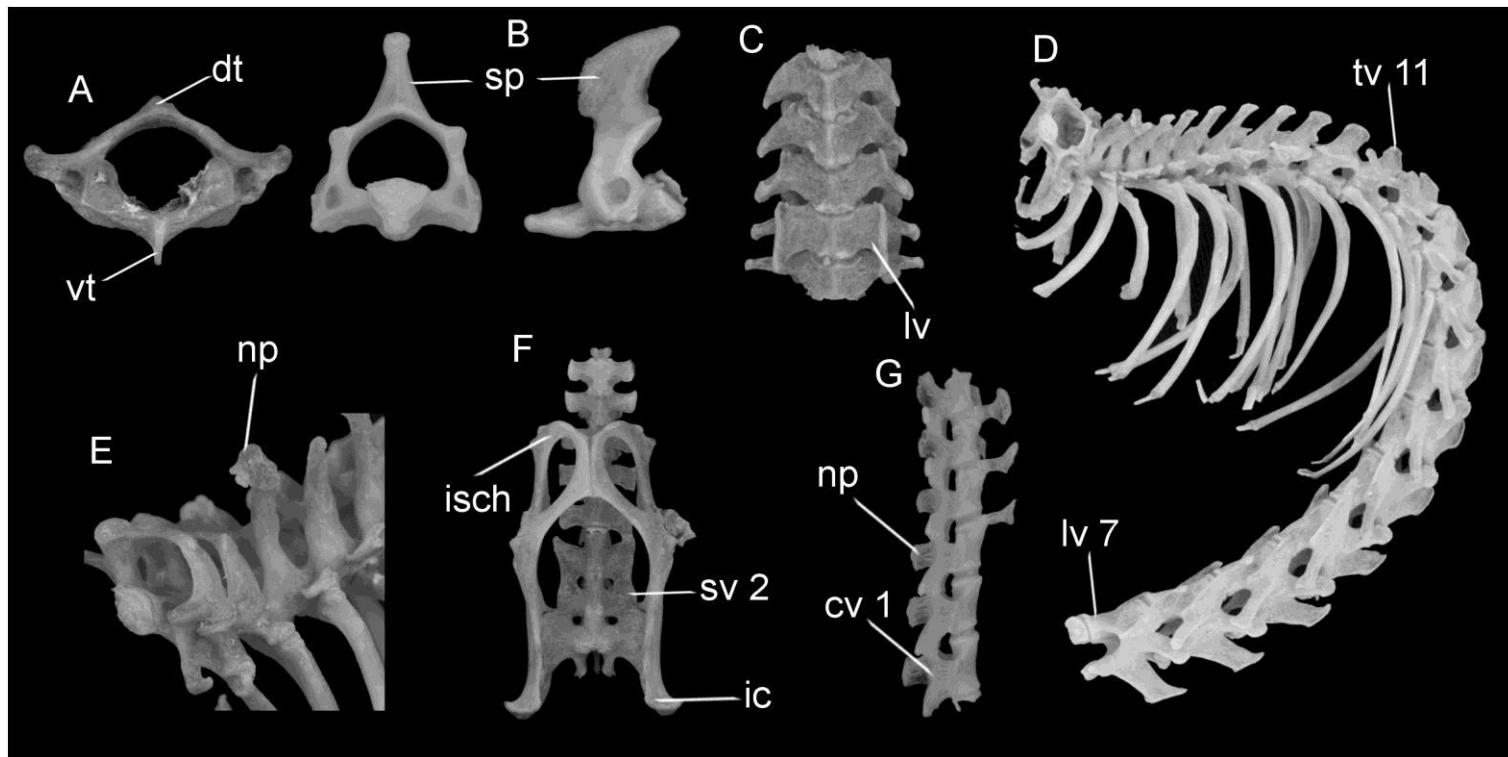


Figure 6.1: Post cranium axial skeleton of *Phyllomys centralis* sp. n. A – atlas: dorsal tubercle (dt) and ventral tubercle (vt); B – axis: spinous process (sp); C – cervical vertebrae: lamina ventralis (lv) of the sixth cervical vertebra; E – neural process (np) of second thoracic vertebra; D – the eleventh thoracic vertebra (tv11), and the seventh lumbar vertebra (lv7); F – second sacral vertebra (sv2), ischium (isch), and iliac crest (ic); G – first caudal vertebra (cv1), neural process (np).

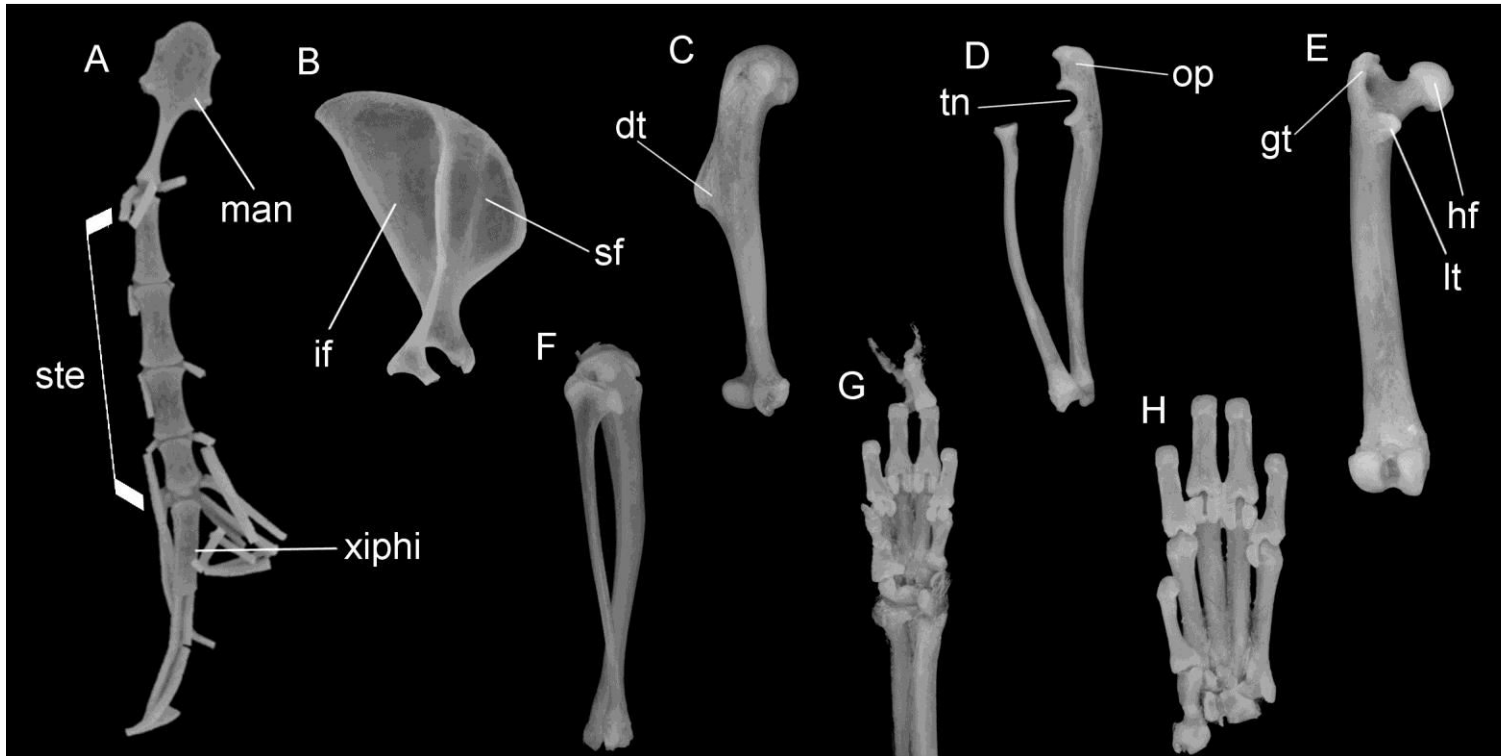


Figure 7.1: Sternum region and appendicular skeleton of *Phyllomys centralis* sp. n. A – sternum region: sternebrae (ste), manubrium (man), and xiphisternum (xiphi); B – scapula: infraspinous fossa (if), suprascapular fossa (sf); C – humerus: deltoid tuberosity (dt); D – radius and ulna: olecranon process (op), and trochlear notch (tn); E – femur: greater trochanter (gt), head of femur (hf), and lesser trochanter (lt); F – tibia and fibula; G – manus; H – pes.

Table 1.1: Cranial measurements of *Phyllomys centralis* sp. n. (UNB 3820, MCN-M2709, and MCN-M2153), *Phyllomys blainvillii*, and *Phyllomys brasiliensis*. Measurements taken from *Phyllomys blainvillii*, and *Phyllomys brasiliensis* are the same of Leite (2003).

	<i>P. centralis</i> sp. n. n = 3	<i>P. mantiqueirensis</i> (holotype)	<i>P. blainvillii</i> n = 65	<i>P. brasiliensis</i> n = 2
GSL	51.85 (50.16 - 53.93)	48.1	48.0 (44.4 - 52.7)	50.4 (48.5 - 52.3)
NL	15.45 (14.33 - 16.16)	14.2	13.7 (11.9 - 16.6)	14.2 (13.8 - 14.6)
RL	19.18 (18.4 - 20.4)	17.2	16.8 (15.0 - 18.9)	18.6 (17.5 - 19.8)
OL	14.23 (13.88 - 14.78)	14.0	13.7 (12.7 - 14.7)	13.8 (13.3 - 14.3)
RB	7.9 (7.6 - 8.16)	7.9	6.9 (6.2 - 7.8)	7.3 (7.0 - 7.6)
IOC	12.47 (11.44 - 13.19)	10.2	10.1 (8.8 - 11.9)	11.8 (11.1 - 12.5)
MB	20.03 (19.78 - 20.19)	18.9	18.8 (17.6 - 20.5)	19.8 (18.5 - 21.2)
ZB	25.21 (24.03 - 27.19)	23.1	23.0 (20.9 - 25.3)	24.0 (22.6 - 25.4)
CIL	47.03 (45.21 - 48.41)	43.0	43.1 (40.2 - 47.3)	44.8 (42.0 - 47.6)
BaL	40.45 (38.81 - 41.63)	36.3	37.0 (33.4 - 40.4)	39.1 (36.0 - 42.1)
D	12.16 (10.37 - 11.76)	10.0	9.6 (8.1 - 11.3)	10.7 (10.1 - 11.2)
MTRL	11.21 (10.81 - 11.69)	11.4	11.4 (10.4 - 12.7)	11.8
PLb	9.65 (9.22 - 10.0)	9.0	8.5 (7.0 - 9.6)	9.8 (9.5 - 10.2)
IFL	4.29 (3.86 - 4.8)	3.9	3.8 (3.0 - 4.6)	4.8 (4.7 - 4.8)
BuL	11.16 (10.5 - 11.96)	9.4	10.2 (9.1 - 11.8)	10.5 (10.1 - 10.9)
Pla	19.94 (18.53 - 21.32)	18.9	18.1 (15.6 - 20.4)	20.2 (21.4 - 22.8)
PPL	23.14 (22.41 - 23.72)	18.7	19.6 (17.4 - 21.5)	22.1 (21.4 - 22.8)
MPF	5.60 (4.96 - 6.24)	3.1	3.2 (2.7 - 3.6)	4.0 (3.5 - 4.5)
MaxB	8.73 (8.12 - 9.22)	8.3	7.5 (6.4 - 8.2)	8.3 (8.2 - 8.4)
OccW	8.97 (8.77 - 9.27)	8.6	8.3 (7.9 - 9.0)	8.5 (8.4 - 8.6)
RD	10.09 (9.42 - 10.58)	9.9	10.3 (9.1 - 11.1)	11.1 (10.1 - 12.1)
CDM1	14.93 (14.27 - 15.39)	13.9	13.7 (12.8 - 14.9)	14.4 (13.7 - 15.2)
CD	20.61 (19.63 - 22.23)	19.7	18.5 (16.5 - 19.9)	17.5 (15.0 - 20.0)

Greater trochanter higher than head of femur, lesser trochanter well developed and third trochanter absent. Tibia slightly longer than femur, sigmoid in anterior view. Proximal margin of fibula wide and falciform. Five digits on manus and pes, vestigial pollex.

Comparisons. *Phyllomys centralis* sp. n. is clearly different from *P. mantiqueirensis* by the larger cranial measurements (Table 1.1) and body size (Table 2.1). The former has the dorsal pelage with a spiny aspect and broad palatine width, and *P. mantiqueirensis* possesses a soft dorsal pelage (Table 2.1) and narrow palatine width (Table 2.1). These two species possess a disjunct known geographical distribution. The geographic range of *Phyllomys centralis* sp. n. overlaps with *P. brasiliensis* and is adjacent to *P. blainvillii*. These three species are morphologically similar and overlap in many cranial measurements (Table 1.1). The overall dorsal pelage is darker in *Phyllomys centralis* sp. n. than in *P. blainvillii*, and the thighs and rump of *Phyllomys centralis* sp. n. are darker than those of *P. brasiliensis*. Aristiforms on rump of *Phyllomys centralis* sp. n. narrower (<0.5 mm) than both *P. brasiliensis* and *P. blainvillii* (≥ 1 mm), of the same length of the latter (ca. 24 mm), and shorter than the former (ca. 27 mm). Transition from dorsal to ventral sides of the body more gradual in *Phyllomys centralis* sp. n. than in *P. brasiliensis* and *P. blainvillii*. The ventral pelage is lighter in *P. brasiliensis* and *P. blainvillii* than in *Phyllomys centralis* sp. n., which varies from reddish-brown to greyish-beige. The palate is about the same width of M1 in *P. brasiliensis*, but wider than M1 in both *Phyllomys centralis* sp. n. and in *P. blainvillii* (Table 2.1). The orange band of dorsal aristiforms is also shorter in *Phyllomys centralis* sp. n. than the other two species. Posterior margin of protoconid on m3 slightly pointed in *Phyllomys centralis* sp. n. and rounded in *P. brasiliensis*. Useful traits to delimit *P. centralis* sp. n., *P. mantiqueirensis*, *P. brasiliensis*, and *P. blainvillii* are presented in Table 2.1.

Distribution and habitat. The holotype *Phyllomys centralis* sp. n. was trapped in a live trap placed in the canopy of a protected gallery forest fragment within Fazenda Água Limpa, research station of Universidade de Brasília at conservation unit APA Gama Cabeça-de-Veados (Distrito Federal, central Brazil). This gallery forest fragment comprises a typical gallery forest vegetation with arboreal individuals of 20

to 25 m high, distributed alongside a narrow affluent of Paraná hydrographic region, and canopy covering 70 to 95% of the landscape. It is located nearby a small dam and is surrounded by savannas-like vegetation of Cerrado core area and urban occupation. The collecting localities of three paratypes are located at western limit of AF. Vegetation from these localities are characterized by deciduous and semi-deciduous forests, savannas, and gallery forests.

Table 2.1: Table showing selected characters used to delimit *P. centralis* sp. n. in relation to the sister species (*P. mantiqueirensis*), and species with closer geographic records: *P. blainvillii* and *P. brasiliensis*

	<i>P. centralis</i> sp. n.	<i>P. mantiqueirensis</i>	<i>P. blainvillii</i>	<i>P. brasiliensis</i>
Body size	medium	small	Small-medium	medium
Dorsal pelage	spiny	soft	spiny	spiny
Palatine width	>M1	<M1	>M1	<M1
Aristiforms width	<0.5 mm	<0.5 mm	≥1.0 mm	≥1.0 mm
Karyotype	2n=74 FN=140	-	2n=50 FN=94	-

Molecular dating and Biogeographic analyses

Molecular dating analysis (Fig. 8.1) indicates the initial diversification of *Phyllomys* to occur during the Miocene, when it shares the MRCA with *Echimyis*. The crown age of *Phyllomys* is the late Miocene, and most diversification events within the genus occurred during the Pliocene, when *Phyllomys centralis* sp. n. derived from a divergence event in middle Pliocene, a time when it split from the MRCA shared with *P. mantiqueirensis*. Additional species derived from divergences occurred during the Pliocene are the unnamed species *Phyllomys* sp. 2 and *Phyllomys* sp. 3. Most living species of *Phyllomys* resulted from divergences during Pleistocene, as the two major clades composed by species distributed at northeast and southern Brazil (see Loss & Leite 2011).

Ancestral geographic distribution analyses using different distribution areas (i.e. setting the geographic range of *Phyllomys centralis* sp. n. and *P. brasiliensis* to Cerrado and transition with AF, or Cerrado only) resulted in congruent results. This analysis (Fig. 9.1) indicate the south-central AF as the main area for the initial

diversification of *Phyllomys*. During Miocene an ancestral stock have changed its geographic distribution from (what is currently known as) AM to south-central AF. After an impressive event of diversification, other lineages shifted their distribution to other biomes or to sub-areas of the AF, including *Phyllomys centralis* sp. n. which is distributed in the Cerrado and transitional areas between Cerrado and AF.

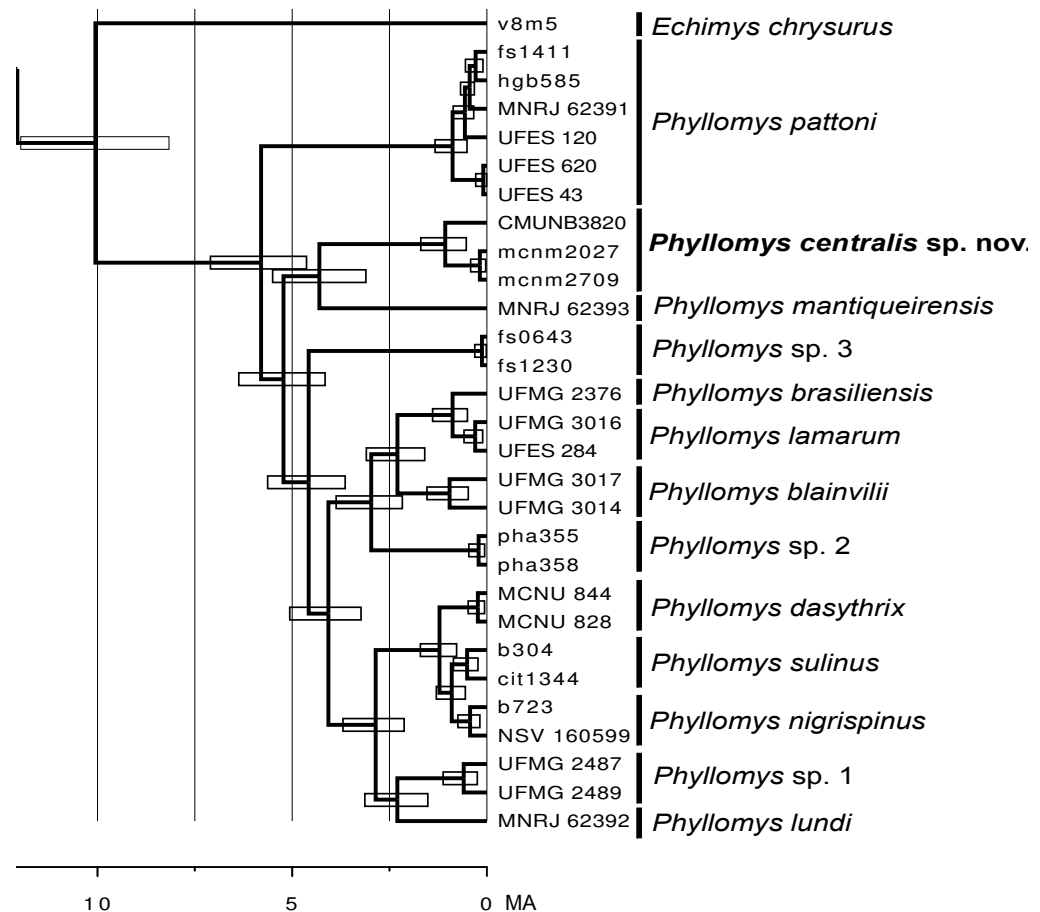


Figure 8.1: Molecular dating chronogram of *Phyllomys* inferred from concatenated genes (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, and *Cytb*). Horizontal bars represent 95% credibility intervals for time estimates.

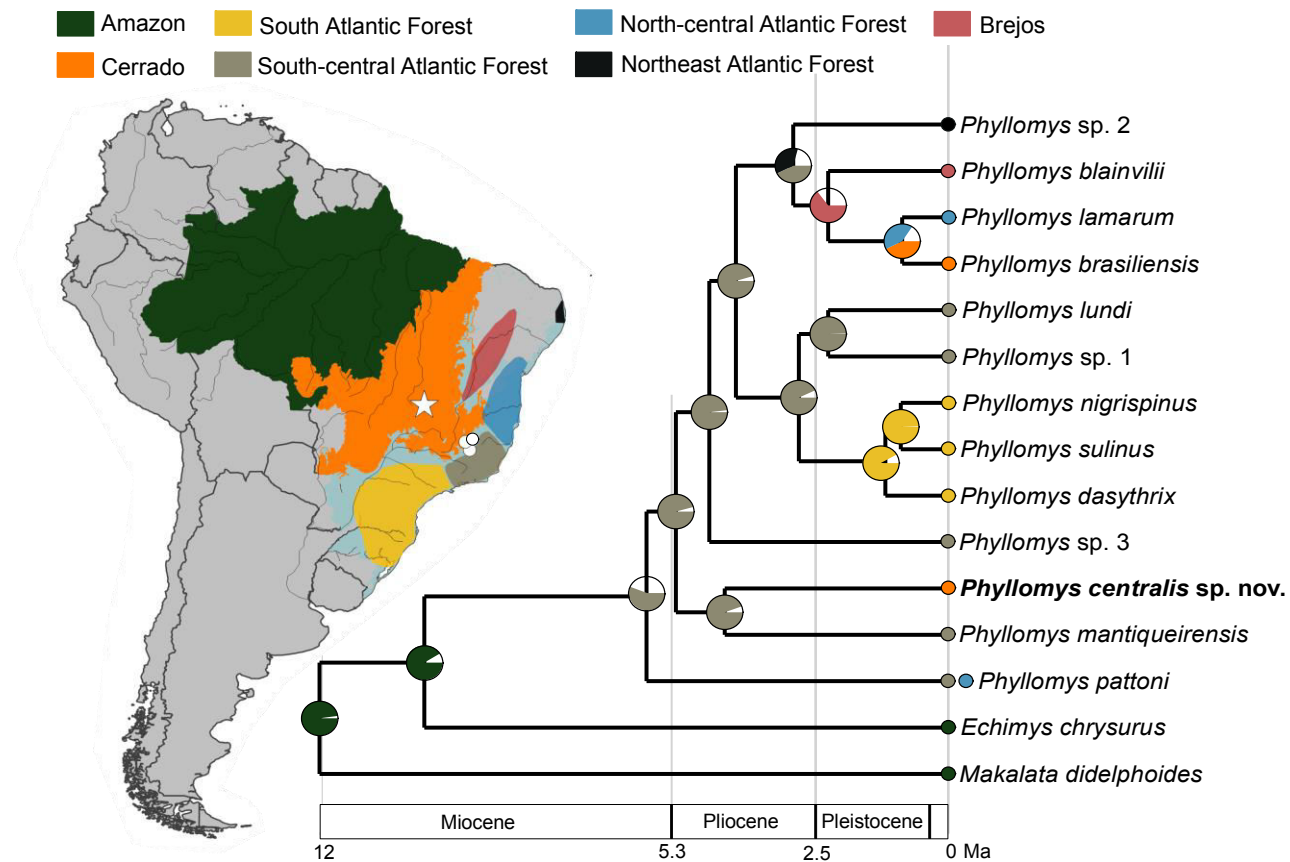


Figure 9.1: Map of South America showing the limits of the Cerrado, Amazon, and Atlantic Forest biomes. The Atlantic Forest is depicted in sub-regions (see Material and methods for detail). The red polygon refer to the geographic distribution of *Phyllomys blainvillii*, which is distributed in the relict of Atlantic Forest (Brejos). White star and circles represent collection localities of specimens of *Phyllomys centralis* sp. n. used in molecular analyses. White star represent the type locality (Brasília, Federal District – Brazil) of *Phyllomys centralis* sp. n. The chronogram is the result of molecular dating analysis inferred from concatenated genes (*vWF*, *GHR*, *RAG1*, and *Cytb*). Colored circles near terminal names refers to geographical distribution of each taxon accordingly to associated biomes. Pie chart shows approximate probabilities of ancestral area distribution (only areas with probabilities higher than 30% are shown). Geological time limits are based in Gibbard *et al.* (2010).

Discussion

Phyllomys centralis sp. n. here described was assessed over a robust molecular sampling, and is accompanied by karyotype and dense morphological information. We provide a description of the post-cranium skeleton and improve the comprehension of axial and appendicular *Phyllomys* structures. Information on post-cranium skeleton is poorly known in *Phyllomys*, and considering the significant overlapping of morphological characters between species within this genus (Leite 2003), the information generated here could be useful for future morphological comparisons within the genus. Defining morphological boundaries is historically a major constraint in the systematics and taxonomy of *Phyllomys* species, and only in recent years the limits among valid species became more clearly recognized (Emmons *et al.* 2002, Leite 2003). A major limitation in studying *Phyllomys* is the difficulty to capture arboreal herbivorous echimyids using traditional traps (Voss & Emmons 1996). Consequently, long time and huge efforts are needed to accumulate representative series leading to most species descriptions being based in few specimens (e.g. *P. kerri*) (Emmons *et al.* 2002; Leite 2003). Thus, the phylogenetic approach has been crucial to clarifying *Phyllomys* taxonomy.

