



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Zoologia**

**Filogeografia e delimitação de espécies do gênero *Clyomys*  
(Rodentia: Echymyidae)**

**Thaiz Armond**

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Brasília – DF

2016

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Zoologia**

**Filogeografia e delimitação de espécies do gênero *Clyomys*  
(Rodentia: Echimyidae)**

**Thaiz Armond**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientadora: Dr. Lilian Gimenes Giugliano

Brasília – DF

2016

“O tempo da genética ultrapassa o tempo da consciência da vida”

Patrícia Paccinini – Exposição ComCiência

## **Agradecimentos**

Bom, o cansaço é grande e a tendinite já está atacada, mas algumas participações foram essenciais para a realização deste mestrado e o esforço para agradecer é o mínimo que eu posso fazer.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da UnB, à CAPES, ao CNPq e à FAPDF, pela estrutura, bolsa e auxílios financeiro para que este projeto tenha sido