In respect to phylogenetic hypothesis regarding *Phyllomys* spp., early studies based in mitochondrial data yielded low resolution in *Phyllomys* tree (Leite 2003) leading to a basal polytomy attributed to rapid events of diversification. Later, multi-gene phylogenies improved the resolution in *Phyllomys* tree (Loss & Leite 2011), evidencing the role of dense molecular data in the phylogenetic method applied to this genus. Low resolution levels are very common in *Phyllomys* phylogenies and, in fact, it is a pattern found in the entire family Echimyidae, implicating in a star-like phylogeny based in mitochondrial data (Lara *et al.* 1996; Leite & Patton 2002) and unresolved internal nodes based in multi-gene approaches (Galewski *et al.* 2005; Upham & Patterson 2015). We expand the matrix available to *Phyllomys* phylogeny by adding more DNA markers and specimens' samples. Even with the robust DNA dataset we produced in the present study - perhaps the largest molecular data used in a *Phyllomys* phylogeny - low support values can be found. In this view, a forward step to overcome this issue would be the use of combined morphological and molecular

information in a total-evidence approach, as well as the use of Phylogenomic methods.

The ancestral ranges reconstruction and the dated phylogeny of *Phyllomys* and its close relatives *Echimys* and *Makalata* indicate that an ancestral lineage of *Phyllomys* shifted its distribution from the AM to the south-central AF, in the middle Miocene. This condition implies in the existence of a past forested connection suitable for the occurrence and dispersal of echimyids climbing rats linking the AM and AF in the region where the southern part of the Cerrado biome is currently located. This hypothesis is in accordance with previous proposed southern/central connection between AF and AM (Por 1992; Costa 2003). Costa (2003) found a number of lineages of small mammals distributed in the AF as sisters to lineages distributed in AM, and sister lineages with disjunct distributions in the AF and forest environments of the Cerrado region. Many taxa analyzed in Costa (2003) display similar geographic distribution of the species analyzed here, and the ancient divergence times (e.g. 8 Ma) estimated for some of these lineages are closer to the coalescent time of the most recent common ancestor of *Phyllomys* and the sister *Echimys* (10 Ma) found here. Others sources of evidence based in phylogenetic information and bird communities also indicate old connections between lineages distributed in the southern AF and AM (Batalha-Filho *et al.* 2013). Our hypothesis coupled with these independent data sources suggest the existence of a paleo-forest during the Miocene covering the current south-central Cerrado area. This condition can be also hypothesized based in Angiosperm families data as well, which support similarities and old ages for the origins of both AF and AM (IBGE 2012), and pollen data sustaining an analogous environment to the current AM rainforest since the Eocene (Burnham & Johnson 2004) and throughout the Miocene (Jaramillo *et al.* 2010) in South America. Furthermore, phylogenetic evidence also based in woody plants indicates that organisms from forested environments of South America are older than their relatives from open formations (e. g. savannas) (Souza-Neto *et al.* 2016), which indicates rainforests paleo-habitats suitable for the diversification of climbing echimyids.

Another connection between the AF and AM is thought to have occurred in the northeastern Brazil (Andrade-Lima 1982; Auler *et al.* 2004; Bigarella *et al.* 1975; Wang *et al.* 2004) where currently the semi-arid Caatinga is the dominant ecosystem. Such contact apparently took place during the Quaternary when mesic conditions may

have favored the expansion of forest environments (Auler *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004). Additionally, the current humid forest enclaves within the Caatinga (called “brejos de altitude”) are considered as relicts of an extinct ever-green paleo-forest (Rizzini 1963; Bigarella *et al.* 1975; Andrade-Lima 1982) in that region. This route may have played a minor role in the historic range of *Phyllomys* species as a whole, but this dynamics of contraction and expansion of forests in this region may have caused speciation leading to *Phyllomys blainvillii*, which is clearly associated with “brejos de altitude” and seemingly resulted from a dichotomy occurred in the Quaternary.

Multiple contact events at different times may have occurred between AM and AF (Costa 2003; Batalha-Filho *et al.* 2013). In fact, the borderlines of these two forested environments can not be dissociated from the boundaries of the adjacent biomes, the dry and open Caatinga, Cerrado, and Chaco. Plant elements of AM and AF penetrate into the Cerrado domain (Oliveira-Filho & Ratter 2002; Marimon *et al.* 2006), indicating a dynamic history of contact acting on the distribution limits of these biomes. Such patches of forest in the Cerrado biome have been considered as the habitat type enclosing the highest diversity of birds and mammals within the Cerrado, and composed by lineages derived from the adjacent forested biomes (Mares *et al.* 1985; Silva 1995; Marinho-Filho *et al.* 2002). Our findings of a new forest dwelling species reinforce this idea. Moreover, the dated phylogeny and ancestral range reconstruction analyses indicate an *in situ* speciation in such forest patches derived from an ancient divergence and implying that forest expansion and contractions took place during the Tertiary. This is much older than what is predicted by the Refuge hypothesis (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1981), where the contraction and expansion of forest environments during last glacial and inter-glacial maximum were stated as major drivers for speciation in the Neotropics. Although refuges as a mechanism of isolation and posterior differentiation is a relatively well accepted hypothesis, recent studies have shown minor influences of the last glacial and inter-glacial periods to the diversification of small mammals (e.g. Leite *et al.* 2016), indicating more ancient geological and climatic events to cause such diversification (Moritz *et al.* 2000).

Little is known regarding the geographic distribution of *Phyllomys centralis* sp.n. The holotype was collected at Área de Proteção Ambiental (APA) Gama

Cabeça-de-Veado, located in the southern portion of Federal District, central Brazil. Although APA means Environmental Protection Area, this is a category of conservation units (defined by the Brazilian national system of conservation unities – SNUC; MMA 2011) that allows various types of use of natural resources and even urbanization. Two paratypes were collected in the neighbor cities Santa Bárbara and Catas Altas – in the heart of the iron mining area of Minas Gerais state (MG), once covered by a mosaic of cerrados and forested areas. The last specimen was gathered within the metropolitan area of Belo Horizonte – MG. Thus only the holotype was collected in a relatively protected conservation area that represents an island of native cerrados surrounded to the north and northwest by the urban and suburban areas of Brasília and to the south and southeast by large areas of monoculture farms and agriculture. Even this island of protected native cerrados is always under the threat of wildfire events, which may drastically affect their forested habitats (Mendonça *et al.* 2015). The expansion of the road system of Brasília is also a threat to the conservation of water resources and associated biota of that site (UNESCO 2003).

We compared data of *Phyllomys centralis* sp. n. to the IUCN recommendations regarding threat categories (IUCN, 2016). The extent of occurrence of *Phyllomys centralis* sp. n. was estimated to be 7,499 km². Under the B1 criteria of IUCN, a species must score the extent of occurrence up to 20,000 km² to be considered “Vulnerable” and the known geographic occurrence of this species is limited to four locations, which is considered “Endangered” by the IUCN (criteria B-a) in the case of some of these locations being threatened by an abrupt habitat loss (e.g. fire, hurricane, flood, volcanic eruption, landslide etc). There is no additional information regarding population data of *Phyllomys centralis* sp. n., so it is impossible to check for the remaining IUCN criteria (criteria A, C, D, and E). IUCN (2016) recommends not to consider a taxon under “Data Deficient” if all of the five criteria have not been considered. Instead, a taxon must be considered as “Not Evaluated” if no attempt to evaluate the current status of the taxon has been made. Under this circumstances we believe that the category “Near Threatened” is adequate because *Phyllomys centralis* sp. n. scores two items close to the “Vulnerable” category and three locations of occurrence of this species are threatened by abrupt habitat loss (i.e. landslides in mines sites, wildfires, and expansion planning of the road system located at the southern portion of the Federal District).

In summary, the new species of *Phyllomys* described here indicate a historic relationship of the forest habitats of Cerrado with AF and AM. Our results also indicate a past link between AF and AM, and reinforce the hypothesis that the southern and central region of the Cerrado may have been covered by a forest environment during late Miocene and early Pliocene permitting faunal interchanges between the two major forested biomes of South America. A tentative evaluation of this new species under IUCN categories of threat indicates that *Phyllomys centralis* sp. n. could be considered as “Near Threatened” but additional field surveys to assess populational status are necessary for a more adequate evaluation of the conservation status of this new species.

References

- Ab'Saber, A. N. (1977). Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia*, 52, 1–22.
- Adkins, R. M., Gelke, E. L., Rowe, D. & Honeycutt, R. L. (2001). Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 777–791.
- Andrade-Lima, D. (1982). Present-day forest refuges in northeastern Brazil. In G. T. Prance (Ed.), *Biological diversification in the Tropics* (pp. 245–251). New York: Columbia University Press.
- Antoine, P. -O., Marivaux, L., Croft, D. A., Billet, G., Ganerød, M., Jaramillo, C., Martin, T., Orliac, M. J., Tejada, J., Altamirano, A. J., Duranthon, F., Fanjat, G., Rousse, S. & Gismondi, R. S., (2012). Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 279, 1319–1326.
- Araújo, N. P., Loss, A. C., Cordeiro-Junior, D. A., Silva, K. R., Leite, Y. L. R. & Svartman, M. (2014). New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae). *Genome*, 57, 1–8.
- Argot, C. (2004). Functional-adaptive features and palaeobiologic implications of the postcranial skeleton of the late Miocene sabretooth borhyaenoid *Thylacosmilus atrox* (Metatheria). *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology*, 28, 229–266.
- Auler, A. S., Wang, X., Edwards, R. L., Cheng, H., Cristalli, P. S., Smart, P. L. & Richards, D. A. (2004). Quaternary ecological and geomorphic changes associated with rainfall events in presently semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Quaternary Science*, 19, 693–701.
- Batalha-filho, H., Fjeldsa, J., Fabre, P. & Miyaki, C. Y. (2013). Connections between the Atlantic and the Amazon forest avifaunas represent distinct historical events. *Journal of Ornithology*, 154, 41–50.
- Bigarella, J. J., Andrade-Lima, D. & Riehs, P. J. (1975). Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. In J. J. Bigarella & R. D. Becker (Eds.), *Simpósio*

- internacional sobre o Quaternário* (411–464). Curitiba - Porto Alegre: Anais da Academia Brasileira de Ciências.
- Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y., & Burke, T. (1992). Single-locus and DNA fingerprinting. In A. R. Hoelzel (Ed), *Molecular Genetic Analyses of Populations: a Practical Approach* (225–269). IRL Press, Oxford.
- Burnham, R. J. & Johnson, K. R. (2004). South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 359, 1595–1610.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T. & Moritz, C. (2009). Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323, 785–789.
- Carrizo, L. V. & Díaz, M. M. (2013). Descripción Morfológica del esqueleto axial de Filotinos (Rodentia : Sigmodontinae): aspectos morfofuncionales y filogenéticos. *Mastozoología Neotropical*, 20, 7–29.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil : a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, 30, 71–86.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Emmons, L. H., Leite, Y. L. R., Kock, D. & Costa, L. P. (2002). A Review of the Named Forms of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) with the Description of a New Species from Coastal Brazil. *American Museum Novitates*, 3380, 1–40.
- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro, J., Cecília, R., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A. C., Moritz, C. & Rodrigues, M. T. (2012). Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 826–838.
- Galewski, T., Mauvrey, J. F., Leite, Y. L. R., Patton, J. L. & Douzery, E. J. P. (2005). Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae: a phylogenetic and chronological approach. *Molecular*

- Phylogenetics and Evolution*, 34, 601–615.
- Gibbard, P. L., Head, M. J. & Walker, M. J. C. (2010). Formal ratification of the Quaternary system/period and the Pleistocene series/epoch with a base at 2.58 ma. *Journal of Quaternary Science*, 25, 96–102.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazon forest birds. *Science*, 165, 131–137.
- Huchon, D., Catzeflis, F. M. & Douzery, E. J. P. (1999). Molecular evolution of the nuclear von Willebrand Factor gene in Mammals and the Phylogeny of Rodents. *Molecular Biology*, 16, 577–589.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Iack-ximenes, G. E., Vivo, M. & Percequillo, A. R. (2005). A new genus for *Loncheres grandis* Wagner, 1845, with taxonomic comments on other arboreal echimyids (Rodentia, Echimyidae). *Arquivos Do Museu Nacional*, 63, 89–112.
- IBGE. (2012). *Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Série Manuais Técnicos em Geociências I*. IBGE, Rio de Janeiro, Brasil.
- IUCN Standards and Petitions Subcommittee (2016). *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria: Version 12*. Available from <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 544–548.
- Jaramillo, C., Hoorn, C., Silva, S. A. F., Leite, F., Herrera, F., Quiroz, L., Dino, R. & Antonoli, L. (2010). The origin of the modern Amazon rainforest: implications of the palynological and palaeobotanical record. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past, 1st edition* (pp. 317–334). Blackwell Publishing.
- Lara, M. C., Patton, J. L. & Silva, M. N. F. (1996). The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 403–413.
- Leite, Y. L. R. (2003). Evolution and Systematics of the Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae), with description of two new species, 132, 1–118.
- Leite, Y. L. R., Christoff, A. U. & Fagundes, V. (2008). A new species of Atlantic Forest tree rat, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from southern Brazil.

- Journal of Mammalogy*, 132, 1–118.
- Leite, Y. L. R., Costa, L. P., Loss, A. C., Rocha, R. G., Batalha-Filho, H., Bastos, A. C., Quaresma, V. S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M. & Pardini, R. (2016). Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 1008–1013.
- Leite, Y. L. R. & Patton, J. L. (2002). Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 455–64.
- Loss, A. C. & Leite, Y. L. R. (2011). Evolutionary diversification of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, 92, 1352–1366.
- Loss, A. C., Moura, R. T. & Leite, Y. L. R. (2014) Unexpected phylogenetic relationships of the painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia: Echimyidae). *Natureza on Line*, 12, 132–136.
- Mares, M. A., Willig, M. R. & Lacher, T. E. J. (1985). The Brazilian Caatinga in South American Zoogeography: tropical mammals in a dry region. *Journal of Biogeography*, 12, 57–69.
- Marimon, B. S., Lima, E de, Duarte, T. G., Chieregatto, L. C. & Ratter, J. A. (2006). Observations on the Vegetation of Northeastern Mato Grosso, Brazil. Iv. an Analysis of the Cerrado–Amazon Forest Ecotone. *Edinburgh Journal of Botany*, 63, 323–341.
- Marinho-filho, J., Rodrigues, F. H. G. & Juarez, K. M. (2002). The Cerrado Mammals: Diversity, Ecology, and Natural History. In P. S. Oliveira & R. J. Marquis (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna* (pp. 266–284). New York, NY: Columbia University Press.
- Mendonça, A. F., Armond, T., Camargo, A. C. L., Camargo, N. F., Ribeiro, J. F., Zangrandi, P. L. & Monteiro, E. V. (2015). Effects of an extensive fire on arboreal small mammal populations in a neotropical savanna woodland. *Journal of Mammalogy*, 92, 368–379.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente (2011) *SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza: Lei no 9.985, de 18 de julho de 2000; Decreto no 4.340, de 22 de agosto de 2002; Decreto no 5.746, de 5 de abril de 2006. Plano*

- Estratégico Nacional de Áreas Protegidas: Decreto no 5.758, de 13 de abril de 2006.* Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J. & Smith, T. B. (2000). Diversification of Rainforest Faunas: An intergrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 533–563.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Olivares, A. I. & Verzi, D. H. (2015). Systematics, phylogeny and evolutionary pattern of the hystricognath rodent *Eumysops* (Echimyidae) from the Plio–Pleistocene of southern South America. *Historical Biology: an International Journal of Paleobiology*, 27, 1042–1061.
- Oliveira-Filho, A. T. & Ratter, J. A. (1995). A study of the origin of central brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburg Journal of Botany*, 52, 142–194.
- Oliveira-Filho, A. T. & Ratter, J. T. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora o the Cerrado biome. In P. S. Oliveira & R. J. Marquis (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna* (pp. 91–120). New York, NY: Columbia University Press.
- Patterson, B. D. & Velazco, P. M. (2008). Phylogeny of the rodent genus *Isothrix* (hystricognathi, echimyidae) and its diversification in Amazonia and the Eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution*, 15, 181–201.
- Por, F. D. (1992) *Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil*. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.6, available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P. D. & Lovato, M. B. (2009). Phylogeographical structure of the Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and Its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, 100, 206–216.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F. & Bridgewater, S. (1997). The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*, 80, 223–230.

- Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. (2008). As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: S. M. Sano, Almeida S. P. & Ribeiro, J. F. (Eds) *Cerrado: Ecologia e flora* (151–212). Embrapa Cerrados. Brasília, DF
- Rizzini, C. T. (1963). Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia*, 1, 1–151.
- Silva, J. M. C. (1997). Endemic bird species and conservation in the Cerrado Region, South America. *Biodiversity and Conservation*, 6, 435–450.
- Silva, J. M. C. (1995). Birds of the Cerrado Region, South America. *Steenstrupia*, 21, 69–92.
- Silva, S. M., Moraes-Barros, N., Ribas, C. C., Ferrand, N. & Morgante, J. S. (2012). Divide to conquer: A complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 39–55.
- Smith, M. F. & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50, 149–177.
- Souza-Neto, A. C., Cianciaruso, M. V, & Collevatti, R. G. (2016). Habitat shifts shaping the diversity of a biodiversity hotspot through time: insights from the phylogenetic structure of Caesalpinioideae in the Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, 43, 340–350.
- Teeling, E. C., Scally, M., Kao, D. J., Romagnoli, M. L., Springer, M. S. & Stanhope, M. J. (2000). Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature*, 403, 188–192.
- UNESCO (2003) *Subsídios ao zoneamento da APA Gama-Cabeça de Veado e Reserva da Biosfera do Cerrado: caracterização e conflitos socioambientais*. Brasília.
- Upham, N. S., Ojala-Barbour, R., Brito M. J., Velazco, P. M. & Patterson, B. D. (2013). Transitions between Andean and Amazon centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 1–24.
- Upham, N. S. & Patterson, B. D. (2015). Evolution of caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. In A. I. Vassallo & A. Antenucci (Eds.), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution* (pp. 63–120). Buenos Aires, Argentina.

- Vanzolini, P. E. & Williams, E. E. (1981). Vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 34, 251–255.
- Verzi, D. H. (2008). Phylogeny and adaptive diversity of rodents of the family Ctenomyidae (Caviomorpha): delimiting lineages and genera in the fossil record. *Journal of Zoology*, 274, 386–394.
- Verzi, D. H., Olivares, A. I. & Morgan, C. C. (2013). Phylogeny, evolutionary patterns and timescale of South American octodontoid rodents. The importance of recognising morphological differentiation in the fossil record. *Acta Palaeontologica Polonica*, 59, 757–769.
- Verzi, D. H., Vucetich, M. G. & Montalvo, C. I. (1995). Un nuevo eumysopinae (Rodentia, Echimyidae) del mioceno tardío de la provincia de La pampa y consideraciones sobre la historia de la subfamilia. *Ameghiniana*, 32, 191–195.
- Voss, R. S. & Emmons, L. H. (1996). Mammalian Diversity in Neotropical Lowland Rainforests: a Preliminary Assessment. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 230, 1–115.
- Vucetich, G., Vieytes, E. C., Pérez, M. E. & Carlini, A. A. (2010). The rodents from La Cantera and the early evolution of caviomorphs in South America. In *The paleontology of Gran Baranca: Evolution and Environmental Change through the Middle Cenozoic of Patagonia*. R. H. Madden, A. A. Carlini, M. G. Vucetich & R. F. Kay (Eds) (193–205). Cambridge University Press, Cambridge.
- Wang, X., Auler, A. S., Edwards, R. L., Cheng, H., Cristalli, P. S., Smart, P. L., Richards, D. A. & Shen, C. C. (2004). Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature*, 432, 740–743.
- Whittaker, R. (1962). Classification of Natural Communities. *Botanical Review*, 28, 1–239.
- Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C. & He, X. (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87, 46–49.

Appendix 1.1: List of the species used in the present study and GenBank accession numbers of sequences. GenBank accession number of the sequences generated for this study are given in bold. Abbreviation for scientific collection: UNB = Mammal collection of Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; MCNM = Museu de Ciências Naturais, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Brazil; MCNU = Museu de Ciências Naturais, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil; MNRJ = Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; UFES = Coleção de Mamíferos, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil; UFMG = Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; USNM = National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA. Collector responsible for field number listed: H. G. Bergallo (HGB); J. C. Voltolini (NSV); L. Geise (FS); P. H. Asfora (PHA); R. Pardini (B); Y. Yonenaga-Yassuda and V. Fagundes (CIT).

Species of <i>Phyllomys</i> and species used as outgroups	Catalog number	GenBank accession numbers				
		Cyt-b	COI	RAG-1	GHR	vWF
<i>Dactylomys boliviensis</i>		L23339	-	JX515334	EU313298	AJ849307
<i>Mesomys hispidus</i>		L23385	-	JX515335	EU313322	AJ849305
<i>Isothrix bistrata</i>		L23349	-	JX515336	EU3133307	AJ849308
<i>Thrichomys apereoides</i>		EU544668	-	JX515325	EU313334	AJ849315
<i>Proechimys cuvieri</i>		AJ251400	-	KF590693	KF590665	KF590675
<i>Myocastor coypus</i>		EU544663	-	AF520662	AY011892	AJ251140
<i>Callistomys pictus</i>		KJ742659	-	KJ742627	KJ742677	KJ742614

<i>Trinomys iheringi</i>		EU544664	-	KF590695	EU313337	KF590677
<i>Euryzomatomys spinosus</i>		EU544667	-	JX515327	KJ742680	AJ849319
<i>Clyomys laticeps</i>		AF422918	-	JX515326	KJ742679	AJ849306
<i>Octodontomys gliroides</i>		AF370706	-	AF520649	KF590663	KF590672
<i>Ctenomys coyhaiquensis</i>		AF119112	-	KF590678	KF590659	KF590666
<i>Abracoma bennettii</i>		AF244387	-	FJ855213	JN633625	AJ251143
<i>Chinchilla lanigera</i>		AF46760	-	AF332036	KF590658	AJ238385
<i>Makalata didelphoides</i>	UFMG3012	EU313232	JF297658	KJ742639	KJ742688	JF297707
<i>Echimys chrysurus</i>	MZUSP-V8M5 USNM549594	KF874584 -	KF874588 -	KX852275	KX852248	- AJ251141
<i>Phyllomys centralis</i> sp. n.	UNB3820	KX852221	KX852223	KX852256	KX852229	KX852279
	MCNM2027	KF874586	KF874590	KX852269	KX852242	KX852280
	MCNM2153	KX852222	KX852224	-	-	-
	MCNM2709	KF874587	KF874591	KX852270	KX852243	KX852281

<i>Phyllomys blainvillii</i>	UFMG3014	EF608180	JF297686	KX852266	KX852239	JF297735
	UFMG3017	EU313239	JF297684			JF297733
<i>Phyllomys brasiliensis</i>	UFMG2376	EF608182	JF297680	KX852253	KX852226	JF297729
<i>Phyllomys dasythrix</i>	MCNU828	EF608185	JF297660	KX852252	KX852225	JF297709
	MCNU844	JF297832	JF297659	KJ742641	KJ742689	JF297708
<i>Phyllomys lamarum</i>	UFES284	JF297816	JF297682	KX852267	KX852240	JF297731
	UFMG3016	EF608181	JF297681	KX852264	KX852237	JF297730
<i>Phyllomys lundi</i>	MNRJ62392	EF608183	JF297672	KX852276	KX852249	JF297721
<i>Phyllomys mantiqueirensis</i>	MNRJ62393	EF608179	JF297671	KX852277	KX852250	JF297720
<i>Phyllomys nigrispinus</i>	B723	JF297809	JF297667	KX852255	KX852228	JF297716
	NSV160599	EU313243	JF297669	KX852271	KX852244	JF297718
<i>Phyllomys pattoni</i>	FS1411	JF297826	JF297700	KX852260	KX852233	JF297749
	HGB585	JF297825	JF297699	KX852261	KX852234	JF297748
	MNRJ62391	EF608187	JF297695	KJ742606	KJ742690	JF297744
	UFES43	JF297823	JF297697	KX852278	KX852251	JF297746
	UFES120	JF297830	JF297704	KX852274	KX852247	JF297753
	UFES620	JF297827	JF297701	KX852268	KX852241	JF297750
<i>Phyllomys sulinus</i>	B304	JF297806	JF297662	KX852254	KX852227	JF297711

	CIT1344	JF297833	JF297663	KX852257	KX852230	JF297712
<i>Phyllomys</i> sp. 1	UFMG2487	JF297813	JF297677	KX852262	KX852235	JF297726
	UFMG2489	JF297815	JF297679	KX852263	KX852236	JF297728
<i>Phyllomys</i> sp. 2	PHA355	JF297819	JF297689	KX852272	KX852245	JF297738
	PHA358	JF297822	JF297692	KX852273	KX852246	JF297741
<i>Phyllomys</i> sp. 3	FS643	JF297835	JF297673	KX852258	KX852231	JF297722
	FS1230	EF608184	JF297675	KX852259	KX852232	JF297724

Appendix 2.1: Thermocycling conditions for amplification of each molecular marker.

cytb: initial denaturation at 94 °C - 5 min; 39 cycles [denaturation at 94 °C - 30 s, annealing at 48 °C – 45 s and extension at 72 °C - 45 s] and final extension at 72 °C - 5 min.

COI: initial denaturation at 94 °C - 5 min; 40 cycles [denaturation at 94 °C - 30 s, annealing at 44 °C – 45 s and extension at 72 °C - 45 s] and final extension at 72 °C - 5 min

*vWF(1)** primers V10 and W13: initial denaturation at 95 °C - 5 min; 5 cycles [denaturation at 95 °C - 1 min, annealing at 61 °C - 1 min and extension at 72 °C – 1 min] four blocks of 5 cycles with the same denaturation and extension conditions of the previous cycle, but with annealing temperature 2 °C below (59, 57, 55 e 53 °C; one block with 10 cycles with denaturation and extension conditions of the previous cycle and annealing at 53 °C; final extension at 72 °C - 10 min.

*vWF(2)** primers V2 and W1: initial denaturation at 94 °C - 5 min; 39 cycles [denaturation at 94 °C - 1 min, annealing at 58 °C - 1 min and extension at 72 °C - 1 min]; final extension at 72 °C - 10 min.

GHR: initial denaturation at 94 °C - 5 min; 36 cycles [denaturation at 94 °C - 30 s, annealing at 55 °C - 1 min and extension at 72 °C - 30 s]; and final extension at 72 °C - 5 min.

RAG1: initial denaturation at 94 °C - 5 min; 30 cycles [denaturation at 94 °C - 30 s, annealing at 60 °C - 1 min and extension at 72 °C - 30 s]; and final extension at 72 °C - 5 min.

Note: **vWF* (1) and *vWF* (2) represent independent amplification processes with sequences joined after sequencing reaction.

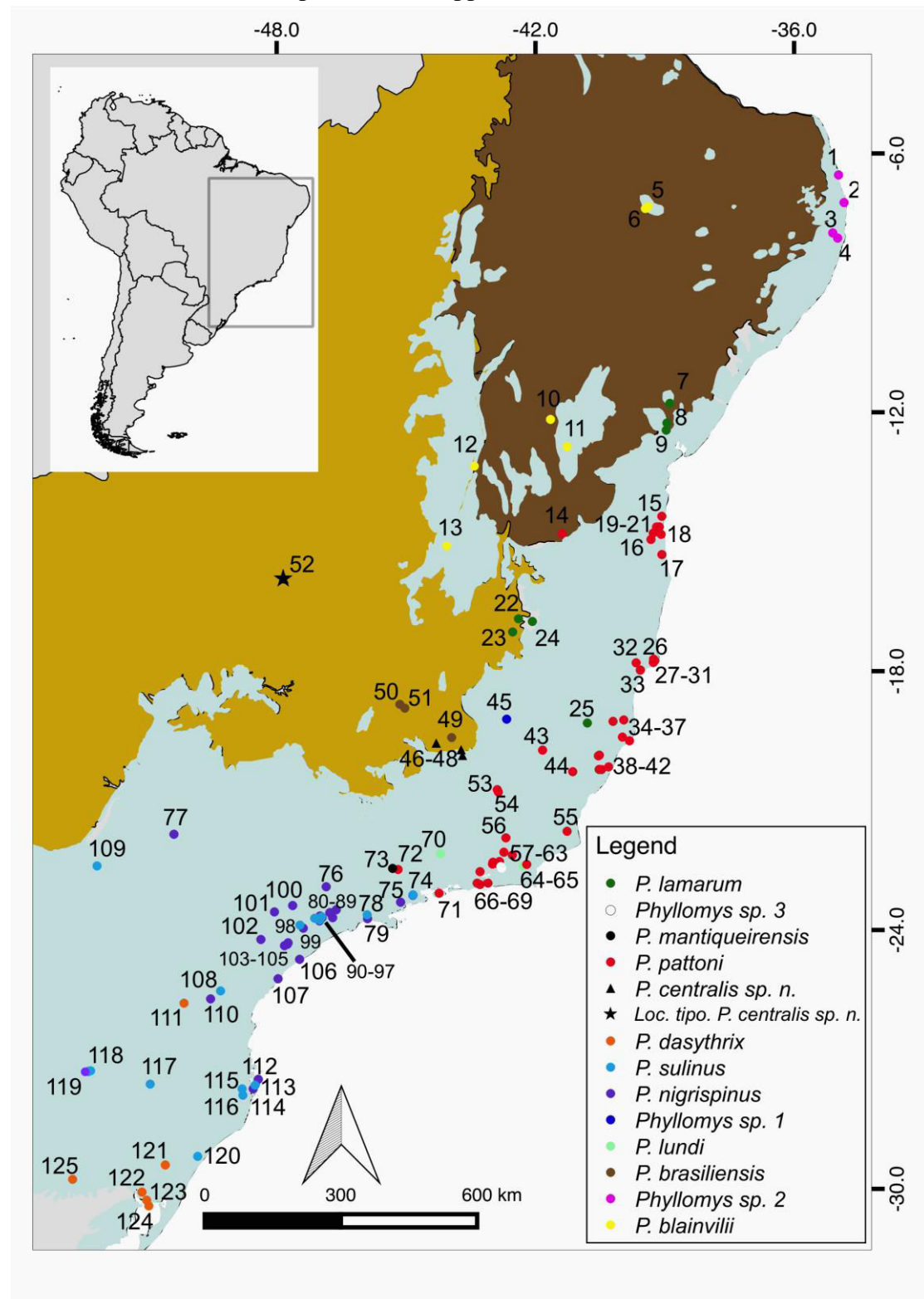
Appendix 3.1: Models of evolution estimated in jModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.* 2012), allowing three substitutions schemes and gamma parameter estimate using Bayesian Information Criterion.

Type of analysis	OTUs	Molecular marker				
		<i>cytb</i>	<i>COI</i>	<i>GHR</i>	<i>vWF</i>	<i>RAG1</i>
MrBayes phylogeny	30	GTR+G	GTR+G	K80+G	HKY+G	K80+G
BEAST dating	44	GTR+G		K80+G	GTR+G	K80+G

Reference:

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772.

Appendix 4.1: Map showing occurrence localities used to define the geographic distribution for each *Phyllomys* species. In brown the limits of Caatinga; in beige the limits of Cerrado; in light gray the limits of Atlantic Forest. Numbers indicate localities with information presented in Appendix 5.1.



Appendix 5.1: Table showing specimens catalog numbers, localities, and coordinates (decimal degrees) used to construct the map of distribution (Appendix 4.1). Map code denotes localities of the distribution map. Acronyms of the institutions housing the exemplars are given in Appendix 1.1. Specimens identified with one asterisk indicate DNA sequenced in present study; two asterisks indicate DNA obtained from dry skins (old DNA).

Sampe catalog number	Map code	Species	Locality	State	Long.	Lat.
UFPB 5690	1	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Floresta da Lyondel Chemical Company - Mataraca	PB	-34.9667	-6.5
UFPB 5922	2	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Campus I - Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa	PB	-34.8397	-7.1392
MNRJ 1350	5	<i>P. blainvillii</i>	Crato	CE	-39.3833	-7.2333
MVZ 197568*	6	<i>P. blainvillii</i>	Chapada do Araripe - 7 km SW Crato	CE	-39.4508	-7.2775
PHA 358*	3	<i>Phyllomys</i> sp. 2	CIMNC (Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti) - Paudalho	PE	-35.1019	-7.8439
DAM 175	4	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Granja Maturi - Condomínio Chã de Peroba - km 6 da estrada de Aldeia - Aldeia - Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
DAM 179	4	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Granja Maturi - Condomínio Chã de Peroba - km 6 da estrada de Aldeia - Aldeia - Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
PHA 355*	4	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Granja Maturi - Condomínio Chã de Peroba - km 6 da estrada de Aldeia - Aldeia - Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
PHA 356	4	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Granja Maturi - Condomínio Chã de Peroba - km 6 da estrada de Aldeia - Aldeia - Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
PHA 357	4	<i>Phyllomys</i> sp. 2	Granja Maturi - Condomínio Chã de Peroba - km 6 da estrada de Aldeia - Aldeia - Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
BMNH 3.9.5.96	7	<i>P. lamarum</i>	Lamarão - ca. 70 milhas NW Salvador	BA	-38.8817	-11.7936

UZMC 1282	7	<i>P. lamarum</i>	Lamarão - ca. 70 milhas NW Salvador	BA	-38.8817	-11.7936
MNRJ 21626	10	<i>P. blainvillii</i>	Várzea da Canabrava- Seabra	BA	-41.65	-12.1667
MNRJ 11260	8	<i>P. lamarum</i>	9 km SE Feira de Santana	BA	-38.95	-12.25
MNRJ 11259	9	<i>P. lamarum</i>	São Gonçalo - 30 km SW Feira de Santana	BA	-38.9667	-12.4167
UFMG 3017*	11	<i>P. blainvillii</i>	Fazenda Santa Rita - 8 km E Andaraí	BA	-41.2614	-12.8017
MNRJ 4125	12	<i>P. blainvillii</i>	Rio São Francisco - Bom Jesus da Lapa	BA	-43.4167	-13.25
RM 238	15	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual Serra do Conduru (Ilhéus-Uruçuca e Itacaré□)	BA	-39.0682	-14.4125
MNRJ 21517	19	<i>P. pattoni</i>	Aritagua□ - Urucutuca - Ilhã©us	BA	-39.1253	-14.6578
MNRJ 11253	20	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Almada - Ilhéus	BA	-39.1903	-14.66
MNRJ 33515	21	<i>P. pattoni</i>	Itabuna	BA	-39.2667	-14.8
MNRJ 22264	14	<i>P. pattoni</i>	São Felipe	BA	-41.3833	-14.8167
MNRJ 22265	14	<i>P. pattoni</i>	São Felipe	BA	-41.3833	-14.8167
MNRJ 10452	18	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Pirataquicê - Ilhéu	BA	-39.0833	-14.83
MNRJ 11254	16	<i>P. pattoni</i>	Mata Fortuna - Itabuna	BA	-39.32	-14.95
CIT 808	17	<i>P. pattoni</i>	Una -Ilhéus	BA	-39.0667	-15.3
MNRJ 62391*	26	<i>P. pattoni</i>	Mangue do Caritoti - Caravelas	BA	-39.2597	-17.725
MVZ 197621	26	<i>P. pattoni</i>	Mangue do Caritoti - Caravelas	BA	-39.2597	-17.725

SNM 5839	26	<i>P. pattoni</i>	Mangue do Caritoti - Caravelas	BA	-39.2597	-17.725
UFES 96	27	<i>P. pattoni</i>	Chácara do Lulu - Caravelas	BA	-39.2561	-17.7278
UFES 122	27	<i>P. pattoni</i>	Chácara do Lulu - Caravelas	BA	-39.2561	-17.7278
UFES 98	28	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Espada Ilha - Ilha da Cassumba- Caravelas	BA	-39.255	-17.7533
UFES 120*	29	<i>P. pattoni</i>	Ilha Salina - Caravelas	BA	-39.2281	-17.7581
UFES 121	30	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Monte Castelo - Ilha da Cassumba - Caravelas	BA	-39.2639	-17.7944
MZUSP 31953	31	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Monte Castelo - Ilha da Cassumba - 7 km SW Caravelas	BA	-39.2636	-17.8017
YL 199	31	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Monte Castelo - Ilha da Cassumba - 7 km SW Caravelas	BA	-39.2636	-17.8017
YL 200	31	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Monte Castelo - Ilha da Cassumba - 7 km SW Caravelas	BA	-39.2636	-17.8017
YL 201	31	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Monte Castelo - Ilha da Cassumba - 7 km SW Caravelas	BA	-39.2636	-17.8017
SLF 9	32	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Elma - Nova Viçosa	BA	-39.5647	-17.9756
UFES 97	32	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Elma - Nova Viçosa	BA	-39.5647	-17.9756
UFES 99	33	<i>P. pattoni</i>	Fazenda João Guarda - Nova Viçosa	BA	-39.5672	-17.9789
UNB 3820*	52	<i>P. centralis</i> sp. n.	Fazenda Água Limpa, Brasília	DF	-47.829	-15.8622
MNRJ 43810*	13	<i>P. blainvillii</i>	Mocambinho -Jaíba	MG	-44.05	-15.1
MCNM 2704	22	<i>P. lamarum</i>	UHE Irapé	MG	-42.6717	-16.7886
MCNM 2705	22	<i>P. lamarum</i>	UHE Irapé	MG	-42.6717	-16.7886
MCNM 2706	22	<i>P. lamarum</i>	UHE Irapé	MG	-42.6717	-16.7886

MCNM 2707	22	<i>P. lamarum</i>	UHE Irapé	MG	-42.6717	-16.7886
MCNM 2275**	24	<i>P. lamarum</i>	Araçuaí	MG	-42.07	-16.85
UFMG 3016*	23	<i>P. lamarum</i>	Estação Ecológica de Aracua - 17 km N Turmalina	MG	-42.7667	-17.1333
AP 48*	50	<i>P. brasiliensis</i>	Fazenda Santa Cruz - Felixlândia	MG	-45.1428	-18.7706
MCNM 1733	51	<i>P. brasiliensis</i>	UHE Retiro Baixo - Pompeu	MG	-45.0267	-18.8603
MCNM 1734*	51	<i>P. brasiliensis</i>	UHE Retiro Baixo - Pompeu	MG	-45.0267	-18.8603
UFMG 2486	45	<i>Phyllomys</i> sp. 1	Usina Hidrelétrica de Braúnas	MG	-42.6653	-19.1153
UFMG 2487*	45	<i>Phyllomys</i> sp. 1	Usina Hidrelétrica de Braúnas	MG	-42.6653	-19.1153
UFMG 2488	45	<i>Phyllomys</i> sp. 1	Usina Hidrelétrica de Braúnas	MG	-42.6653	-19.1153
UFMG 2489*	45	<i>Phyllomys</i> sp. 1	Usina Hidrelétrica de Braúnas	MG	-42.6653	-19.1153
UZMC 81	49	<i>P. brasiliensis</i>	Sumidouro - ca. 12 km NW Lagoa Santa	MG	-43.9411	-19.5411
MCNM 2153**	46	<i>P. centralis</i> sp. n.	Belo Horizonte	MG	-43.9128	-19.8222
GABF 97P	43	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Montes Claros - Caratinga	MG	-41.8333	-19.8333
MCNM 2027*	47	<i>P. centralis</i> sp. n.	Santa Bárbara	MG	-43.415	-19.9589
MCNM 2709*	48	<i>P. centralis</i> sp. n.	Catas Altas	MG	-43.3981	-20.0742
UFV 379	53	<i>P. pattoni</i>	Silvicultura - Viçosa	MG	-42.8833	-20.75
UFV 385	54	<i>P. pattoni</i>	Mata Paraíso - Viçosa	MG	-42.8589	-20.805
UFV 696	54	<i>P. pattoni</i>	Mata Paraíso - Viçosa	MG	-42.8589	-20.805

MNRJ 4077	56	<i>P. pattoni</i>	Fazenda São Geraldo - Além Paraíba	MG	-42.6833	-21.8667
MNRJ 62392*	70	<i>P. lundii</i>	Fazenda do Bené - 4 km SE Passa Vinte	MG	-44.2	-22.2333
MNRJ 62393*	73	<i>P. mantiqueirensis</i>	Fazenda da Onça - 13 km SW Delfim Moreira	MG	-45.3333	-22.6
UFMG 226	34	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Santa Terezinha- 33 km NE Linhares	ES	-39.95	-19.1333
MNRJ 8276	35	<i>P. pattoni</i>	Rio São João	ES	-40.2	-19.1667
UFES 284*	25	<i>P. lamarum</i>	Pancas	ES	-40.7953	-19.2044
UFES 246	36	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Sapucaia - Bananal do - Linhares	ES	-39.9816	-19.5313
MBML 1856	37	<i>P. pattoni</i>	Povoação - Linhares	ES	-39.8167	-19.6167
UFES 28	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 29	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 30	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 31	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 32	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 33	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 42	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 43*	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
UFES 908	38	<i>P. pattoni</i>	Parque Estadual da Fonte Grande - Vitória	ES	-40.35	-20.35
MBML 2011	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965

MBML 2032	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965
MBML 2047	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965
UFES 909	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965
UFES 910	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965
UFES 911	39	<i>P. pattoni</i>	Estação Biológica Santa Lúcia - Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.965
MBML 2203	40	<i>P. pattoni</i>	Manquezal de Vitória, próximo ao Bairro Maria Ortiz	ES	-40.3028	-20.221
UFES 439	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 440	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 620*	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 621	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 622	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 623	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
UFES 624	41	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
MBML 226	42	<i>P. pattoni</i>	Reserva Biológica de Duas Bocas- Alto Alegre- Cariacica	ES	-40.4667	-20.2833
UFPB 346	44	<i>P. pattoni</i>	Hotel Fazenda Monte Verde- 24 km SE Venda Nova do Imigrante	ES	-41.1333	-20.3333
MCNM 2156**	64	<i>P. pattoni</i>	Campos dos Goytacazes	RJ	-41.2642	-21.7144
MVZ 183139	57	<i>P. pattoni</i>	Fazenda São João da Serra- 6 km E e 9-2 km N Bonsucesso- Sumidouro	RJ	-42.73	-22.2
MNRJ 31564	58	<i>P. pattoni</i>	Nova Friburgo	RJ	-42.5333	-22.2667

MNRJ 31522	59	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Alpina - Tersópolis	RJ	-42.8333	-22.4167
MNRJ 1933	59	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Alpina - Tersópolis	RJ	-42.8333	-22.4167
MNRJ 6237	60	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Alpina - Tersópolis	RJ	-42.9833	-22.4333
MNRJ 6440	60	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Alpina - Tersópolis	RJ	-42.9833	-22.4333
MNRJ 2232	60	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Alpina - Tersópolis	RJ	-42.9833	-22.4333
DL 19	61	<i>P. pattoni</i>	Garrafão	RJ	-42.9933	-22.4744
DL 20	61	<i>P. pattoni</i>	Garrafão	RJ	-42.9933	-22.4744
DL 21	61	<i>P. pattoni</i>	Garrafão	RJ	-42.9933	-22.4744
FS 11-52	62	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Rosimery - Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.85	-22.4833
FS 14-11*	62	<i>P. pattoni</i>	Fazenda Rosimery - Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.85	-22.4833
RBPDA 2228	65	<i>P. lundi</i>	Reserva Biológica poço das Antas - Silva Jardim	RJ	-42.2833	-22.5167
FS 6-43*	63	<i>Phyllomys</i> sp. 3	FS6 - Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.8	-22.5333
HGB 585*	71	<i>P. pattoni</i>	Caxadaço- Ilha Grande - Angra dos Reis	RJ	-44.2333	-23.15
IG 34	71	<i>P. pattoni</i>	Caxadaço- Ilha Grande - Angra dos Reis	RJ	-44.2333	-23.15
MNRJ 31562	71	<i>P. pattoni</i>	Caxadaço- Ilha Grande - Angra dos Reis	RJ	-44.2333	-23.15
MZUSP 26718	71	<i>P. pattoni</i>	Caxadaço- Ilha Grande - Angra dos Reis	RJ	-44.2333	-23.15
BOCA 299	75	<i>P. nigrispinus</i>	Parque Nacional da Serra da Bocaina - RJ-165- Paraty- Área 1	RJ	-44.8372	-23.1897
BOCA 364	75	<i>P. nigrispinus</i>	Parque Nacional da Serra da Bocaina - RJ-165- Paraty- Área 1	RJ	-44.8372	-23.1897

BOCA 291	75	<i>P. nigrispinus</i>	Parque Nacional da Serra da Bocaina - RJ- 165- Paraty- Área 1	RJ	-44.8372	-23.1897
MZUSP 3738	77	<i>P. nigrispinus</i>	Vanuie	SP	-50.3833	-21.7833
MZUSP 8885	109	<i>P. sulinus</i>	Teodoro Sampaio	SP	-52.1667	-22.5167
MZUSP 138	72	<i>P. pattoni</i>	Piquete	SP	-45.1833	-22.6
MZUSP 664	76	<i>P. nigrispinus</i>	Itatiba	SP	-46.85	-23
NSV 160599	74	<i>P. sulinus</i>	Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia - 10 km NW Ubatuba	SP	-45.125	-23.3583
NMW B 918	100	<i>P. nigrispinus</i>	Floresta Nacional de Ipanema - 20 km NW Sorocaba	SP	-47.6281	-23.4353
MZUSP 1954	80	<i>P. nigrispinus</i>	São Paulo	SP	-46.6167	-23.5333
MZUSP 175	101	<i>P. nigrispinus</i>	Itapetininga	SP	-48.05	-23.5833
MZUSP sp. 26652	81	<i>P. nigrispinus</i>	Taboão da Serra	SP	-46.7667	-23.6
USNM 460569	78	<i>P. sulinus</i>	Estação Biológica de Boracéia, Salesópolis	SP	-45.9	-23.65
B 48	82	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Ruth - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-46.995	-23.6788
SS 87**	83	<i>P. nigrispinus</i>	Localidade B - Reserva Florestal do Morro Grande- Cotia	SP	-46.9567	-23.6958
B 554	84	<i>P. sulinus</i>	Sítion Psicótica - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-46.9548	-23.696
B 539	85	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Caucaia - Reserva Florestal do Morro Grande- Cotia	SP	-46.9949	-23.6966
SS 51**	86	<i>P. nigrispinus</i>	Localidade C - Reserva Florestal do Morro Grande- Cotia	SP	-46.9456	-23.715
MZUSP 10311	87	<i>P. nigrispinus</i>	Interlagos	SP	-46.7	-23.7167
BS 1066**	88	<i>P. sulinus</i>	Lacerda - Ibiúna	SP	-47.1178	-23.7303

BS 307**	89	<i>P. sulinus</i>	Pedroso - Ibiúna	SP	-47.0744	-23.7358
UFMG 948	79	<i>P. nigrispinus</i>	Rio Guaratuba- Bertioaga	SP	-45.8911	-23.7408
B 50	90	<i>P. nigrispinus</i>	Sãtio CacÏador - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0014	-23.7438
B 374	90	<i>P. nigrispinus</i>	Sítion Dilúvio - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-46.9971	-23.7448
B 304*	92	<i>P. sulinus</i>	Sãtio PseudoÏpode - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0027	-23.7471
B 641	92	<i>P. sulinus</i>	Sítio Pseudópode - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0027	-23.7471
BS 921	93	<i>P. nigrispinus</i>	Quilombo - Cotia	SP	-47.0047	-23.7558
BS 814**	93	<i>P. sulinus</i>	Quilombo - Cotia	SP	-47.0047	-23.7558
B 435	94	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Catedral - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-46.9988	-23.763
B 697	94	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Catedral - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-46.9988	-23.763
B 407	95	<i>P. sulinus</i>	Sítio Maritaca - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0048	-23.7699
B 723*	96	<i>P. nigrispinus</i>	Sãtio Palmito - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0011	-23.7711
B 733	97	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Peixe - Reserva Florestal do Morro Grande - Cotia	SP	-47.0063	-23.7907
AB 490	98	<i>P. sulinus</i>	Sítio Baleia - Piedade	SP	-47.4598	-23.889
AB 527	99	<i>P. nigrispinus</i>	Sítion Jupará - Piedade	SP	-47.3826	-23.9604
RG 1969	102	<i>P. nigrispinus</i>	Sítio Moacir - Ribeirão Grande	SP	-48.3666	-24.2235
FMNH 94358	103	<i>P. nigrispinus</i>	Primeiro Morro	SP	-47.7333	-24.3

FMNH 94359	104	<i>P. nigrispinus</i>	Ribeirão Fundo	SP	-47.75	-24.3333
FMNH 93045	105	<i>P. nigrispinus</i>	Barra do Rio Juquiá	SP	-47.8167	-24.3667
MZUSP 25862	106	<i>P. nigrispinus</i>	Barra de Icapara	SP	-47.4667	-24.6833
MUSP 27755	107	<i>P. nigrispinus</i>	Ilha do Cardoso - Cananéia	SP	-47.9667	-25.1333
MHNCI 2599	108	<i>P. sulinus</i>	Parque Barigui - Bairro Mercês- Curitiba	PR	-49.3008	-25.4156
MZUSP 6431	110	<i>P. nigrispinus</i>	Guajuvira	PR	-49.5333	-25.6
BMNH 0.6.29.20	111	<i>P. dasythrix</i>	Palmira	PR	-50.15	-25.7
FURB 6257	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
FURB 5193	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
FURB 5239	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
FURB 5521	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
FURB 6064	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
FURB 6503	119	<i>P. nigrispinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Itá	SC	-52.3691	-27.2815
UFSC 4849	112	<i>P. nigrispinus</i>	Morro do Caçador - Vargem do Bom Jesus - Ilha de Santa Catarina	SC	-48.4264	-27.4633
FURB 18732	117	<i>P. sulinus</i>	Foz do Rio Caveiras- Abdom Batista	SC	-50.9344	-27.5761
BMNH 50.7.8.24	113	<i>P. sulinus</i>	Ilha de Santa Catarina	SC	-48.5	-27.6
UFSC 4915	114	<i>P. nigrispinus</i>	Fazenda Ressacada - UFSC - Ilha de Santa Catarina	SC	-48.5441	-27.6851
UFSC 4214	115	<i>P. sulinus</i>	Caldas da Imperatriz	SC	-48.8014	-27.6856

UFPB JCV28	116	<i>P. sulinus</i>	Serra do Tabuleiro	SC	-48.7833	-27.8333
CIT 1346	118	<i>P. sulinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Aratiba	RS	-52.3167	-27.2667
MCNU 826	118	<i>P. sulinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Aratiba	RS	-52.3167	-27.2667
MCNU 833*	118	<i>P. sulinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Aratiba	RS	-52.3167	-27.2667
MCNU 837	118	<i>P. sulinus</i>	Usina Hidrelétrica de Itá - Aratiba	RS	-52.3167	-27.2667
AC 632	120	<i>P. sulinus</i>	Parque Nacional Aparados da Serra - Cambará do Sul	RS	-49.8333	-29.25
MNRJ 21503	121	<i>P. dasythrix</i>	São Francisco de Paula	RS	-50.5833	-29.45
MNRJ 6238	125	<i>P. dasythrix</i>	Pinheiros - Candelária	RS	-52.7333	-29.7833
BMNH 1.12.3.1	122	<i>P. dasythrix</i>	Porto Alegre	RS	-51.125	-30.0792
MCNU 844*	123	<i>P. dasythrix</i>	Bairro Agronomia - Porto Alegre	RS	-51.1247	-30.0792
MCNU 828*	124	<i>P. dasythrix</i>	Itapuã - Viamão	RS	-50.9667	-30.4

Capítulo 2

Filogeografia e delimitação de espécies em *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) nos biomas Cerrado e Caatinga

Introdução

Os biomas da Caatinga, Cerrado e Chaco formam uma diagonal de formações abertas na América do Sul, caracterizadas por climas mais secos, alta sazonalidade das chuvas, e que isola os dois principais biomas florestais deste continente, Amazônia e Floresta Atlântica (Ab'Saber 1977). Um componente importante desta diagonal são as florestas decíduas e semi-decíduas - “Seasonally Dry Tropical Forests” (matas secas) (Pennington *et al.* 2006) – distribuídas em um grande maciço na Caatinga no nordeste do Brasil, presente em enclaves no Cerrado do Brasil central, outro maciço de menor tamanho no nordeste da Argentina e sul/centro-oeste do Brasil, se estendendo de forma disjunta através da Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela e atingindo partes do México e sul dos Estados Unidos (Pennington *et al.* 2006). A hipótese do Arco Pleistocênico assume que as matas secas atingiram distribuição mais ampla durante o último máximo glacial e que sua atual condição disjunta é produto de uma fragmentação em função do aquecimento do clima após esse período (Prado & Gibbs 1993). Por outro lado, modelos climáticos contradizem essa condição e indicam que as matas secas ampliaram sua distribuição após o último máximo glacial, durante o Holoceno (Werneck *et al.* 2011). As matas secas, no entanto, são pouco exploradas em estudos que buscam entender a evolução de sua diversidade biológica, a dinâmica de sua distribuição geográfica e seu papel em eventos de especiação e fragmentação ao longo do tempo, bem como a relação com a diversidade genética da sua biota associada (Werneck 2011).

Ideias iniciais propunham que a fauna de vertebrados relacionada às fitofisionomias de biomas associados a diagonal aberta como Cerrado e Caatinga seriam pobres em termos de riqueza de espécies e endemismos (e.g. Mares *et al.* 1985; Vanzolini 1974). Entretanto, revisões recentes indicam que 18,5% das espécies de mamíferos desta região são endêmicas (Carmignotto *et al.* 2012), enquanto que novos inventários e estudos taxonômico descrevem novos táxons (e.g. Bonvicino *et al.* 2003; Bonvicino & Weksler 1998; Tribe 2005; Weksler *et al.* 2006) e ampliam o entendimento de que o Cerrado, Caatinga e suas fitofisionomias associadas acumulam relevante diversidade biológica. Estudos sistemáticos e revisões taxonômicas são essenciais no sentido de descrever a diversidade dos componentes biológicos da diagonal de formações abertas. Por exemplo, Voss *et al.* (2005) identificou um novo gênero, *Cryptonanus* com representantes no Cerrado, previamente abrigado sob o nome *Gracilinanus*. Semedo *et al.* (2015), por sua vez, constataram que *Gracilinanus*

peruanus seria outra forma previamente abrigada em *agilis* distribuída no extremo oeste do bioma Cerrado, e que *agilis* é o nome indicado para identificar indivíduos de outras regiões do Cerrado e Caatinga.

Gracilinanus agilis é uma espécie arborícola/escansorial que ocorre amplamente no Cerrado e Caatinga ocupando com alta frequência as regiões de matas secas presentes nestes biomas (Jansa *et al.* 2014). A validade desta espécie foi atestada por meio de filogenias moleculares e estudos anatômicos e diagnosticada como entidade taxonômica à parte de outras formas relacionadas (Costa *et al.* 2003; Lóss *et al.* 2011; Semedo *et al.* 2015). Diversos estudos filogenéticos e filogeográficos encontraram populações de *G. agilis* representadas em três clados principais (Costa *et al.* 2003; Faria *et al.* 2013; Lóss *et al.* 2011; Rocha *et al.* 2015): um composto por indivíduos provenientes da Caatinga e norte do Cerrado tendo como clado irmão um grupo composto de indivíduos provenientes do centro/sudoeste do Cerrado; e um terceiro clado que abriga indivíduos coletados na região leste do rio São Francisco derivado de uma divergência inicial na árvore de *G. agilis* e que forma o agrupamento de maior distância genética quando uma comparação par-a-par é realizada entre os clados recuperados nas filogenias (Rocha *et al.* 2015).

A Serra Geral de Goiás (localizada na região central do Cerrado) e o rio São Francisco estão entre os principais fatores utilizados para explicar as “quebras” filogeográficas associadas às populações de *G. agilis* (Faria *et al.* 2013) enquanto que o rio Araguaia é considerado como barreira ao fluxo gênico entre populações localizadas em margens opostas deste curso d’água (Rocha *et al.* 2015). Contudo, nenhuma associação entre a estruturação genética de populações de *G. agilis* e os principais fragmentos de matas secas foi realizada. Em virtude desta espécie de marsupial ser fortemente associada às matas secas, é possível que a estruturação genética de suas populações estejam relacionadas com a dinâmica temporal de fragmentação e expansão desta formação vegetal durante o Quaternário. Sendo assim, populações de *G. agilis* distribuídos na região da Caatinga devem apresentar sinais genéticos demográficos (expansão ou declínio populacional) estáveis visto que esta região é considerada uma área estável de matas secas (Prado & Gibbs 1993; Werneck *et al.* 2011). Por outro lado, populações de *G. agilis* localizadas na região central/sudoeste do Cerrado devem apresentar desvios do modelo de população constante, indicando declínio ou expansão populacional em virtude das áreas de matas secas desta região apresentarem sinais de expansão e contração de sua distribuição ao longo do tempo (Werneck *et al.* 2011).

O uso de dados genéticos tem permitido a identificação de espécies crípticas e “sibling species” (espécies crípticas irmãs – *sensu* Bickford *et al.* 2006 adaptado de Mayr 1963) tanto em organismos de distribuição restrita como táxons de distribuição ampla (e.g. Bock *et al.* 2012). Particularmente na diagonal de formações abertas, métodos de delimitação de espécies tem sido utilizados para identificar linhagens crípticas e verificar a validade de nomes atribuídos a sub-espécies (Oliveira *et al.* 2015; Werneck *et al.* 2015). Tais métodos de delimitação de espécies são associados ao conceito biológico de espécie (Mayr 1963) e combinam as árvores de gene e de espécie via processos coalescentes para inferir o tempo em que o fluxo gênico foi interrompido (ou reduzido) entre as linhagens comparadas (Yang & Rannala 2010). No contexto de estruturação filogenética e geográfica de *G. agilis*, testes de delimitação de espécies podem ser úteis para inferir se a população do leste do rio São Francisco representa uma espécie distinta e se existe fluxo gênico considerável entre os clados norte e sul capaz de permitir considera-los pertencentes a mesma espécie.

O objetivo deste estudo foi testar se as populações de *G. agilis* são filogeneticamente estruturadas e se tal estruturação tem correspondência com os maciços de matas secas na Caatinga e no Cerrado. Além disso, foi aplicado um método de delimitação de espécies para verificar se existem linhagens crípticas nas diferentes populações de *G. agilis*. Métodos filogeográficos, inferências demográficas e datação molecular são aplicados numa perspectiva coalescente com base num conjunto de dados “multilocus” (i.e. sequências de DNA provenientes de regiões distintas do genoma).

Materiais e Métodos

Amostras, procedimentos de laboratório e tratamento das sequências

Foram utilizados 94 amostras de tecido de espécimes de *G. agilis* provenientes de localidades do Cerrado e da Caatinga (Anexo 1.2). Estas amostras foram obtidas a partir de expedições realizadas durante os anos de 2014 e 2015 e de doações de colegas pesquisadores e coleções científicas de outras instituições do Brasil. Uma lista com o número de tombamento e/ou número de coleta de campo, localidade de coleta e coordenadas geográficas é fornecida no anexo 2.2. Além deste conjunto de dados, foram obtidas 90 sequências do gene *citocromo b* (*cyt-b*) de espécimes de *G. agilis* depositadas no GenBank (plataforma online e repositório de dados moleculares). Uma lista com número de cada sequência obtida no GenBank, localidade de coleta,

coordenadas geográficas e respectiva referência bibliográfica é fornecida no anexo 3.2. Os táxons *Gracilinanus microtarsus*, *G. peruanus*, *Marmosa murina* e *Cryptonanus* sp. foram utilizados como grupos externos para as reconstruções filogenéticas. Esta amostragem contempla espécies do mesmo clado e de outros mais distantes em relação a *G. agilis* (Jansa *et al.* 2013)

O DNA das amostras foi extraído utilizando o método de fenól-clorofórmio e a qualidade das extrações foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foram amplificados 709 pares de bases (pb) do gene mitocondrial *cyt-b* (Smith & Patton, 1993) e três introns nucleares (Giarla 2013; Giarla & Jansa 2014): *peptidylprolyl isomerase C* (PPIC), 643 pb; *prolyl 4-hydroxylase beta*, (P4HB), 633pb; *O-Linked N acetylglucosamine transferase* (OGT, ligado ao cromossomo X), 654 pb. As sequências dos *primers* utilizados e respectivas referências são apresentadas no anexo 4.2. A escolha desses marcadores genéticos foi realizada com o objetivo de se abranger períodos curtos (*cyt-b* e OGT) e longos (nucleares autossômicos PPIC e P4HB) de eventos coalescentes, e desta maneira assegurar resolução para divergências recentes e antigas das linhagens estudadas.

As reações de amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) dos marcadores selecionados foram realizadas em um volume final de 20 µl utilizando-se 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA, e ciclos de temperatura compostos por um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 45 seg, 48-56 °C (conforme a temperatura de anelamento de cada *primer*) por 45 seg e 72 °C por 45 seg, finalizando com uma etapa de extensão à 72 °C por 10 min. Pequenas adequações foram realizadas neste protocolo padrão para algumas amostras e espécies, conforme a necessidade.

Os produtos resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase foram purificados com enzimas *ExoSap* (USB Corporation) e sequenciados pelo método Sanger na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea) e no Centro de Genômica do Distrito Federal, localizado na Universidade Católica de Brasília. As sequências foram editadas no programa GENEIOUS 6.1 (Biomatters) e a fase gamética dos marcadores nucleares estimada pelo algoritmo PHASE (Stephens *et al.* 2001) implementado no programa DNASP 5.10 (Librado & Rozas 2009). O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo Muscle (Edgar 2004) e implementado no programa MEGA V. 5 (Tamura *et al.* 2011). Modelos de evolução nucleotídica de cada marcador molecular foram estimados no programa jModelTest 2 (Darriba *et al.* 2012) utilizando o critério de informação de

Akaike. Com base nos *scores* de máxima verossimilhança, os modelos mais ajustados aos conjuntos de dados foram HKY (Hasegawa *et al.* 1985) com proporção de sítios invariáveis estimados (I) e distribuição gamma (G) para *cyt-b*; TIM1 (Posada 2003) para OGT; TIM1+I para P4HB; e TrN+I para PPIC (Tamura & Nei 1993).

Agrupamentos populacionais e árvores de gene

Para avaliar o papel das matas secas e do rio São Francisco no isolamento das populações de *G. agilis* foram utilizadas sequências do gene *cyt-b* geradas no presente estudo e sequências disponíveis no GenBank, totalizando 184 sequências. Para isso, uma análise de agrupamentos genéticos foi conduzida no programa Bayesian Analysis of Population Structure - BAPS v 6 (<http://www.helsinki.fi/bsg/software/BAPS/>) utilizando o algoritmo *clustering with linked loci* (Corander *et al.* 2008). Foi utilizado um vetor como número mínimo de *K* (número de populações) de 3 3 3 3 5 5 5 5 7 7 7 7 9 9 9 9 10 10 10 10, indicando que foram executadas 20 rodadas dentre quatro réplicas de valores de *K* distintos. Na análise de *admixture* foram implementadas 100 iterações com cinco indivíduos tomados como referência em cada iteração e com 200 iterações adicionais para troca de indivíduos utilizados como referência. Por último, a análise de *admixture* foi implementada dez vezes para se verificar a consistência dos resultados.

Análises filogenéticas sob uma abordagem bayesiana foram implementadas para cada conjunto de dados separadamente (*cyt-b*, OGT, P4HB e PPIC). Estas análises foram realizadas numa perspectiva exploratória, de forma a encontrar correspondência entre os agrupamentos genéticos propostos pelo programa BAPS e a formação de clados das filogenias. Para isso foi utilizado o programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) versão 3.2.2 (disponível em <http://mrbayes.sourceforge.net>). Os resultados das estimativas de modelos de evolução nucleotídica provenientes do jModelTest2 foram utilizados como *priors* nas inferências bayesianas. Valores de frequência de bases e taxas de substituição nucleotídica foram ajustados como valores iniciais em uma distribuição *Dirichlet*, enquanto parâmetros de *gamma shape* e proporção de sítios invariáveis foram ajustados como fixos. Foram implementadas duas cadeias de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 10 milhões de gerações cada e amostragens a cada 1000 gerações. O programa TRACER v1.3 (Rambaut & Drummond 2007) foi usado para verificar a convergência dos valores de máxima verossimilhança e valores de tamanho efetivo das amostragens ($ESS > 200$). Ao final, 25% das árvores amostradas foram

descartadas como “burn-in” e um filograma foi construído utilizando apenas nós retidos em no mínimo 50% das amostragens.

Árvore de espécies, datação molecular e inferências demográficas

Uma estimativa de árvore de espécies foi conduzida no programa BEAST 2 (Bouckaert *et al.* 2014) utilizando o algoritmo do pacote *BEAST (Heled & Drummond 2010). Esta análise faz uso de uma abordagem coalescente e necessita que para cada indivíduo seja atribuída uma espécie ou qualquer outro nível de agrupamento (e.g. população) em que o mesmo está incluído. Sendo assim, cada indivíduo foi associado a uma das quatro populações (ver Resultados) inferidas pelo programa BAPS. Não foi possível obter sequências de genes nucleares para uma das quatro populações (de menor tamanho, destacada em vermelho na Figura 1) e, em função disso, este agrupamento genético não foi considerado na análise de árvore de espécies. Esta análise foi implementada com dois conjuntos de dados, um com as sequências obtidas para todos os genes e outro com sequências dos genes *cyt-b* e *PPIC* (os quais apresentaram maior variação entre os genes trabalhados). Uma taxa de mutação fixa de 2% a cada um milhão de anos foi associada ao gene *cyt-b* utilizando relógio molecular estrito. Esta taxa de mutação é estimada como uma média para o genoma mitocondrial de várias linhagens de mamíferos (Kumar & Subramanian 2002) e utilizada em outros trabalhos de evolução e biogeografia de pequenos mamíferos neotropicais (e.g. Gutiérrez *et al.* 2014). Para os demais genes também foi utilizado o relógio molecular estrito porém permitindo uma estimativa de suas taxas de mutação. Foi utilizado um modelo de evolução nucleotídica para cada partição (sequências de cada gene) de acordo com os modelos ótimos estimados no programa jModelTest. A árvore de espécies foi estimada com tamanho de população linear ao longo do tempo, utilizando o *prior coalescent constant population* e a taxa de mutação de cada gene (menos *cyt-b*) estimada a partir de uma distribuição log-normal com média 1.0 e desvio padrão 1.25. Os demais parâmetros foram mantidos no *default* e seguindo as recomendações do manual do programa. Esta análise foi ajustada para 100.000.000 de simulações de MCMC com amostragens a cada 10.000 gerações. A convergência das amostragens e valores de *ESS* foram visualizada no programa TRACER v1.3 (Rambaut & Drummond 2007). Foram implementadas duas corridas desta análise a fim de verificar convergência dos resultados. Os arquivos das corridas independentes (arquivos .log) foram combinados no programa LogCombiner

e sumarizados no programa TreeAnotator, onde 20% das primeiras árvores amostradas foram descartadas como “burn-in”.

Para se verificar sinais de alterações demográficas ao longo do tempo foram utilizadas as estatísticas D de Tajima (Tajima 1989), R_2 de Ramos-Onsins e Rozas (Ramos-Onsins & Rozas 2002) e F_s de Fu (Fu 1997), que testam desvios da neutralidade com base na frequências de mutações, e F_s de Fu (Fu 1997) com base na frequência de haplótipos. Estas estatísticas foram estimadas no programa DNASP v5.10 (Librado & Rozas 2009) em simulações coalescentes de 10.000 replicações para determinar valores de probabilidade ($P < 0,05$ considerado significativo) de cada estatística. Para estas análises, somente sequências do gene *cyt-b* foram utilizadas.

A história demográfica das diferentes populações também foi investigada utilizando Bayesian Skyline Plots (BSP) implementado no BEAST 2. Para esta análise também foram utilizadas apenas as sequências de *cyt-b* de cada população, sendo que a taxa de mutação, os modelos de evolução e os *priors* utilizados foram os mesmos daqueles utilizados na inferência da árvore de espécies. Igualmente, esta análise foi implementada com 100.000.000 de simulações de MCMC com amostragens a cada 10.000 gerações, e a convergência entre as cadeias e valores de *ESS* foram verificadas no programa TRACER v1.3, que também foi utilizado para construir os gráficos BSPs.

Delimitação de espécies

Foi aplicado um método de delimitação de espécies utilizando o programa *Bayesian Phylogenetic and Phylogeography* (BP&P v3.2) (Yang & Rannala 2010) utilizando as amostras que possuem sequências para todos os genes sequenciados. Este método tem como premissa ausência de fluxo gênico após a divergência das espécies (Yang & Rannala 2010), apesar de que simulações indicam que baixos níveis de migração não afetam os modelos de delimitação propostos pelo algoritmo do BP&P (Zhang *et al.* 2011). Em linhas gerais estas premissas estão em consonância com o conceito biológico de espécie proposto por Mayr (1963) que define espécie como um grupo que troca genes e é reprodutivamente isolado de outro grupo. O BP&P utiliza uma abordagem coalescente com base em genealogias de múltiplos *loci* independentes e árvore de espécies e, a partir de uma cadeia MCMC, calcula a probabilidade posterior de diferentes modelos (hipóteses) de espécies. Tamanho populacional ancestral (θ) e idade da raiz da árvore ($\tau\theta$) são *priors* ajustados a uma distribuição gama $G(\alpha, \beta)$ que afetam sensivelmente a probabilidade posterior e a

validação de cada espécie (Leaché *et al.* 2010), como por exemplo valores altos de θ e baixos de $\tau\theta$ com tendências a favorecer modelos contendo poucas espécies (Yang & Rannala 2010). Frente a isso, seguiu-se a recomendação de Leaché *et al.* (2010) implementando diversas rodadas do programa e empregando a seguinte combinação de *priors*: população grande $\theta \sim G(1, 10)$ e divergências profundas $\tau\theta \sim G(1, 10)$ ambos com média de 0,1 e variância 0,01; população ancestral pequena $\theta \sim G(2, 2000)$ e divergências recentes $\tau\theta \sim G(2, 2000)$ ambos com média de 0,001 e variância de 5×10^{-7} ; e combinação de população ancestral grande $\theta \sim G(1, 10)$ e divergências recentes $\tau\theta \sim G(2, 2000)$. Para cada combinação de parâmetros foram implementadas no mínimo cinco rodadas a fim de se verificar a congruência entre os resultados. Cada rodada foi implementada com 1.000.000 de gerações, amostragens a cada 5 gerações e “burn-in” de 10.000. Rodadas adicionais foram realizadas alterando a topologia da árvore guia, alterando os algoritmos disponíveis no programa (Yang 2015) e com um menor conjunto de dados (10 sequências por populações).

Resultados

Agrupamentos genéticos e árvores de gene

A análise de estruturação genética implementada no programa BAPS estimou quatro agrupamentos genéticos com base em sequências do gene *cyt-b* (Figura 1.2A). Dentre estes, três agrupamentos representam indivíduos provenientes de localidades distintas e demonstram estruturação geográfica evidente: um grupo ocupando a região central/norte do Cerrado e Caatinga, outro na região central/sudoeste do Cerrado e o terceiro agrupamento genético restrito à região leste e sul do rio São Francisco na porção oriental da Caatinga e Cerrado. O quarto agrupamento genético, representado por oito sequências obtidas de indivíduos coletados nas regiões central e sul do cerrado, não apresenta evidência de estruturação geográfica.

A análise filogenética utilizando 184 sequências do gene *cyt-b* de espécimes de *G. agilis* indica monofiletismo da espécie com alta probabilidade posterior ($pp=1$) (Figura 1.2B). Esta análise indica a formação de quatro clados principais e possui moderada correspondência com os agrupamentos genéticos indicados pela análise no programa BAPS. Dois clados reciprocamente monofiléticos são compostos por sequências de indivíduos também encontrados em grupos genéticos distintos no programa BAPS (destacados pela coloração verde e amarela na Figura 1.2). Estes clados representam indivíduos provenientes da região central/norte do Cerrado e

Caatinga (em verde na Figura 1.2) e região central/sudoeste do Cerrado (em amarelo na Figura 1.2). Dois clados derivados das primeiras divergências na árvore de *G. agilis* (clado 1 e 2 destacados em azul na Figura 1.2B) são representados por sequências de espécimes provenientes da região leste do rio São Francisco. Indivíduos destes clados foram encontrados no mesmo agrupamento genético pelo programa BAPS.

As análises filogenéticas implementadas com base em sequências dos marcadores nucleares indicaram baixa resolução (Figura 2.2A). O filograma resultante de sequências do PPIC indica com alto apoio estatístico ($pp=1$) o monofiletismo de *G. agilis* e moderada resolução filogenética. Esta análise demonstra a formação de dois clados, o primeiro composto por sequências de indivíduos originários da região leste da Caatinga localizadas à leste do rio São Francisco. O segundo clado é composto por sequências de espécimes das outras localidades amostradas e não apresenta correspondência com uma estruturação geográfica. As análises filogenéticas resultantes das sequências do OGT e P4HB indicaram monofiletismo de *G. agilis* e uma politomia basal que dificulta o entendimento de correlação entre grupos de sequências e localidades geográficas (Figura 2.2A).

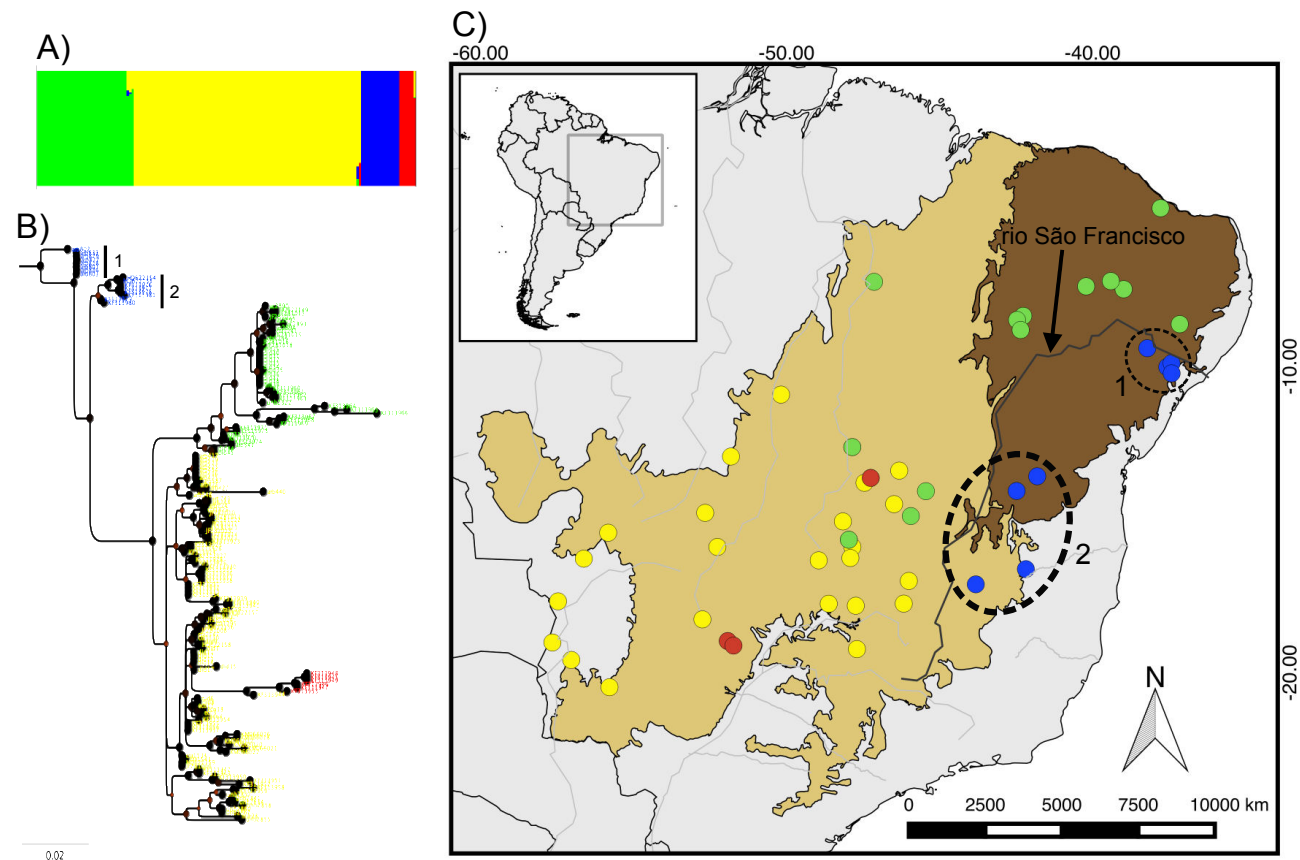


Figura 1.2: A) Grupos genéticos indicados pela análise no programa BAPS; B) Filograma resultante da análise filogenética com base em sequências do cyt-b realizada no programa MrBayes. Nós com círculo preto apresentam probabilidade posterior $> 0,95$; C) Mapa mostrando Cerrado em bege, Caatinga em marrom e rio São Francisco em cinza. Cores das barras em figura A e dos terminais da filogenia em B indicam correspondência com as localidades de mesma coloração da figura C. Círculos tracejados de números “1” e “2” indicam correspondência com clados na filogenia.

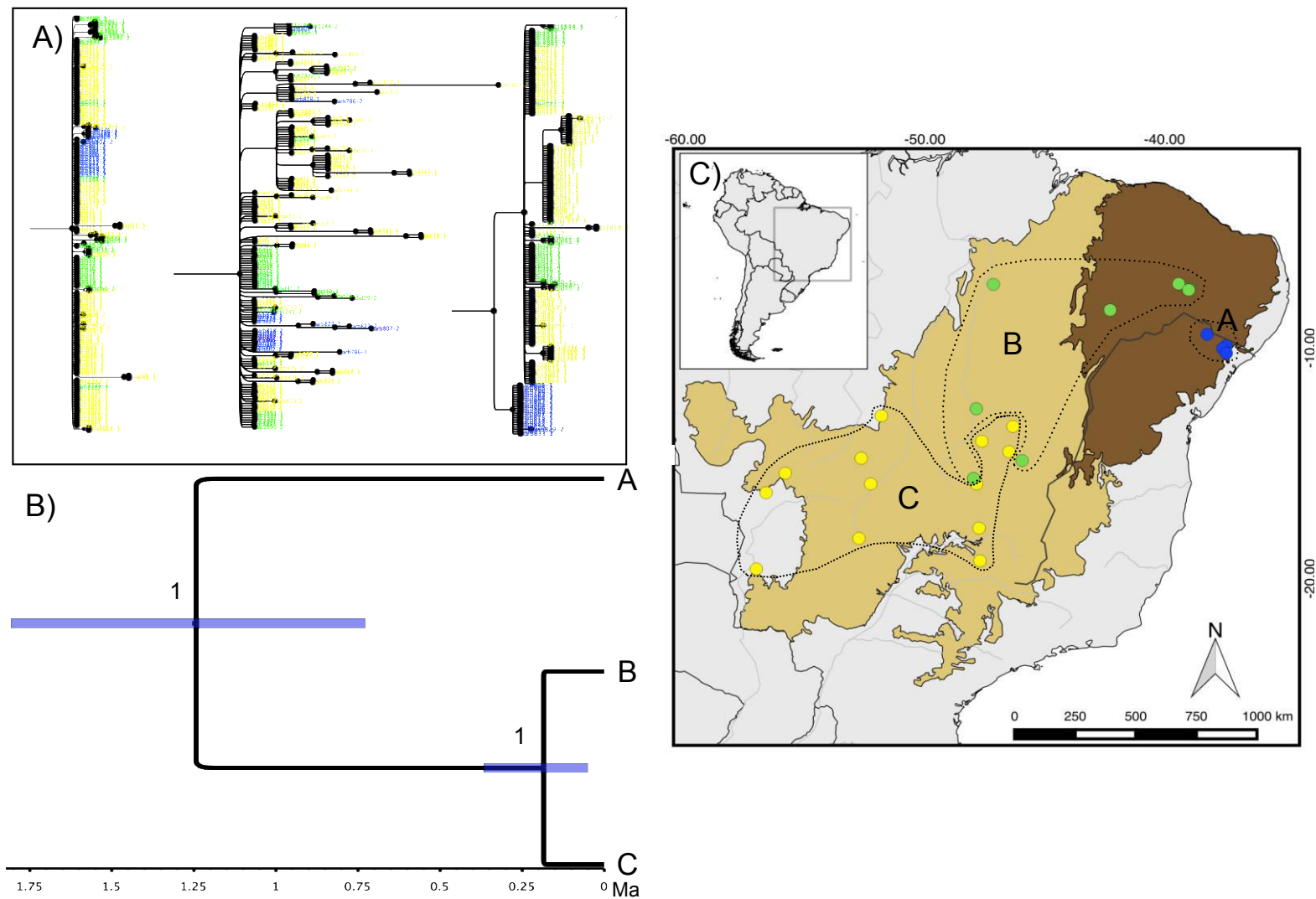


Figura 2.2: A) Filogenias de genes nucleares, da esquerda para direita: OGT, P4HB e PPIC. Nós com círculo em preto significam probabilidade superior > 0,95; B) Filogenia coalescente de espécies (cytb e PPIC): terminais A, B e C são populações derivadas das localidades correspondentes na figura C. C) mapa indicando localidades de origem das sequências analisadas nas árvores de gene e de espécie. Caatinga em marrom e Cerrado em bege.

Árvore de espécies, datação molecular e inferências demográficas

As árvores de espécies utilizando sequências do conjunto de dados completo (todos os marcadores) não apresentaram convergência das cadeias de MCMC. Resultado oposto ocorreu quando somente os marcadores mais informativos (cyt-b e PPIC) foram utilizados. Nesta análise três linhagens principais foram encontradas (A, B e C na Figura 2.2B) e tem correspondência com os agrupamentos genéticos e clados encontrados na análise do programa BAPS e nas árvores de gene do cyt-b e PPIC. Dentre estas linhagens, “C” representa a população restrita a porção central/sudoeste do Cerrado; “B” representa a população restrita a porção central/norte do Cerrado e Caatinga; “A” corresponde a população localizada na Caatinga na porção leste do rio São Francisco. Estas relações evolutivas foram estimadas com alto valor de apoio estatístico (pp=1). A população “A” foi estimada com um tempo de isolamento das demais populações de aproximadamente 1,25 milhões de anos, enquanto que as populações “B” e “C” apresentaram o tempo de divergência de seu ancestral comum mais recente de aproximadamente 200.000 anos.

Testes de neutralidade com base em sequências do cyt-b apresentaram valores significativos de D e R_2 apenas para a população “C” (Tabela 1.2), enquanto que as demais populações apresentaram resultados que não rejeitam o modelo de população constante ao longo do tempo. De maneira semelhante, os resultados das BSPs indicam a população “C” com uma tendência de crescimento ao longo do tempo e as demais populações com tamanho populacional constante (Figura 3.2).

Table 1.2: Resultados obtidos nos testes de desvios do modelo neutro de evolução para as diferentes populações encontradas. Indicadores estatísticos utilizados: D de Tajima, F_s de Fu e R_2 de Ramos-Onsins and Rozas.

População	D	F_s	R_2
Pop. A	-1.76	-2.15	0.31
Pop. B	-1.06	-1.18	0.09
Pop. C	-1.32	-2.82*	0.06*

* Valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$)

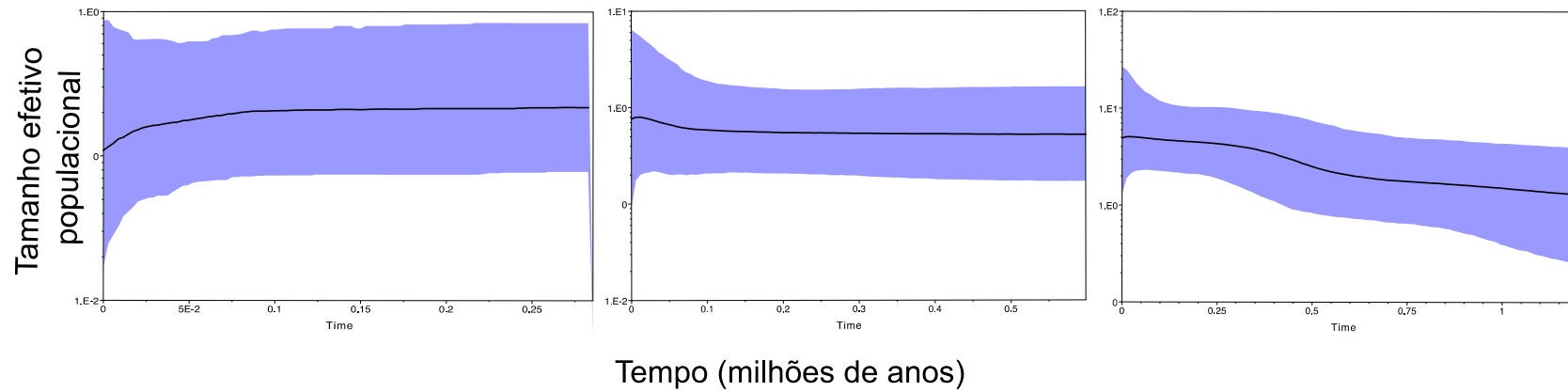


Figura 3.2: Tamanho efetivo populacional através do tempo das populações A (esquerda), B (centro), C (direita) de *G. agilis* com base em Bayesian Skyline Plots. Área em azul representa intervalo de 95% de HPD.

Delimitação de espécies

A análise de delimitação de espécies realizada no programa BP&P indicou a presença de três espécies ($pp = 1$), que possuem associação direta com os clados recuperados na árvore de gene do *cyt-b* e na árvore de espécies. O mesmo resultado foi obtido em todas as análises onde os valores dos *priors* θ e $\tau\theta$ e demais parâmetros como algoritmo, árvore guia e número de amostras por população foram alterados.

Discussão

O conjunto de resultados encontrados aqui permite delinear que *G. agilis* possui três linhagens evoluindo independentemente: população A da região leste do rio São Francisco, população B proveniente da região central/norte do Cerrado e Caatinga e população C da região sul/sudoeste do Cerrado. A primeira população está isolada há mais tempo em relação às outras (1.25 Ma) enquanto que separação das populações B e C foi mais recente (200.000 mil anos). Apesar da baixa resolução dos marcadores nucleares e incongruências com a árvore derivada da análise do *cyt-b*, as filogenias resultantes do *cyt-b* e do PPIC foram semelhantes em demonstrar que a população proveniente do leste do Rio São Francisco forma um clado derivado da primeira divergência na árvore de *G. agilis*. A árvore coalescente de espécies também demonstrou esta tendência, além de apontar correspondência com os demais clados recuperados na árvore do *cyt-b*. Incongruências entre árvores de genes de marcadores mitocondriais e nucleares é encontrada com frequência em organismos de divergência recente e tem como principais causas a retenção de polimorfismo ancestral e separação incompleta das linhagens (“incomplete lineage sorting”) (Knowles & Carstens 2007; Toews & Brelsford 2012). Neste sentido que se fazem necessárias, como realizado neste trabalho, a aplicação de métodos coalescentes que acomodem incongruências de marcadores independentes (Page & Charleston 1997; Rosenberg & Nordborg 2002).

A estruturação filogenética e geográfica com base em sequências do gene *cyt-b* encontrada aqui é semelhante a de demais estudos (Costa *et al.* 2003; Faria *et al.* 2013; Lóss *et al.* 2011; Rocha *et al.* 2015). Porém, quando os diferentes marcadores foram analisados de forma simultânea na árvore de espécie encontramos que a população A (leste do rio São Francisco) é resultado de uma divergência mais antiga,

enquanto que as populações B e C formam clados irmãos. Estes resultados são contrários ao encontrado por Faria *et al.* (2013) que, utilizando sequências do exon 28 do gene nuclear *fator de Von Willenbrand* (vWF), recuperaram indivíduos do leste do rio São Francisco (equivalente à população A) como irmãos dos indivíduos do norte da Caatinga (equivalente à população B). Entretanto é preciso levar em conta que as filogenias com base em sequências do vWF não possuem apoio estatístico para assegurar o monofiletismo de *G. agilis* (Faria *et al.* 2013) e que análises coalescentes multigênicas jamais foram empregadas para este organismo. Por outro lado, no presente estudo foi encontrado monofiletismo de *G. agilis* em todas filogenias de gene e de espécie, sendo que os métodos aqui apresentados estão alinhados à perspectiva da teoria coalescente e análises multigênicas, que em última análise estão na vanguarda da filogeografia moderna (Avise 2009; Hickerson *et al.* 2010).

Foram constatadas evidências de crescimento populacional de *G. agilis* na população C e indicativos de estabilidade ao longo do tempo para as populações A e B. Estes resultados podem ser interpretados frente a dinâmica de distribuição das matas secas. Algumas hipóteses indicam que a Caatinga é uma região de estabilidade de matas secas, enquanto que porções de matas secas do Cerrado e sudoeste do Brasil sofreram eventos de fragmentação ao longo do tempo (Prado & Gibbs 1993; Werneck *et al.* 2011). Ademais, as matas secas poderiam apresentar uma distribuição muito mais ampla e contígua no Neotrópico durante o Terciário e Quaternário e mudanças climáticas mais recentes teriam orientado uma distribuição atual disjunta (Pennington *et al.* 2000; Pennington *et al.* 2004). Neste cenário, os enclaves de matas secas atuais do Cerrado (Felfili *et al.* 2006; Oliveira-Filho & Ratter 1995) poderiam ser remanescentes de uma formação maior que passou por fragmentação no último máximo glacial e que hoje estariam se expandindo (Werneck *et al.* 2011). Esta dinâmica poderia explicar por que na área da Caatinga e norte do Cerrado ocorrem populações estáveis e antigas de *G. agilis* (Populações A e B) e que a linhagem presente no sul/sudoeste do Cerrado (população C) apresenta desvios do modelo neutro populacional decorrente de simultâneas expansões e fragmentações das matas secas.

Tanto análises com sequências de *cyt-b* utilizadas em trabalhos previamente publicados (e.g. Faria *et al.* 2013; Rocha *et al.* 2015) como as análises utilizando sequências inéditas (genes nucleares e mitocondrial) indicaram conjuntos genéticos restritos à leste do rio São Francisco. Este rio tem sido utilizado como modelo em

estudos que testam hipóteses de rios como barreiras ao fluxo gênico (e.g. Faria *et al.* 2013; Nascimento *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2015; Percequillo *et al.* 2008). Apesar de diferentes organismos apresentarem clados restritos à leste deste rio, algumas linhagens de mamíferos e lagartos demonstram fluxo gênico recente entre indivíduos distribuídos em ambas as margens do rio (Nascimento *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2015). Frente a isso, não parece adequado supor que o rio como barreira *per se* seja suficiente para impedir acasalamentos entre indivíduos de populações adjacentes. Sendo assim, outros fatores promotores de isolamento têm sido propostos como alternativa para estruturação genética. Por exemplo, supõe-se que a cadeia de montanhas localizada à leste do rio São Francisco (cadeia do Espinhaço) atue como barreira para lagartos de pequeno tamanho (Oliveira *et al.* 2015), e que o paleo-curso e meandros abandonados da foz do rio São Francisco também sejam promotores de estruturação genética em roedores e lagartos (Nascimento *et al.* 2013; Werneck *et al.* 2015). Além disso, pode-se supor que retrações e expansões de matas secas em ambas as margens do rio São Francisco poderiam ser um agente adicional que igualmente contribui com a estruturação genética de populações distribuídas nas margens oriental e ocidental do rio.

A análise de delimitação de espécies indicou que cada uma das três populações recuperadas nas filogenias representam espécies diferentes (probabilidade posterior = 1), e que portanto *G. agilis* seria um complexo de espécies. Adicionalmente a este método de delimitação de espécie, a população A poderia ser considerada uma espécie distinta se esquemas taxonômicos fossem propostos com base no conceito filogenético de espécie (Cracraft 1983), visto que em duas árvores de gene e na árvore coalescente de espécie esta população é monofilética e distante das demais. Um indicativo contrário pode ser visto na ausência desta tendência em outros dois genes analisados (OGT e P4HB). Contudo, simulações indicam probabilidades baixas de monofiletismo recíproco entre espécies de separação recente em função de retenção de polimorfismo ancestral, “lineage sorting” ainda muito atuantes (Knowles & Carstens 2007), hibridização e introgressão (Zhang *et al.* 2011). Assim, a taxonomia de organismos com esta natureza não é uma tarefa simples e requer uma análise mais profunda de conceitos de espécie e métodos de validação e delimitação de espécies (de Queiroz 2007).

Além de conjuntos de dados diferentes frequentemente produzirem hipóteses filogenéticas conflituosas, a falta de métodos e conceitos de espécies unificados (de

Queiroz 2007) implica que, por vezes, a taxonomia se torne subjetiva. Por outro lado, a unificação de métodos de delimitação e conceitos de espécies permitiria o tratamento de uma entidade específica como hipótese científica passível de teste. Métodos coalescentes de delimitação tentam atingir este objetivo (Zhang *et al.* 2011), na medida em que empregam um ou mais modelos teóricos (i.e. conceitos de espécie) e procedimentos estatísticos para gerar probabilidades de determinada linhagem ser considerada uma espécie distinta. Este procedimento é particularmente útil se considerarmos tempos de divergências recentes, como encontrado em *G. agilis*, e onde diferenças morfológicas ou ecológicas ainda não foram suficientemente acumuladas gerando dessa forma conflitos conceituais. Por exemplo, a propriedade fundamental do conceito fenético assume que diferentes espécies apresentam formas distintas, porém duas espécies podem conservar formas semelhantes e serem reciprocamente monofiléticas e com ausência de fluxo gênico (de Queiroz 2007). Analogamente, o nicho ecológico, propriedade intrínseca do conceito ecológico de espécie, pode ser conservado para duas espécies distintas de divergência recente (Wiens 2004). Estes fenômenos ocorrem porque as diferentes propriedades de cada conceito de espécie (e.g. forma para o fenético, nicho para o ecológico) não mudam na mesma intensidade e no mesmo tempo em que duas linhagens vão se separando (de Queiroz 2007). Portanto, uma abordagem integrativa se faz necessária. No contexto de *G. agilis*, a incorporação de informações morfológicas, ecológicas e dados genéticos adicionais à delimitação de espécies aplicadas no presente estudo seria particularmente importante para validar ou refutar a hipótese deste táxon abrigar um complexo de espécies.

O presente estudo utilizou conjuntos de dados inéditos e métodos filogeográficos clássicos e coalescentes. Os resultados obtidos oferecem novas hipóteses sobre a evolução de *G. agilis* e sua relação com as regiões que esta espécie ocupa. Uma destas hipóteses é de que a dinâmica histórica de expansão e contração de matas secas desempenham um fator determinante para a estruturação genética e geográfica de *G. agilis*. Outra hipótese é que as diferentes linhagens desta espécie podem se tratar de espécies distintas, fazendo com que *G. agilis* acumule mais de uma espécie. A integração de conjuntos de dados adicionais (e.g. morfologia) seria importante para validar a hipótese de que *G. agilis* abriga um complexo de espécies.

Referências bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. (1977). Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia*, 52, 1–22.
- Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148–155.
- Bock, D. G., Macisaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2012). Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279, 2377–2385.
- Bonvicino, C. R., & Weksler, M. (1998) A New Species of *Oligoryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Northeastern and Central Brazil. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63, 90–103.
- Bonvicino, C. R., Lima, J. F. S. & Almeida F. C. (2003). A New Species of *Calomys* Waterhouse (Rodentia, Sigmodontinae) from the Cerrado of Central Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20, 301–307.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kuhnert, D., Vaughan, T., Wu, C., Xie, D., ... Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *Plos Computational Biology*, 10, 1–6.
- Carmignotto, A. P., Vivo, M. De, & Langguth, A. (2012). Mammals of the Cerrado and Caatinga: distribution patterns of the tropical open biomes of central South America. In B. D. Patterson & L. P. Costa (Eds.), *Bones, clones and biomes. The history and geography of recent Neotropical mammals* (pp. 307–350). Chicago, Illinois: University of Chicago Press.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., & Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–14.
- Costa, L. P., Leite, Y. L. R., & Patton, J. L. (2003). Phylogeography and systematic notes on two species of gracile mouse opossum, genus *Gracilinanus* (Marsupialia: Didelphidae) from Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 116, 275–292.

- Cracraft, J. (1983). Species concept and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1, 159–187.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 32, 1792–1797.
- Faria, M. B., Nascimento, F. F., Oliveira, J. A., & Bonvicino, C. R. (2013). Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity*, 104, 613–626.
- Felfili, J. M., Klink, C. A., Silva, J. F., & Farin, M. R. (2006). Spatial heterogeneity , land use and conservation in the cerrado region of. *Journal of Biogeography*, 33, 536–548.
- Giarla, T. C., & Jansa, S. A. (2014). The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recent radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). *Journal of Biogeography*, 41, 1547–1558.
- Gutiérrez, E. E., Anderson, R. P., Voss, R. S., Ochoa-G, J., Aguilera, M., & Jansa, S. A. (2014). Phylogeography of *Marmosa robinsoni*: insights into the biogeography of dry forests in northern South America. *Journal of Mammalogy*, 95, 1175–1188.
- Hasegawa, M., Kishino, K., & Yano, T.(1985). Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160–174.
- Heled, J., & Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570–580.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. a, Graham, C. H., Johnson, J. B., ... Yoder, a D. (2010). Phylogeography’s past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291–301.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Jansa, S. A., Barker, F. K., & Voss, R. S. (2014). The early diversification history of didelphid marsupials: a window into South America’s “splendid isolation.”

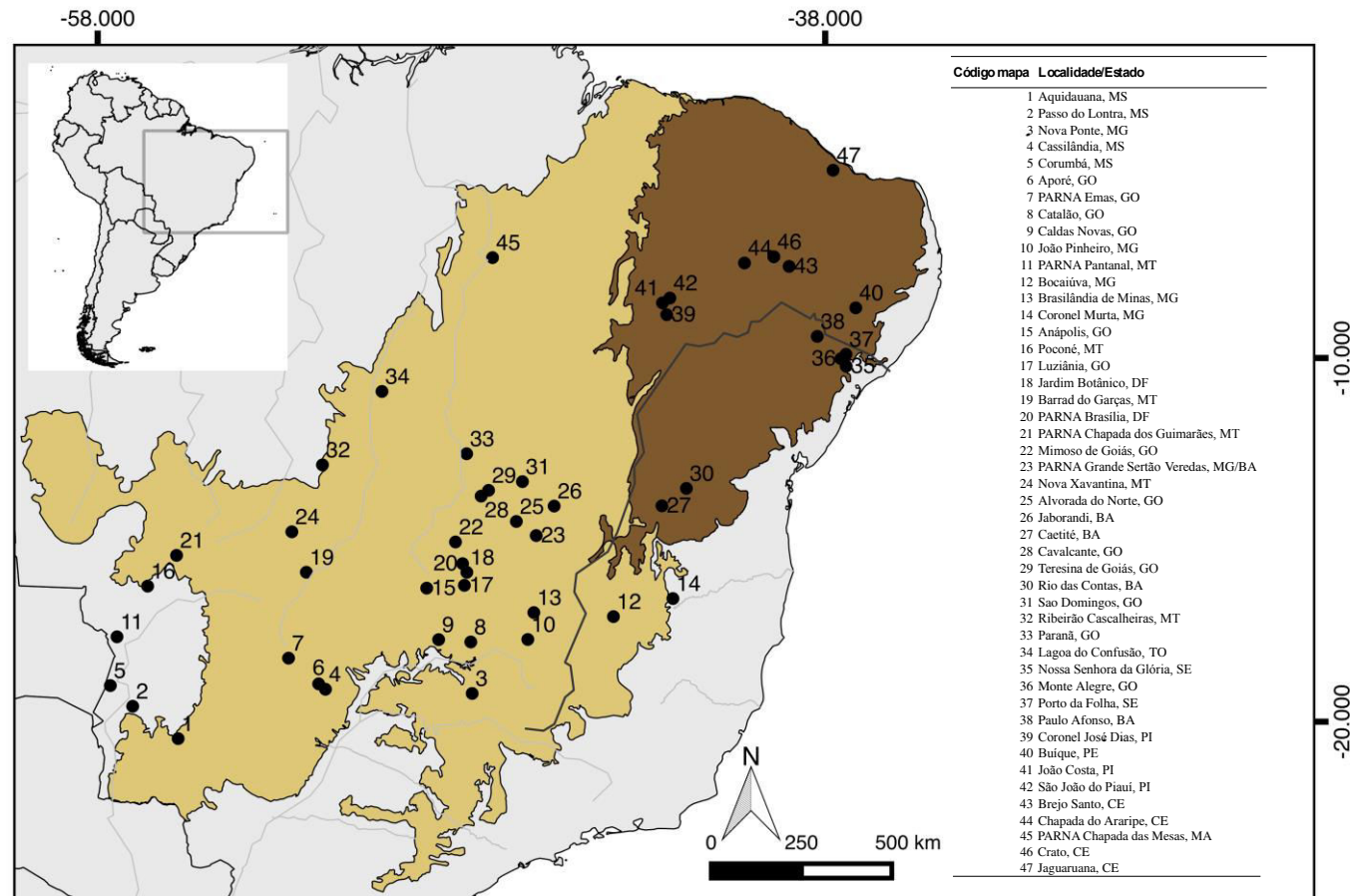
- Evolution*, 68, 684–695.
- Knowles, L. L., & Carstens, B. C. (2007). Delimiting Species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56, 887–895.
- Kumar, S., & Subramanian, S. (2002). Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of National Academy Society*, 99, 803–808.
- Leaché, A. D., & Fujita, M. K. (2010). Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of Royal Society - Biological Sciences*, 277, 3071–3077.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5 : a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lóss, 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.
- Mares, M. A., Willig, M. R., & Lacher, T. E. J. (1985). The Brazilian Caatinga in South American Zoogeography: tropical mammals in a dry region. *Journal of Biogeography*, 12, 57–69.
- Mayr E. 1963. Animal species and evolution. Cambridge (MA): Belk nap Press.
- Nascimento, F. F., Lazar, A., Menezes, A. N., Durans, M., Moreira, J. C., Salazer-Bravo, J., ... 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*, 8, 1–13.
- Oliveira-Filho, A. T., & Ratter, J. A. (1995). A study of the origin of central brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburg Journal of Botany*, 52, 141–194.
- Oliveira, F. E., Gehara, M., São-Pedro, A. V., Chen, X., Myers, E. A., Burbink, F. T., ... Costa, G. C. (2015). Speciation with gene flow in whiptail lizards from a Neotropical xeric biome. *Molecular Ecology*, 24, 5957–5975.
- Page, R. D. M., & Charleston, M. A. (1997). From gene to organismal phylogeny: reconciled trees and the gene tree/species tree problem. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 231–240.
- Pennington, R. T., Lavin, M., Prado, D. E., Pendry, C. a, Pell, S. K., & Butterworth, C. a. (2004). Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both tertiary and quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological*

- Sciences*, 359, 515–37.
- Pennington, R. T., Lewis, G. P., & Ratter, J. A. (2006). *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation*. (R. T. Pennington, G. P. Lewis, & J. A. Ratter, Eds.). Boca Raton, FL: The Systematics Association.
- Pennington, R. T., Pradot, D. E., Pendry, C. A., & Botanic, R. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27, 261–273.
- Percequillo, A. R., Hingst-Zaher, E., & Bonvicino, C. R. (2008). Systematic review of genus *Cerradomys* Weksler, Percequillo and Voss, 2006 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with description of two new species from eastern Brazil. *American Museum Novitates*, 3622, 1–46.
- Posada, D. 2003. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. Pp. 6.5.1-6.5.14 in A. D. Baxevanis, D. B. Davison, R. D. M. Page, G. A. Petsko, L. D. Stein, and G. D. Stormo, eds. *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.
- Prado, D. E., & Gibbs, P. E. (1993). Patterns of species distributions in the dry seasonal forest of the South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 902–927.
- Queiroz, D. de. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer. Ver. 1.4. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 1 November 2013)
- Rocha, R. G., Ferreira, E., Loss, A. C., Heller, R., Fonseca, C., & Costa, L. P. (2015). The Araguaia river as an important biogeographical divide for didelphid marsupials in central Brazil. *Journal of Heredity*, 106, 593–607.
- Rosenberg, N. A., & Nordborg, M. (2002). Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature*, 3, 380–390.
- Semedo, T. B. F., Brandão, M. V., Carmignotto, A. P., Nunes, M. da S., Farias, I. P., Silva, M. N. F. da, & Rossi, R. V. (2015). Taxonomic status and phylogenetic relationships of *Marmosa agilis peruana* Tate, 1931 (Didelphimorphia: Didelphidae), with comments on the morphological variation of *Gracilinanus* from central–western Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173, 190–216.

- Smith, M. F., & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50, 149–177.
- Stephens M, Smith N. J., & Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 978–989.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial dna in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21, 3907–3930.
- Tribe, C. J. 2005. A New Species of *Rhipidomys* (Rodentia, Muroidea) from North-Eastern Brazil. *Arquivos do Museu Nacional*, 63, 131 –146.
- Vanzolini, P.E., 1976. On the lizards of a Cerrado-Caatinga contact, evolutionary and zoogeographical implications (Sauria). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 29, 111–119.
- 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 ROBERT. *American Museum Novitates*, 3482, 1–34.
- Weksler, M., Percequillo, A. R., & Voss, R. S. (2006). Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *American Museum Novitates*, 3537, 1–29.
- Werneck, F. P. (2011). The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30, 1630–1648.
- Werneck, F. P., Costa, G. C., Colli, G. R., Prado, D. E., & Sites Jr, J. W. (2011). Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidencegeb. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 272–288.

- Werneck, F. P., Leite, R. N., Geurgas, S. R., & Rodrigues, M. T. (2015). Biogeographic history and cryptic diversity of *saxicolous* Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1–24.
- Wiens, J. J. (2004). Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58, 193–197.
- Yang, Z. (2015). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology*, 61, 854–865.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of National Academy Society*, 107, 9264–9269.
- Zhang, C., Zhang, D. X., Zhu, T., & Yang, Z. (2011). Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. *Systematic Biology*, 60, 747–761.

Anexo 1.2: Mapa indicando as localidades de origem das amostras de *G. agilis* utilizadas nas análises. Em marrom a Caatinga, em bege o Cerrado.



Anexo 2.2: Número de tombo ou coleta das amostras de tecidos de *G. agilis* utilizados no presente estudo, indicando localidade de coleta, Estado e coordenadas geográficas em graus decimais.

Amostra	Município/localidade	Estado	Coordenadas	
AC2890	Brejo Santo	CE	-7.48095	-38.99019
AC2891	Brejo Santo	CE	-7.48095	-38.99019
AC2892	São João do Piauí	PI	-8.35188	-42.26958
AC2893	São João do Piauí	PI	-8.35188	-42.26958
AC2894	São João do Piauí	PI	-8.35188	-42.26958
ARB 417	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB 418	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB419	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB423	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB425	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB426	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB427	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB434	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB436	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB440	São Domingos	GO	-13.40405	-46.32561
ARB467	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
ARB475	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
ARB541	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
ARB548	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
ARB587	Alvorada do Norte	GO	-14.49474	-46.48910
ARB743	Ribeirão Cascalheira	MT	-12.93987	-51.81927
ARB744	Ribeirão Cascalheira	MT	-12.93987	-51.81927
ARB774	Ribeirão Cascalheira	MT	-12.93987	-51.81927
ARB786	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB802	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB803	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB806	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB807	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB808	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496

Anexo 2.2: Continuação

Amostra	Município/localidade	Estado	Coordenadas	
ARB818	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB833	Monte Alegre de Sergipe	SE	-10.01911	-37.56496
ARB804	Porto da Folha	SE	-9.89791	-37.42544
ARB822	Nossa Senhora da Glória	SE	-10.01911	-37.56496
ARB829	Paulo Afonso	BA	-10.22584	-37.42010
UFES-CTA1429	Barra do Garças	MT	-15.89163	-52.26186
UFES-CTA1295	Nova Ponte	MG	-19.22538	-47.70376
UFES-CTA1259	Nova Ponte	MG	-19.22538	-47.70376
UFES-CTA1241	Crato	CE	-7.215591	-39.40932
UFES-CTA1244	Crato	CE	-7.215591	-39.40932
UFES-CTA1541	Poconé	MT	-16.27375	-16.27375
UFES-CTA1534	Poconé	MT	-16.27375	-16.27375
UFES-CTA1550	Passo do Lontra	MS	-19.57791	-57.03681
UFES-CTA1547	Passo do Lontra	MS	-19.57791	-57.03681
DID1	PARNA Chapada dos Guimarães	MT	-15.42757	-55.83072
DID6	PARNA Chapada dos Guimarães	MT	-15.42757	-55.83072
DID8	PARNA Chapada dos Guimarães	MT	-15.42757	-55.83072
DID9	PARNA Chapada dos Guimarães	MT	-15.42757	-55.83072
DID11	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID12	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID13	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID14	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID15	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID17	PARNA de Emas	GO	-18.25405	-52.75162
DID29	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID30	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID31	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID32	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID33	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247

Anexo 2.2: Continuação

Amostra	Município/localidade	Estado	Coordenadas	
DID34	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID35	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID36	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID37	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID38	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID39	PARNA Grande Sertão Veredas	BA/MG/GO	-14.88291	-45.94247
DID40	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03894	-47.62296
DID41	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03894	-47.62296
DID42	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03894	-47.62296
DID44	PARNA Chapada das Mesas	MA	-7.24020	-47.143
DID45	PARNA Chapada das Mesas	MA	-7.24020	-47.143
ECO3	Nova Xavantina	MT	-14.77937	-52.66124
ECO4	Nova Xavantina	MT	-14.77937	-52.66124
ECO13	Nova Xavantina	MT	-14.77937	-52.66124
ECO10	Nova Xavantina	MT	-14.77937	-52.66124
ECO18	Nova Xavantina	MT	-14.77937	-52.66124
MAR26	Jardim Botânico, Brasília	DF	-15.89348	-47.84998
MAR28	Jardim Botânico, Brasília	DF	-15.89348	-47.84998
MAR33	EMBRAPA, Brasília	DF		
MAR41	EMBRAPA, Brasília	DF		
MAR45	Fazenda Água Limpa, Brasília	DF		
MAR46	Fazenda Água Limpa, Brasília	DF		
MAR49	Fazenda Água Limpa, Brasília	DF		
MCNU847	Piranhas	GO	-16.42491	-51.82781
UNB2322	PARNA de Brasília	DF	-15.65524	-47.96745
UNB2841	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
UNB2854	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2855	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2857	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2858	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128

Anexo 2.2: Continuação

Amostra	Município/localidade	Estado	Coordenadas	
UNB2859	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2860	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2861	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2862	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2863	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2864	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
Grupos externos				
	<i>Cryptonanus</i> sp.		DID43	
	<i>Marmosa murina</i>		DID28	
	<i>Gracilinanus microtarsus</i>		DID20	

Acrônimos: AC: caderno de campo de Alexandre Uarth Christoff; ARB: caderno de campo de Alexandra Bezerra; ECO: coleção do autor; UFES-CTA: coleção de tecidos animais da Universidade Federal do Espírito Santo; DID: coleção de tecidos de mamíferos do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília; MAR: coleção de tecidos de mamíferos do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília; MCNU: Museu de Ciências Naturais da Universidade Luterana do Brasil; UNB: coleção de mamíferos da Universidade de Brasília.

Anexo 3.2: Sequências do gene *citocromo b* (*cyt-b*) de *G. agilis* obtidos do GenBank. São indicados o número de acesso, município, unidade federativa, coordenadas geográficas em graus decimais e referência dos trabalhos que geraram a sequência.

Número de acesso	Município	UF	Coordenadas		Referência
KF313923/CRB2311	Mimoso de Goiás	GO	-15.0588	-48.1620	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313924/CRB746	Teresina de Goiás	GO	-13.6395	-47.2533	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313925/CRB648	Teresina de Goiás	GO	-13.6395	-47.2533	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313926/CRB750	Teresina de Goiás	GO	-13.6395	-47.2533	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313927/CRB895	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313981/JAO1184	Rio das Contas	BA	-13.5858	-41.8136	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313980/JAO1177	Rio das Contas	BA	-13.5858	-41.8136	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313979/JAO1171	Rio das Contas	BA	-13.5858	-41.8136	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313978/LBCE3827	Caetité	BA	-14.0648	-42.4858	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313977/LBCE3801	Caetité	BA	-14.0648	-42.4858	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313976/LBCE3832	Caetité	BA	-14.0648	-42.4858	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313974/LBCE3817	Caetité	BA	-14.0648	-42.4858	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313974/LBCE2743	Coronel José Dias	PI	-8.8090	-42.3544	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313973/LBCE2736	Coronel José Dias	PI	-8.8090	-42.3544	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313972/LBCE1261	Coronel José Dias	PI	-8.8090	-42.3544	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313971/LBCE2758	Coronel José Dias	PI	-8.8090	-42.3544	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313970/LBCE1240	João Costa	PI	-8.4848	-42.4724	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313969/LBCE5265	Jaguaruana	CE	-4.8361	-37.7815	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313968/LBCE5263	Jaguaruana	CE	-4.8361	-37.7815	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313967/LBCE5254	Jaguaruana	CE	-4.8361	-37.7815	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313966/AP625	Buíque	PE	-8.6210	-37.1572	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313965/AP622	Buíque	PE	-8.6210	-37.1572	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313964/AP614	Buíque	PE	-8.6210	-37.1572	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313963/CRB1670	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313962/CRB1644	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313961/CRB1606	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313960/CRB1571	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313959/MCNM2189	Brasilândia de Minas	MG	-17.0003	-46.0085	Faria <i>et al.</i> 2013

Anexo 3.2: Continuação

Número de acesso	Município	UF	Coordenadas		Referência
KF313958/MCNM2243	João Pinheiro	MG	-17.7405	-46.1741	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313957/LBCE4888	Aquidauana	MS	-20.4670	-55.7872	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313956/LBCE5667	Corumbá	MS	-19.0081	-57.6515	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313955/LBCE5666	Corumbá	MS	-19.0081	-57.6515	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313954/LBCE5665	Corumbá	MS	-19.0081	-57.6515	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313953/LBCE11949	Cassilândia	MS	-19.1097	-51.7365	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313952/LBCE8774	Luziânia	GO	-16.2514	-47.9177	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313951/LBCE7514	Luziânia	GO	-16.2514	-47.9177	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313950/LBCE7500	Luziânia	GO	-16.2514	-47.9177	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313949/LBCE9410	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
GKF313948/LBCE9435	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313947/LBCE9413	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313946/LBCE9415	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313945/LBCE9430	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313944/LBCE11947	Aporé	GO	-18.9611	-51.9236	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313943/LBCE9474	Anápolis	GO	-16.3285	-48.9534	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313942/LBCE9469	Anápolis	GO	-16.3285	-48.9534	Faria <i>et al.</i> 2013
kf313941/LBCE11994	São Domingos	GO	-13.4004	-46.3221	Faria <i>et al.</i> 2013
kf313940/LBCE11996	São Domingos	GO	-13.4004	-46.3221	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313939/LBCE11997	São Domingos	GO	-13.4004	-46.3221	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313938/CRB954	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313937/CRB1006	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313936/CRB982	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313935/CRB978	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313934/CRB1001	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313933/CRB977	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313932/CRB974	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313931/CRB952	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313930/CRB901	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313929/CRB1009	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013
KF313928/CRB1007	Cavalcante	GO	-13.7980	-47.4570	Faria <i>et al.</i> 2013

Anexo 3.2: Continuação

Número de acesso	Município	UF	Coordenadas		Referência
JF281024/LPC317	Nova Ponte	MG	-19.2253	-47.7037	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281023/RGR482	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281022/RGR446	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281021/RGR427	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281019/LPC283	Crato	CE	-7.2155	-39.4093	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281018/LPC243	Crato	CE	-7.2155	-39.4093	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281017/LPC251	Crato	CE	-7.2155	-39.4093	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281016/LPC249	Crato	CE	-7.2155	-39.4093	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281015/LPC270	Crato	CE	-7.2155	-39.4093	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281014/RGR480	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281013/RGR95	Pium	TO	-10.4427	-49.1798	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281012/RGR405	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281011/RGR406	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281010/RGR426	Lagoa da Confusão	TO	-10.9201	-50.1832	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281009/LPC589	Poconé	MT	-16.2737	-56.6265	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281008/LPC297	Nova Ponte	MG	-19.2253	-47.7037	Rocha <i>et al.</i> 2015
JF281007/LPC380	Nova Ponte	MG	-19.2253	-47.7037	Rocha <i>et al.</i> 2015
KM066022/MZUSP35188	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
KM066021/MZUSP35190	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
KM066020/MZUSP35191	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
KM066018/MZUSP35186	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
KM066017/MZUSP5187	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
KM066016/MZUSP35192	Parna Pantanal	MT	-17.6673	-57.4689	Semedo <i>et al.</i> 2015
HQ622160/UFMG2498	Barra do Garças	MT	-15.8916	-52.2618	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622159/UFMG2497	Poconé	MT	-16.2737	-56.6265	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622158/UFMG2500	Passo do Lontra	MG	-19.5779	-57.0368	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622157/UFMG2515	Nova Ponte	MG	-19.2253	-47.7037	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622156/UHECO4722	Caldas Novas	GO	-17.7445	-48.6250	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622155/UFMG2495	Coronel Murta	MG	-16.6153	-42.1843	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622154/UFMG2433	Bocaiuva	MG	-17.1114	-43.820	Loss <i>et al.</i> 2011
HQ622149/UFMG2504	Chapada do Araripe	CE	-7.3875	-40.2161	Loss <i>et al.</i> 2011

Anexo 3.2: Continuação

Grupos externos	Número de acesso	Referência
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66033/INPA6741	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66029/INPA6740	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66028/INPA6739	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66030/INPA6738	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66032/INPA6737	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus peruanus</i>	KM66031/INPA6736	Semedo <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952260/LPC820	Leite <i>et al.</i> 2016
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952261/LPC821	Leite <i>et al.</i> 2016
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952262/LPC822	Leite <i>et al.</i> 2016
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952241/LPC915	Leite <i>et al.</i> 2016
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952268/YL428	Leite <i>et al.</i> 2016
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KT952242/CTA1051	Leite <i>et al.</i> 2016

Anexo 4.2: Nome e sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados no estudo, e as referências de onde foram obtidos.

Primer	Sequência	Referência
PPIC-F1	5'- CCCAAGACTGTGGAGAATTC	Giarla & Jansa, 2014
PPIC-R1	5'- CAACAGTAAAGTCTCCACCTTGAA	Giarla & Jansa, 2014
P4HB-F1	5'- GCAGTTAAGGTTACACAGTTTCCCT	Giarla & Jansa, 2014
P4HB-R1	5'- ATCTTGTCCACCACTCTCCAG	Giarla & Jansa, 2014
OGT-F	5'-AAATCATTTCATCGACCTTTCTCAG	Giarla, 2013
OGT-R	5'-ATTCCCTGTAATGGAAAAGCAGC	Giarla, 2013
MVZ05	5'- CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG	Smith & Patton, 1993
MVZ16	5'- AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	Smith & Patton, 1993

Capítulo 3

Expansão demográfica de *Calomys tener* (Rodentia, Cricetidae) durante o Quaternário tardio no Cerrado: respostas ao efeito do fogo e ocupação humana pré-histórica

Introdução

A presença de fogo, tanto de origem natural como provocado pelo homem, em paisagens naturais tem implicações diretas na diversificação e evolução da biota (Bowman *et al.* 2011). No Cerrado do Brasil central as queimadas são fatores determinantes para a alteração de fitofisionomias, influenciando diretamente a densidade de componentes arbóreos, arbustivos e herbáceos (Cole 1960; Coutinho 1982; Eiten 1972). A presença de fogo no Cerrado é histórica, sendo reconhecida desde o final do Pleistoceno (Ledru 2002) e início do Holoceno (Ledru *et al.* 1998), promovida tanto por indígenas pré-históricos (Barbosa & Schimtz 2008) como atuais (Mistry *et al.* 2005).

Estudos ecológicos tem demonstrado diferentes resultados sobre o efeito do fogo em comunidades de vertebrados e invertebrados no Cerrado. Por exemplo, comunidades de lagartos parecem sofrer nenhuma (Costa 2011) ou pouca (Pantoja 2007) influência do fogo na composição e riqueza de espécies. Por outro lado, comunidades de aranhas (Freire 2010) e pequenos mamíferos (Briani *et al.* 2004; Henriques *et al.* 2007; Vieira & Marinho-Filho 1998) parecem ser mais sensíveis quando seus habitats são alterados pela presença de fogo. Apesar de haver um número razoável de estudos ecológicos sobre o efeito de queimadas sobre comunidades naturais do Cerrado, estudos históricos de genética demográfica e filogeografia parecem não dar atenção ao efeito do fogo sobre a estruturação geográfica, diversificação genética e evolução de diferentes grupos biológicos (e.g. Guarnizo *et al.* 2016; Nascimento *et al.* 2011, 2012). Sob uma perspectiva temporal, é possível supor que a presença do homem pré-histórico e sua prática de produzir fogo há cerca de 13.000/11.000 anos atrás (Barbosa & Schimtz 2008; Bueno *et al.* 2013), bem como a existência do Cerrado e registros de fogo há cerca de 32.000 anos atrás (Ledru 2002), também seriam fatores que explicitamente exerceriam pressão sobre a biota e poderiam levar ao surgimento de diferentes tendências históricas de diversificação genética e evolução dos organismos.

Calomys tener é um roedor cricétido amplamente distribuído em áreas de campo do Cerrado (Bonvicino *et al.* 2008) e áreas alteradas de biomas adjacentes, como Mata Atlântica. Este roedor pertence a tribo Phyllotini que por sua vez compreende gêneros e espécies estritamente relacionados com habitats de formações abertas, como savanas e campo (Salazar-Bravo *et al.* 2013). Estudos ecológicos

indicam que populações de *C. tener* aumentam sua abundância em áreas de campo e Cerrados que sofreram queimadas recentes (Vieira & Marinho-Filho 1998) ao passo que diminuem em densidade em áreas com sucessão ecológica mais avançada após o evento de queimadas (Briani *et al.* 2004; Henriques *et al.* 2007). Além disso, observações pessoais sugerem que em levantamento de espécies de pequenos mamíferos, *Calomys* é frequentemente capturado em áreas recentemente queimadas e alteradas por ação antrópica (Machado, Rocha e Marinho-Filho, observações pessoais). Neste contexto, *C. tener* é um organismo interessante para se avaliar os efeitos ecológicos e históricos da presença de fogo no Cerrado, bem como sua relação com a ocupação do homem pré-histórico e suas possíveis influências sobre a biota do Cerrado

O objetivo do presente estudo foi aplicar métodos filogenéticos, filogeográficos coalescentes e ferramentas de computação bayesiana aproximada (*ABC* - Beaumont *et al.* 2002) para testar se a ocupação humana e a ocorrência de fogo no Cerrado tiveram papéis determinantes para a diversificação de *C. tener*. Explicitamente serão testadas as hipóteses de que (i) a presença de fogo e um ambiente de Cerrado (similar com ao atual) há cerca de 32.000 anos atrás permitiu a expansão demográfica de *C. tener*; e (ii) a ocupação de indígenas pré-históricos e a utilização do fogo por volta de 12.000 anos atrás foi um fator que acelerou a expansão demográfica de *C. tener*. Como hipóteses nulas, previmos que populações ancestrais de *C. tener* mantiveram-se constantes ao longo do tempo, e/ou outros eventos como aquecimento da temperatura e aumento de úmidade (como ocorrido no último máximo interglacial) afetaram a demografia de *C. tener*.

Materiais e métodos

Amostras, procedimentos de laboratório e tratamento das sequências

Foram utilizados 46 tecidos de espécimes de *C. tener* provenientes de 24 localidades inseridas no bioma Cerrado (Figura 1.3). Estas amostras foram obtidas a partir de expedições a campo realizadas durante os anos de 2014 e 2015 e de doações de colegas pesquisadores e coleções científicas de outras instituições do Brasil. Uma lista com o número de tombamento e/ou número de coleta de campo, localidade de coleta e coordenadas geográficas é fornecida no anexo 1.3. Além do conjunto de

dados gerados a partir dessas amostras, foram obtidas dez sequências do gene *cyt-b* de espécimes de *C. tener* depositadas no GenBank (plataforma online e repositório de dados moleculares) (Anexo 1.3). Os táxons *Calomys expulsus*, *C. tocantinsi* e *C. callosus* foram utilizados como grupos externos para as reconstruções filogenéticas (Anexo 1.3). Esta amostragem contempla espécies do mesmo clado e de outros mais distantes em relação a *C. tener*.

O DNA das amostras foi extraído utilizando o método de fenol-clorofórmio e a qualidade das extrações foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foram amplificadas 700 pares de bases (pb) do gene mitocondrial *citocromo b* (*cyt-b*; Smith & Patton, 1993) e dois introns nucleares: intron 7 do *beta fibrinogênio* (Bfib; ~640 pb; Wickliffe *et al.* 2003) e intron 2 do gene *álcool desidrogenase 1* (ADH; ~520 pb; Amman *et al.* 2006). As sequências dos *primers* utilizados e respectivas referências são apresentadas no anexo 2.3.

As reações de amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) dos marcadores selecionados foram realizadas em um volume final de 15 µl utilizando-se 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA, e ciclos de temperatura compostos por um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 45 seg, 48-56 °C (conforme a temperatura de anelamento de cada *primer*) por 45 seg e 72 °C por 45 seg, finalizando com uma etapa de extensão à 72 °C por 10 min. Pequenas adequações foram realizadas neste protocolo padrão para algumas amostras e espécies, conforme a necessidade.

Os produtos resultantes da PCR foram purificados com enzimas *ExoSap* (USB Corporation) e sequenciados pelo método Sanger na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea) e no Centro de Genômica do Distrito Federal, localizado na Universidade Católica de Brasília. As sequências foram editadas no programa GENEIOUS 6.1 (Biomatters) e a fase gamética dos marcadores nucleares estimada pelo algoritmo PHASE (Stephens *et al.* 2001) implementado no programa DNASP 5.10 (Librado & Rozas 2009).

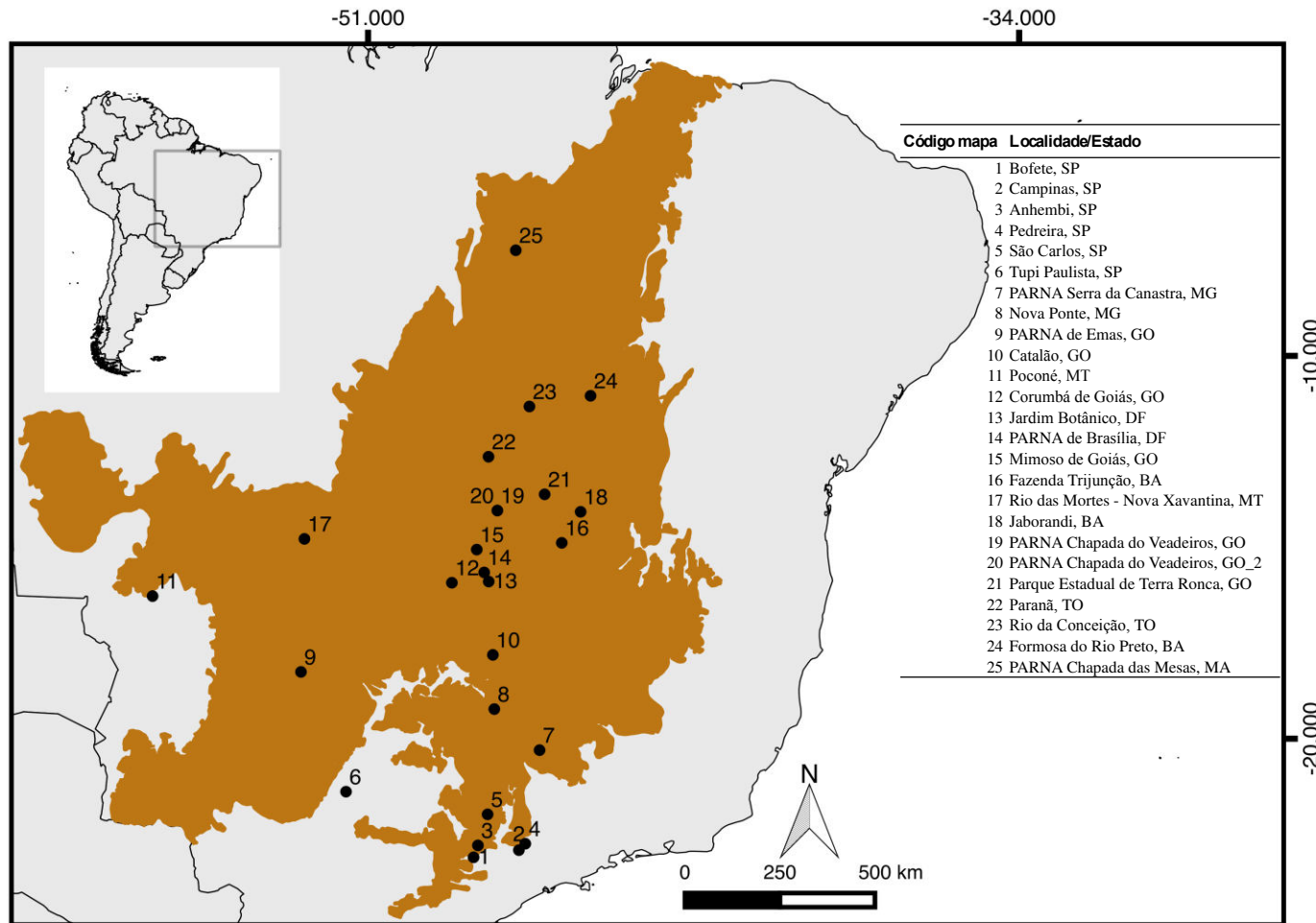


Figura 1.3: Mapa destacando a região do Cerrado e localidades de coleta de espécimes de *Calomys tener* utilizados nas análises.

Alinhamento das sequências e determinação dos modelos de evolução

O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo Muscle (Edgar 2004) e implementado no programa MEGA V. 5 (Tamura *et al.* 2011). Modelos de evolução nucleotídica de cada marcador molecular foram estimados no programa jModelTest 2 (Darriba *et al.* 2012) utilizando o critério de informação de Akaike. Com base nos *scores* de máxima verossimilhança, os modelos mais ajustados aos conjuntos de dados foram HKY (Hasegawa *et al.* 1985) com distribuição gamma (G) para cyt-b e HKY com proporção de sítios invariáveis estimados (I) e distribuição gamma (G) para Bfib e ADH.

Agrupamentos populacionais e árvores de gene

Para verificar se existem agrupamentos populacionais com estruturação genética foi conduzida uma análise de agrupamentos genéticos no programa Bayesian model-based approach- BAPS v 6 (<http://www.helsinki.fi/bsg/software/BAPS/>) utilizando o algoritmo *clustering with linked loci* (Corander *et al.* 2008). Foi utilizado um vetor como número mínimo de K (número de populações) de 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3, indicando que foram executadas 12 rodadas entre quatro réplicas de valores de K distintos.

A relação entre os haplótipos dos conjuntos de dados mitocondrial e nucleares foi inferida através da construção de redes de haplótipos. Para isso foi utilizado o algoritmo median-joining (Bandelt *et al.* 1999) implementado no programa POPART 1.7 (Leigh & Bryant 2015).

Análises filogenéticas sob uma abordagem bayesiana foram implementadas para cada conjunto de dados separadamente (cyt-b, Bfib e ADH). Estas análises foram realizadas numa perspectiva exploratória, de forma a encontrar agrupamentos filogenéticos que indiquem estruturação genética e geográfica. Para isso utilizou-se o programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) versão 3.2.2 (disponível em <http://mrbayes.sourceforge.net>). Os resultados das estimativas de modelos de evolução nucleotídicas provenientes do jModelTest2 foram utilizados como *priors* nas inferências bayesianas. Valores de frequência de bases e taxas de substituição nucleotídica foram ajustados como valores iniciais em uma distribuição *Dirichlet*, enquanto parâmetros de *gamma shape* e proporção de sítios invariáveis foram ajustados como fixos. Foram implementadas duas cadeias de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 10 milhões de gerações cada e amostragens a cada 1000

gerações. O programa TRACER v1.3 (Rambaut & Drummond 2007) foi usado para verificar a convergência dos valores de máxima verossimilhança e valores de tamanho efetivo das amostragens ($ESS > 200$). Ao final, 25% das árvores amostradas foram descartadas como “burn-in” e um filograma foi construído utilizando apenas nós retidos em no mínimo 50% das amostragens.

Árvore de espécies, datação molecular e inferências demográficas

Uma estimativa de árvore de espécies utilizando os três marcadores genéticos foi conduzida no programa BEAST 2 (Bouckaert *et al.* 2014) com o algoritmo do pacote *BEAST (Heled & Drummond 2010) e utilizando como grupos externos as espécies *C. tocantinsi* e *C. expulsus*. Uma taxa de mutação fixa de 2% a cada um milhão de anos foi associada ao gene *cyt-b* utilizando relógio molecular estrito. Esta taxa de mutação é estimada como uma média para o genoma mitocondrial de várias linhagens de mamíferos (Kumar & Subramanian 2002) e utilizada em outros trabalhos de evolução e biogeografia de pequenos mamíferos neotropicais (e.g. Gutiérrez *et al.* 2014). Para os demais genes também foi utilizado o relógio molecular estrito porém permitindo uma estimativa de suas taxas de mutação. Utilizou-se um modelo de evolução nucleotídica para cada partição (sequências de cada gene) de acordo com os modelos ótimos estimados no programa jModelTest. A árvore de espécies foi estimada com tamanho de população linear ao longo do tempo, utilizando o *prior coalescent constant population* e a taxa de mutação de cada gene (menos *cyt-b*) estimada a partir de uma distribuição log-normal com média 1.0 e desvio padrão 1.25. Demais parâmetros foram mantidos no *default* do programa seguindo as recomendações constantes em seu manual. Esta análise foi ajustada para 100.000.000 de simulações de MCMC com amostragens a cada 10.000 gerações. A convergência das amostragens e valores de *ESS* foram visualizada no programa TRACER v1.3 (Rambaut & Drummond 2007). Foram implementadas duas corridas desta análise a fim de verificar a convergência dos resultados. Os arquivos das corridas independentes (arquivos .log) foram combinados no programa LogCombiner e sumarizadas no programa TreeAnnotator, onde 20% das primeiras árvores amostradas foram descartadas como “burn-in”.

Para se verificar sinais de alterações demográficas ao longo do tempo foram utilizadas as estatísticas *D* de Tajima (Tajima 1989) e *R₂* de Ramos-Onsins e Rozas (Ramos-Onsins & Rozas 2002), que testam desvios da neutralidade com base na

frequências de mutações, e F_s de F_u (Fu 1997) com base na frequência de haplótipos. Estas estatísticas foram estimadas no programa DNASP v5.10 (Librado & Rozas 2009) em simulações coalescentes de 10.000 replicações para determinar valores de probabilidade ($P < 0,05$ considerado significativo) de cada estatística. Além disso, a história demográfica de *C. tener* também foi investigada utilizando a análise Bayesian Skyline Plots (BSP) implementada no programa BEAST 2. Para esta análise foram utilizadas apenas as sequências de cyt-b, sendo que a taxa de mutação, modelos de evolução e os *priors* utilizados foram os mesmos daqueles utilizados na inferência da árvore de espécies. Esta análise foi implementada com 100.000.000 de simulações de MCMC com amostragens a cada 10.000 gerações, e a convergência entre as cadeias e valores de *ESS* foram verificadas no programa TRACER v1.3, que também foi utilizado para construir os gráficos BSPs.

Modelos demográficos e cálculos bayesianos aproximados (ABC)

Cinco modelos demográficos foram testados (Figura 2.3) no programa DIYABC (Cornuet *et al.* 2014), que infere processos demográficos sob uma perspectiva de cálculos bayesianos aproximados (Beaumont *et al.* 2002). Os dois primeiros modelos consideram populações de *C. tener* tanto grande como pequena e constantes ao longo do tempo. Outros dois modelos foram gerados considerando crescimento demográfico no começo do Holoceno (12,000 anos atrás), no mesmo tempo em que há os primeiros registros do estabelecimento humano na região do Cerrado (Barbosa & Schimtz 2008); e crescimento demográfico mais antigo (32,000 anos atrás), de acordo com registros palinológicos de expansão do Cerrado e presença de fogo (Ledru *et al.* 2002). O último cenário, um modelo prevendo crescimento demográfico de *C. tener* num clima mais quente e úmido durante o último máximo interglacial (*LIG*) (150,000 anos atrás) foi gerado como hipótese alternativa aos modelos 1 e 2. Sequências de todos marcadores foram utilizadas, implementando como *priors* os modelos indicados pelo jModeltest. Todos os parâmetros disponíveis de sumário estatístico foram selecionados e três milhões de simulações foram geradas para cada modelo. As probabilidades posteriores dos parâmetros (valores do sumário estatístico) foram estimadas de acordo com o algoritmo de regressão linear logística indicando quais cenários demográficos se ajustam melhor ao conjunto de dados.

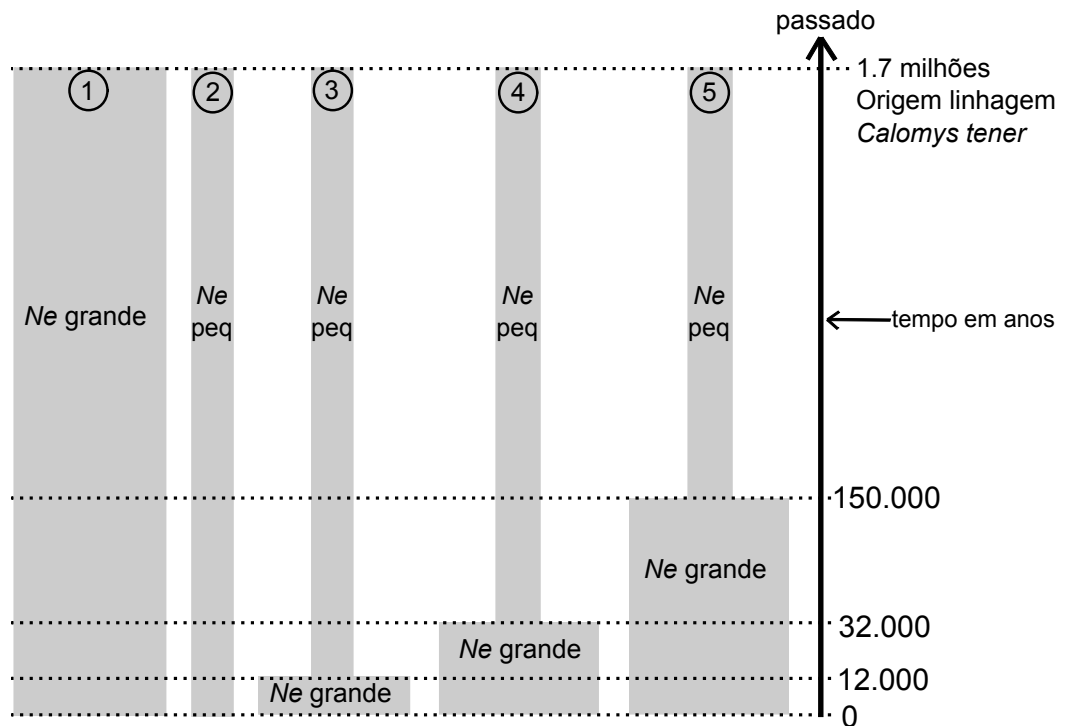


Figura 2.3: Modelos demográficos históricos de populações de *C. tener* testados no programa DIYABC. 1) população grande sem alteração demográfica ao longo do tempo; 2) população pequena sem alteração demográfica; 3) expansão demográfica no começo do Holoceno coincidindo com ocupação humana e registro de fogo no Cerrado – clima seco; 4) expansão demográfica há 32.000 anos atrás devido a existência de um Cerrado antigo frequentemente atingido por fogo – clima seco; 5) expansão demográfica a partir do último máximo interglacial, modelo alternativo – clima quente e úmido. N_e = tamanho da população efetiva. Tempo fora de escala.

Resultados

A análise de estruturação genética implementada no programa BAPS utilizando 56 sequências de *cyt-b* resultou na estimativa de apenas um conjunto genético, abrangendo todas as sequências de *C. tener*.

As redes de haplótipos (Figura 3.3) construídas com base nos genes *cyt-b* e *ADH* demonstraram baixo número de haplótipos e sem uma estruturação geográfica evidente. A rede de haplótipo com base em dados do *Bfib* demonstrou maior número de haplótipos, porém igualmente sem estruturação geográfica evidente.

As análises filogenéticas com base nas 56 sequências do gene *cyt-b* de *C. tener* indicou monofiletismo da espécie com alta probabilidade posterior ($pp=1$) (Figura 4.3). A filogenia com base em sequências do intron *ADH* também indicou alta probabilidade para o monofiletismo de *C. tener*, enquanto que a árvore resultante da análise do *Bfib* demonstrou baixa probabilidade. Todas as análises demonstraram baixa resolução dentro do clado que abrange os espécimes de *C. tener*, resultando em politomias.

A análise Bayesian Skyline Plots com base em sequência do gene *cyt-b* indicou crescimento demográfico de *C. tener* a partir de 200.000 anos atrás (Figura 5.3), enquanto que todos os testes estatísticos indicaram desvios do modelo neutro de populações para os marcadores *cyt-b* e *ADH* com valor de probabilidade significativos (Tabela 1.3). A árvore de espécies e datação molecular estimou a origem da linhagem de *C. tener* em torno de 1,7 milhões de anos atrás (Figura 6.3). Os cálculos bayesianos aproximados implementados no DIYABC indicaram cenários em épocas com presença de fogo e ocupação humana (modelos 3 e 4, 77% de explicação em conjunto) (Figura 7.3) como melhores explicações para o processo de expansão demográfica de *C. tener*. Dentre os dois modelos, o quarto modelo foi indicado como cenário mais provável, 41% de explicação, entre os cinco modelos testados. O modelo de número 3 apresentou 36% de probabilidade posterior para explicar a expansão demográfica de *C. tener*.

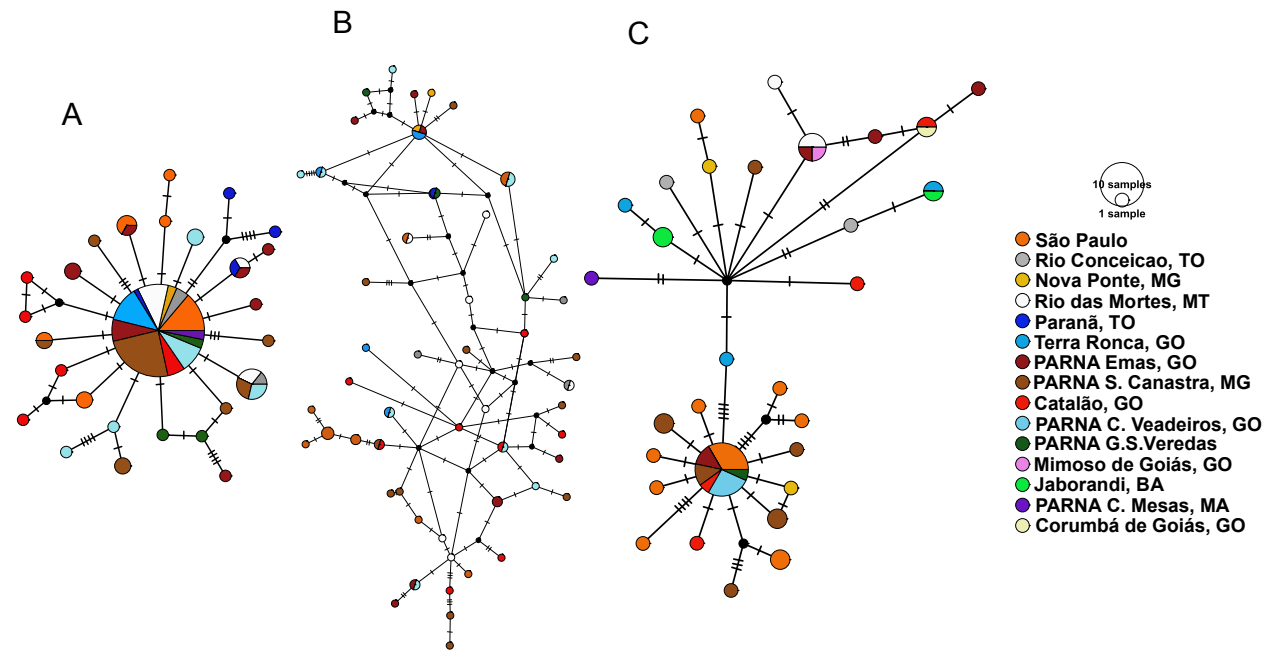


Figura 3.3: Redes de haplótipos com base nos marcadores ADH (A), Bfib (B) e cyt-b (C). Cada círculo representa um haplótipo. Quanto maior o tamanho do círculo maior o número de amostras apresentando o mesmo haplótipo. Cores representam localidades de coleta de acordo com a legenda a direita. Traços nos braços que ligam haplótipos representam números de mutações

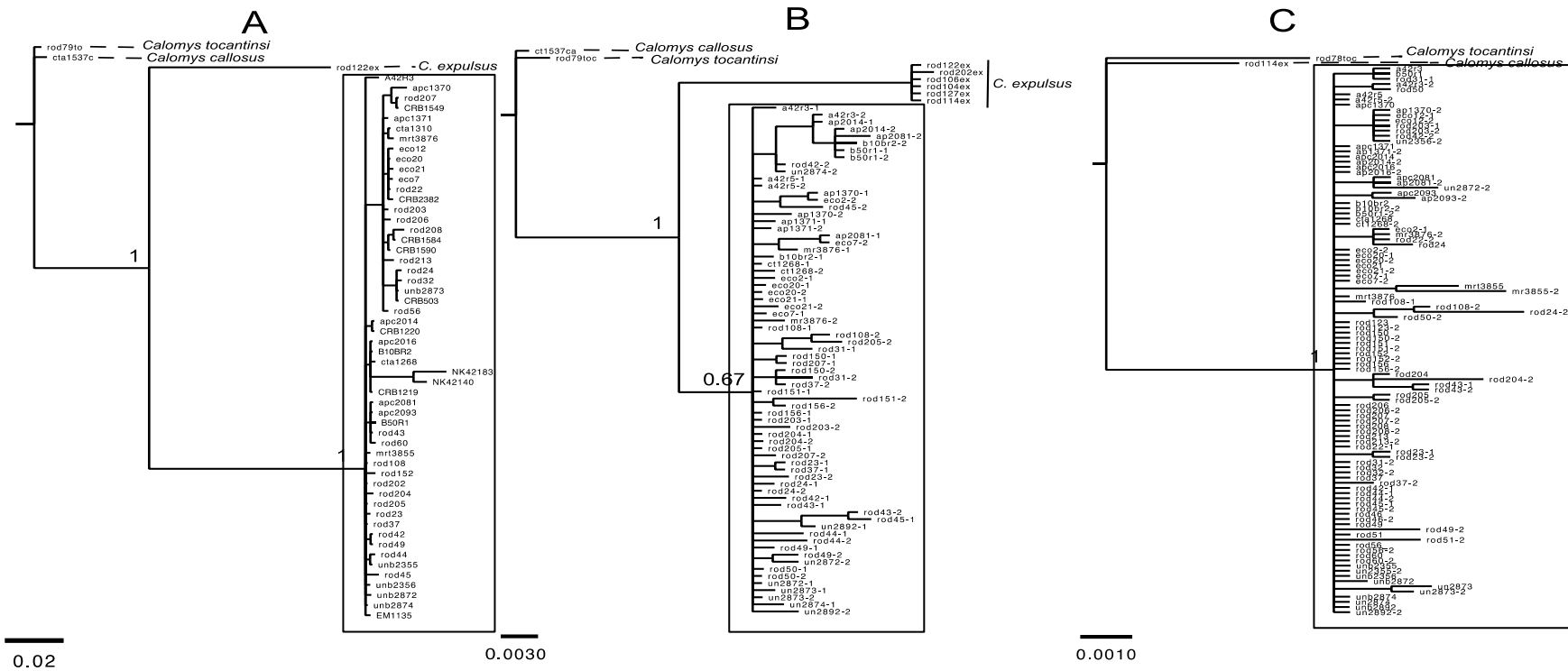


Figura 4.3: Filogenias resultantes da análise bayesianas com base em sequências do cyt-b (A), ADH (B) e Bfib (C). Retângulos indicam exemplares de *Calomys tener* (grupo interno). Probabilidade posterior (pp) para o monofiletismo de *C. tener*: pp=1 para cyt-b e ADH e pp=0.67 Bfib.

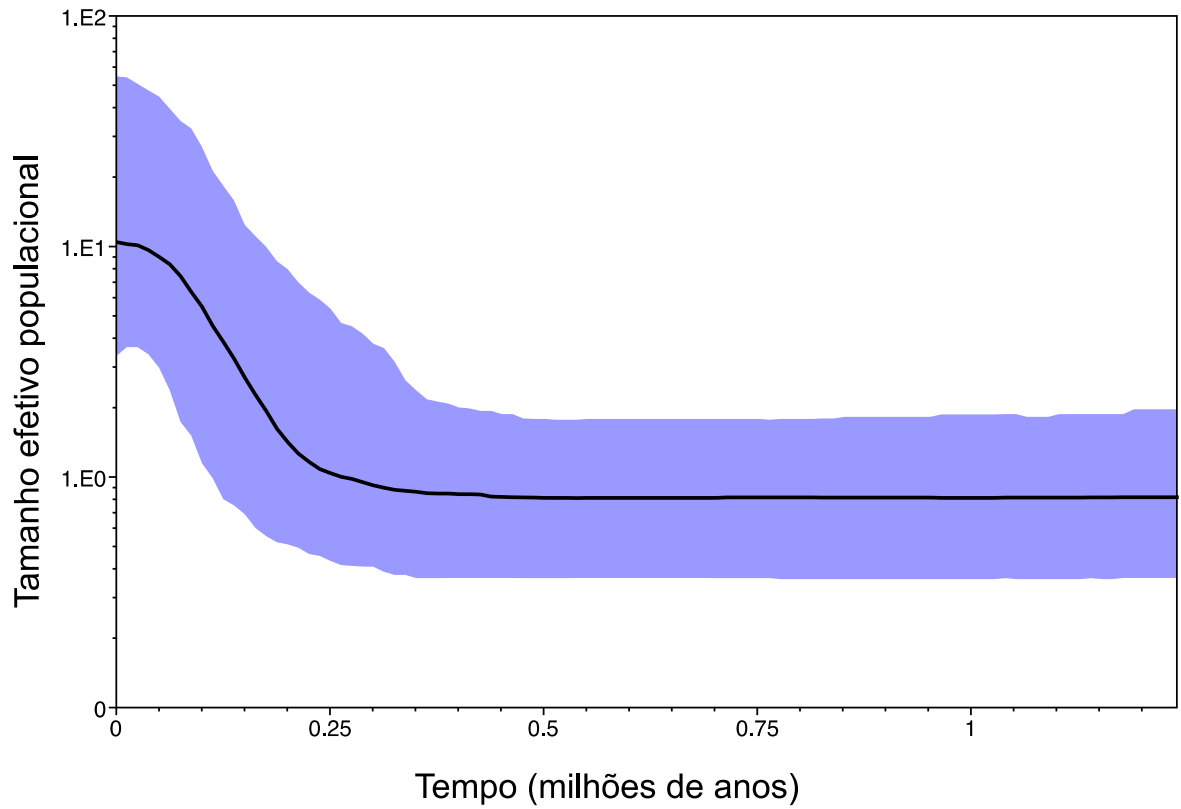


Figura 5.3: Tamanho efetivo populacional através do tempo estimado com sequências do *cyt-b* de *C. tener* com base em Bayesian Skyline Plots. Área em azul representa intervalo de 95% de HPD.

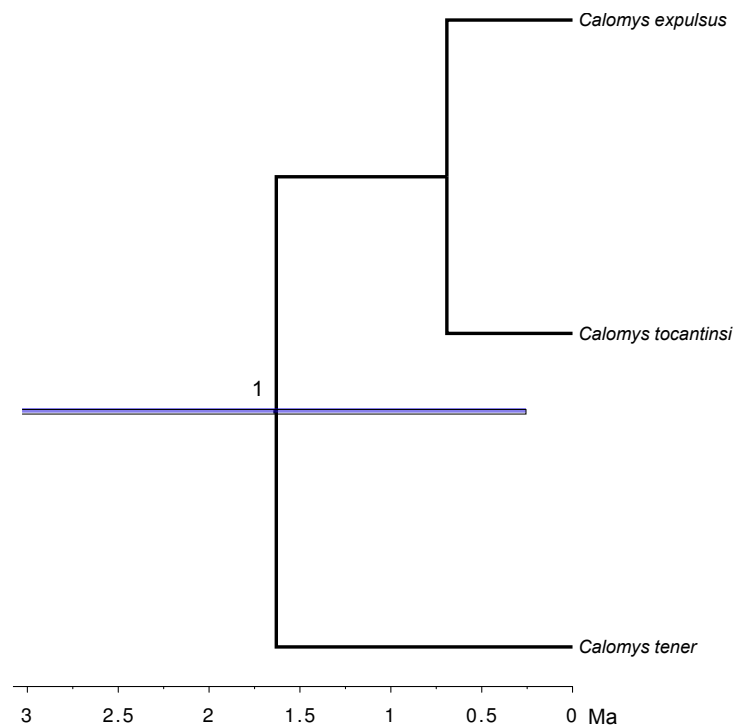


Figura 6.3: Árvore de espécies utilizando sequências de todos os marcadores (cyt-b, ADH e Bfib) e datação molecular. Número próximo ao nó significa probabilidade posterior. Probabilidade abaixo de 0,9 não apresentada.

Tabela 1.3: Valores das estatísticas D de Tagima, F_s de Fu e R_2 de Ramos-Onsins e Rozas, que testam desvios do modelo neutro de evolução. Asterisco indica probabilidade $< 0,05$.

Gene	D	F_s	R_2
Cyt-b	-1.58*	-17.31*	0.05*
ADH	-2.57*	-29.33*	0.02*
Bfib	-1.05	-64.01	0.06*

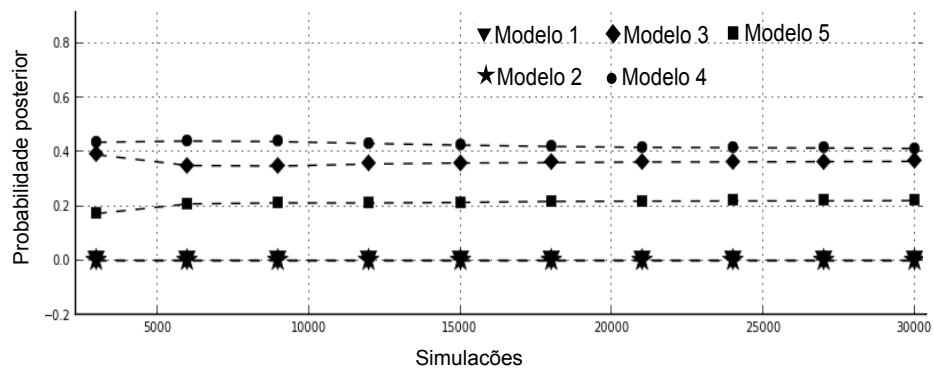


Figura 7.3: *Plots* do algoritmo de regressão logística para cada cenário demográfico estimado no programa DIYABC. Modelos 3 e 4 com maiores valores de probabilidade posterior.

Discussão

Nenhuma análise implementada no presente estudo demonstrou algum tipo de estruturação geográfica ou genética em populações de *C. tener*. Assim, pode-se sustentar que esta espécie é resultante de uma radiação rápida, onde uma linhagem expande sua distribuição geográfica em um curto espaço de tempo. Alternativamente, é possível sugerir que contatos secundários possam ter ocorrido entre populações anteriormente isoladas reestabelecendo assim o fluxo gênico. Ambos cenários evolutivos podem ser explicados da seguinte forma com base nos resultados obtidos no presente estudo: a linhagem de *C. tener* surgiu por volta de 1,7 milhões de anos atrás derivada de um ancestral adaptado para viver em habitats abertos (assim como todos os representantes da tribo Phyllotini – Salazar-Bravo *et al.* 2013); (1) ocupou a região atual do Cerrado com baixa densidade populacional até a intensificação das queimadas (32.000 anos atrás, Ledru 2002) e a presença do homem há 12.000 anos atrás (Barbosa & Schmitz 2008) que permitiram uma colonização rápida de novos habitats disponíveis; ou (2) ocupou a região atual do Cerrado em várias populações isoladas e a intensificação de queimadas (32.000 anos atrás, Ledru 2002) e a presença do homem (12.000 anos atrás, Barbosa & Schmitz 2008) permitiu a conexão dos habitats propícios para a ocorrência de *C. tener*, reestabelecendo o fluxo gênico entre as populações.

Não existem estudos biogeográficos de vertebrados no Cerrado que testem a influência de queimadas e a presença humana como fatores determinantes para a diversificação dos organismos. Este assunto parece ser subestimado frente a diversos indicadores de que queimadas naturais e provocadas pelo homem tem papel determinante como força evolutiva (Bond & Keeley 2005; Keeley *et al.* 2011). No Brasil, pesquisas indicam que organismos vegetais com especiação *in situ* no Cerrado demonstram adaptações fisiológicas e anatômicas para tolerar o stress de queimadas (Simon & Pennington 2012). Além disso, a própria fisionomia da paisagem do Cerrado é dramaticamente alterada sob diferentes regimes de queima (Coutinho 1982; Eiten 1972; Oliveira-Filho & Ratter 2002). Diante do efeito do fogo, vertebrados exibem diferentes respostas ecológicas em termos de composição e abundância de espécies (Briani *et al.* 2004; Henriques *et al.* 2007; Pantoja 2007). Em uma perspectiva histórica, o fogo tem efeito direto na evolução e distribuição de mamíferos pastadores em áreas de campos e pradarias (Anderson 2006). Adicionalmente, o componente antrópico é outro causador de fogo que deve ser

mencionado, visto que a produção de fogo é uma das primeiras ferramentas que humanos pré-históricos utilizaram para alterar seus habitats (Bowman *et al.* 2011). Em savanas da Austrália há registros de uso do fogo pelo povo aborígine desde 4.000 anos atrás (Bowman 1998), enquanto no Brasil povos indígenas queimam áreas naturais até os dias de hoje (Mistry *et al.* 2005). Neste contexto, é certo que a influência do fogo sobre os organismos distribuídos no Cerrado não pode ser ignorada em estudos biogeográficos históricos.

Uma série de estudos que propõem cenários paleoambientais com base em registros palinológicos, de carvão vegetal e arqueológicos estão disponíveis. Como exemplo, Behling (1995, 2003) sugere que no começo do Holoceno uma região a apenas 250 km da costa do Brasil era caracterizada por formação vegetal savânica e frequentemente atingida por fogo. Bueno *et al.* (2013) por sua vez, indicam uma série de sítios do Brasil central com registros de assentamentos de humanos pré-históricos e registros de carvão vegetal desde o final do Pleistoceno até o Holoceno recente. Na mesma direção, Gouveia *et al.* (2002) sugerem a ocorrência frequente de fogo numa região do centro-oeste do Brasil durante o Holoceno médio, enquanto que ao norte do Maranhão uma vegetação de savana e registro de fogo são conhecidos durante o Holoceno tardio/médio (Pessenda *et al.* 2004). Essa fração de estudos selecionados demonstram uma série de registros de fogo e ocupações humanas pré-históricas que faziam uso de queimadas durante o final do Pleistoceno e durante todo Holoceno. Frente a tais evidências, é razoável que a ocorrência de fogo deva ser levada em conta para a formulação de hipóteses sobre história demográfica e biogeografia histórica de organismos de diversificação recente, assim como realizado no presente estudo.

Um conjunto de evidências obtidas no presente estudo sugerem que *C. tener* teve um aumento demográfico considerável durante o Quaternário tardio. Sugere-se que a presença de fogo no Cerrado em períodos secos e a presença humana neste bioma possam ter sido fatores determinantes para o crescimento demográfico da espécie. Por fim, chama-se a atenção de que este é o primeiro estudo a testar modelos demográficos, com base em métodos de ABC, em conjunto como o potencial efeito de queimadas sobre a evolução de pequenos mamíferos no Cerrado. Fenômenos associados a atividade humana, como as queimadas em regiões naturais suscetíveis, como o Cerrado, e a presença de tribos humanas pré-históricas devem ser considerados em hipóteses biogeográficas históricas.

Referências bibliográficas

- Amman, B. R., Hanson, J. D., Longhofer, L. K. & Bradley, R. D. (2006). Intron 2 (ADH1-I2) of the alcohol dehydrogenase gene: a nuclear DNA marker for mammalian systematics. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, 256, 1–16.
- Anderson, R. C. (2006). Evolution and origin of the Central Grassland of North America: climate, fire, and mammalian grazers. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 133, 626–647.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Barbosa, A. S., & Schimitz, P. I. (1998). Ocupação indígena no Cerrado: esboço de uma história. In S. SANO & S. ALMEIDA (Eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Brasília: EMBRAPA–CPAC, 3-45.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate bayesian computation in population Genetics. *Genetics*, 162, 2025–2035.
- Behling, H. (1995). A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil: vegetation, climate and fire history. *Journal of Paleontology*, 14, 253–268.
- Behling, H. (2003). Late glacial and Holocene vegetation, climate and fire history inferred from Lagoa Nova in the southeastern Brazilian lowland. *Vegetation History Archaeobotany*, 12, 263–270.
- Bond, W. J., & Keeley, J. E. (2005). Fire as a global “herbivore”: the ecology and evolution of flammable ecosystems. *TRENDS in Ecology and Evolution Vol.20*, 20, 387–394.
- Bonvicino, C. R., Oliveira, J. A. D. & D’Andrea, P. S. (2008). *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS, 120.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kuhnert, D., Vaughan, T., Wu, C., Xie, D., ... Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *Plos Computational Biology*, 10, 1–6.
- Bowman, D. M. J. S. (1998). Tansley Review No. 101. The impact of Aboriginal landscape burning on the Australian biota. *New Phytologist*, 140, 385–410.
- Bowman, D. M. J. S., Balch, J., Artaxo, P., Bond, W. J., Cochrane, M. A., Antonio, C. M. D., ... Swetnam, T. W. (2011). The human dimension of fire regimes on

- Earth. *Journal of Biogeography*, 38, 2223–2236.
- Briani, D. C., Palma, A. R. T., Vieira, E. M., & Henriques, R. P. B. (2004). Post-fire succession of small mammals in the Cerrado of central Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 13, 1023–1037.
- Bueno, L., Dias, A. S., & Steele, J. (2013). The late Pleistocene/early Holocene archaeological record in Brazil: a geo-referenced database. *Quaternary International*, 301, 74–93.
- Cole, M. M. (1960). Cerrado, Caatinga and Pantanal: the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. *The Geographical Journal*, 126, 168–179.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., & Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–14.
- Cornuet, J., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., ... Estoup, A. (2014). DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30, 1187–1189.
- Costa, B. M. (2011). *Queimadas e lagartos do Cerrado: efeitos diretos e indiretos*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília - Distrito Federal.
- Coutinho, L. M. (1982). Fire in the Ecology of the Brazilian Cerrado. In J. G. Goldammer (Ed.), *Fire in the Tropical Biota: Ecosystem Processes and Global Challenges* (pp. 82–105). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 32, 1792–1797.
- Eiten, G. (1972). The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38, 201–341.
- Freire, G. de B. (2010). *A influência de diferentes regimes de queima sobre a comunidade de aranhas cursoriais do cerrado de Brasília/DF*. Tese. Universidade de Brasília.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Gouveia, S. E. M., Pessenda, L. C. R., Aravena, R., Boulet, R., Scheel-Ybert, R., Bendassoli, J. A., ... Freitas, H. A. (2002). Carbon isotopes in charcoal and soils

- in studies of paleovegetation and climate changes during the late Pleistocene and the Holocene in the southeast and centerwest regions of Brazil. *Global and Planetary Change*, 33, 95–106.
- Guarnizo, C. E., Werneck, F. P., Giugliano, L. G., Santos, M. G., Fenker, J., Sousa, L., ... Colli, G. R. (2016). Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 279–289.
- Gutiérrez, E. E., Anderson, R. P., Voss, R. S., Ochoa-G, J., Aguilera, M., & Jansa, S. A. (2014). Phylogeography of *Marmosa robinsoni*: insights into the biogeography of dry forests in northern South America. *Journal of Mammalogy*, 95, 1175–1188.
- Hasegawa, M., Kishino, K., & Yano, T. (1985). Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160–174.
- Heled, J., & Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570–580.
- Henriques, R. P. B., Briani, D. C., Palma, A. R. T., & Vieira, E. M. (2007). A simple graphical model of small mammal succession after fire in the Brazilian cerrado/Un modèle graphique simple de repeuplement par les petits mammifères du cerrado brésilien après brûlis, 70, 226–230.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G., Rundel, P. W., Bond, W. J., & Bradstock, R. A. (2011). Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in Plant Science*, 16, 406–411.
- Kumar, S., & Subramanian, S. (2002). Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of National Academy Society*, 99, 803–808.
- Ledru, M.-P. (2002). Late Quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. In S. O. Oliveira & R. J. Marquis (Eds.), *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (pp. 33–50). New York, NY.
- Ledru, M.-P., Salgado-labouriau, L., & Lorscheitter, L. (1998). Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yr B.P. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99, 131–142.

- Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5 : a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Mistry, J., Berardi, A., Andrade, V., Txicaprô, K., Phocrok, K., & Leonardos, O. (2005). Indigenous Fire Management in the cerrado of Brazil: The Case of the Krahô of Tocantins. *Human Ecology*, 33, 365–386.
- Nascimento, F. F. Do, Pereira, L. G., Geise, L., Bezerra, A. M. R., D’Andrea, P. S., & Bonvicino, C. R. (2011). Colonization process of the Brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): a biogeographic hypothesis. *The Journal of Heredity*, 102, 260–268.
- Nascimento, F. F., Lazar, A., Menezes, A. N., Durans, A. D. M., Moreira, J. C., Salazar-Bravo, J., ... 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*, 8, 1–13.
- Oliveira-Filho, A. T., & Ratter, J. T. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora o the cerrado biome. In P. S. Oliveira & R. J. Marquis (Eds.), *The Cerrados of Brazil, ecology and natural history of a neotropical savanna* (pp. 91–120). New York, NY: Columbia University Press.
- Pantoja, D. L. (2007). *Efeitos do fogo sobre a taxocenose de lagartos em áreas de Cerrado*. Tese. Universidade de Brasília.
- Pessenda, L. C. R., Ribeiro, A. de S., Gouveia, S. E. M., Aravena, R., Boulet, R., & Bendassolli, J. A. (2004). Vegetation dynamics during the late Pleistocene in the Barreirinhas region, Maranhão State, northeastern Brazil, based on carbon isotopes in soil organic matter. *Quaternary Research*, 62, 183–193.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer. Ver. 1.4. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 1 November 2013)
- Ramos-Onsins, S. E. & Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 2092–2100.
- Salazar-Bravo, J., Pardiñas, U. F. J., & D’Elía, G. (2013). A phylogenetic appraisal of Sigmodontinae (Rodentia, Cricetidae) with emphasis on phyllotine genera: systematics and biogeography. *Zoologica Scripta*, 42, 250–261.
- Simon, M. F., & Pennington, T. (2012). Evidence for adaptation to fire regimes in the

- tropical savannas of the Brazilian Cerrado. *International Journal of Plant Sciences*, 173, 711–723.
- Smith, M. F., & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50, 149–177.
- Stephens M, Smith N. J., & Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68, 978–989.
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Vieira, E. M., & Marinho Filho, J. (1998). Pre- and post-fire habitat utilization by rodents of Cerrado from central Brazil. *Biotropica*, 30, 491–496.
- Wickliffe, J. K., Hoffman, F. G., Carroll, D. S., Dunina-Barkovskaya, Y. V., Bradley, R. D. & Baker, R. J. (2003). Intron 7 (Fgb-i7) of the Fibrinogen, B Beta Polypeptide (Fgb): a nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, 219, 1–6.

Anexo 1.3: Lista dos exemplares de *C. tener* utilizados nas análises incluindo a identificação da amostra (número de tombo, de coleta ou de acesso ao GenBank), localidade e coordenadas geográficas. São apresentados ainda as informações relativas às espécies utilizadas como grupo externo.

Identificação da amostra	Localidade	Estado	Coordenadas	
A42R3	Anhembi	SP	-22.78621	-48.13119
APC1370	Rio da Conceição	TO	-11.32091	-46.78655
APC1371	Rio da Conceição	TO	-11.32091	-46.78655
APC2014	São Carlos	SP	-21.97507	-47.87897
APC2016	São Carlos	SP	-21.97507	-47.87897
APC2081	São Carlos	SP	-21.97507	-47.87897
APC2093	São Carlos	SP	-21.97507	-47.87897
B10BR2	Bofete	SP	-23.10712	-23.10712
B50R1	Bofete,	SP	-23.10712	-23.10712
UFES-CTA 1268	Nova Ponte	MG	-19.22538	-47.703761
UFES-CTA 1310	Nova Ponte	MG	-19.22538	-47.703761
eco12	Rio das Mortes	MT	-14.77937	-52.661249
eco20	Rio das Mortes	MT	-14.77937	-52.661249
eco21	Rio das Mortes	MT	-14.77937	-52.661249
eco07	Rio das Mortes	MT	-14.77937	-52.661249
MRT 3855	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
MRT 3876	Paraná	TO	-12.63331	-47.85550
ROD 108	Fazenda Trijunção	BA	-14.88291	-45.94247
ROD 152	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03844	-47.62379
ROD 202	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03844	-47.62379
ROD 203	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03844	-47.62379
ROD 204	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03844	-47.62379
ROD 205	PARNA Chapada dos Veadeiros	GO	-14.03844	-47.62379
ROD 206	Parque Estadual Terra Ronca	GO	-13.61543	-46.38954
ROD 207	Parque Estadual Terra Ronca	GO	-13.61543	-46.38954
ROD 208	Parque Estadual Terra Ronca	GO	-13.61543	-46.38954
ROD 213	PARNA Chapada da Mesas	MA	-7.2402	-47.143
ROD 22	PARNA de EMAS	GO	-18.25405	-52.75162
ROD 23	PARNA de EMAS	GO	-18.25405	-52.75162

Anexo 1.3: Continuação

Número	Localidade	Estado	Coordenadas	
ROD 24	PARNA de EMAS	GO	-18.25405	-52.75162
ROD 32	PARNA de EMAS	GO	-18.25405	-52.75162
ROD 37	PARNA de EMAS	GO	-18.25405	-52.75162
ROD 42	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 43	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 44	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 45	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 49	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 50	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 51	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 56	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
ROD 60	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
UNB2355	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
UNB2356	PARNA Serra da Canastra	MG	-20.29740	-46.52211
UNB2872	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2873	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
UNB2874	Catalão	GO	-17.80908	-47.74128
AF385597	Tupi Paulista	SP	-21.3829	-51.5754
AF385596	Tupi Paulista	SP	-21.3829	-51.5754
DQ447301	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498
DQ447300	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498
DQ447298	Jaborandi	BA	-14.0716	-45.4498
DQ447297	Pedreira	SP	-22.7418	-46.8952
DQ447296	Pedreira	SP	-22.7418	-46.8952
DQ447295	Corumbá de Goiás	GO	-15.9249	-48.8121
DQ447294	Campinas	SP	-22.9098	-47.0625
DQ447302	Mimoso de Goiás	GO	-15.0588	-48.1620
Grupo externo	Número GenBank, tombo ou campo			
<i>Calomys callosus</i>	UFES-CTA 1537			
<i>Calomys tocantinsi</i>	ROD 78, 79			
<i>Calomys expulsus</i>	ROD 114, 122, 106, 104, 127			

Acrônimos Anexo 1: UFES-CTA: coleção de tecidos animais da Universidade

Federal do Espírito Santo; ROD: coleção de tecidos de mamíferos do Laboratório de

Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília; eco: coleção do autor (a ser depositada na Coleção de Mamíferos da UnB); UNB: coleção de mamíferos da Universidade de Brasília; A42R3, B10BR2, B50R1, MRT e APC: caderno de campo de Ana Paula Carmignotto.

Anexo 2.3: Nome e sequências dos iniciadores utilizados no estudo, indicando referências que delinearão os iniciadores.

Primer	Sequência	Referência
ADH2340-I	5' GTAATCAAGTGCAAAGCAGCTG	Amman <i>et al.</i> 2006
ADH2340-II	5' TAACCACGTGGTCATCTGAGCG	Amman <i>et al.</i> 2006
Fgb-17U	5'- GGGGAGAACAGAACCATGACCATCCAC	Wickiffe <i>et al.</i> 2003
Fgb-17L	5'- ACCCAGTAFTATCTGCCATTCGGATT	Wickiffe <i>et al.</i> 2003
MVZ05	5'- CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG	Smith & Patton 1993
MVZ16	5'- AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	Smith & Patton 1993

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados indicam que organismos distribuídos em diferentes fitofisionomias do Cerrado e Caatinga sofreram eventos de diversificação situados em períodos históricos distintos. Por exemplo, eventos cladogenéticos que levaram a episódios de especiação em *Phyllomys* foram reconhecidos durante o Mioceno, Plioceno e Pleistoceno, correspondendo a aproximadamente um período entre 10 milhões e 12 mil anos atrás. Por outro lado, populações de *Gracilinanus agilis* apresentam expansão populacional durante o último 1 milhão de anos, enquanto que populações de *Calomys tener* parecem sofrer eventos de expansão nos últimos 32 mil anos até o presente.

Estes resultados sugerem que as fitofisionomias que formam um mosaico no Cerrado evoluíram de maneira independente ao longo do tempo, indicando que episódios geológicos, climáticos e antrópicos tem implicações particulares para cada fitofisionomia. Tendo em vista que cada fitofisionomia é única em termos de habitats disponíveis, as linhagens de organismos que nelas habitam sofrem de maneira desigual diante das pressões evolutivas. Isto fica mas claro se supormos que as matas de galeria, habitat de espécies de *Phyllomys*, expandiram em momentos históricos mais úmidos, permitindo o contato entre matas de galerias do cerrado e biomas florestais adjacentes e ocasionando trocas faunísticas. As matas secas por outro lado, estão distribuídas em algumas regiões estáveis ao longo do tempo e outras menos estáveis, implicando no isolamento de diferentes populações de *G. agilis* típicas deste ambiente. Por último, eventos de queimadas são mais frequentes em habitats abertos, como os campos e cerrados onde encontram-se populações de *C. tener* e, portanto, um crescimento demográfico nas populações desta espécie, conhecida por colonizr áreas recém queimadas, é esperado a partir do momento em que as queimadas ficaram mais frequentes no Cerrado.

Por fim, a presente tese contribui com novas hipóteses biogeográficas para o Cerrado e Caatinga, algumas das quais implicam em relações com os biomas vizinhos, Amazônia e Floresta Atlântica. Além disso, é proposto que os ambientes considerados secos do interior do Brasil abrigam espécies ainda desconhecidas da ciência, e que a diversidade destes ambientes é apenas marginalmente conhecida. Sendo assim, é demanda evidente que mais estudos biogeográficos, de sistemática e taxonômicos sejam conduzidos nos sistemas naturais do interior do Brasil, principalmente diante do cenário atual de acelerada destruição de habitas e formações naturais.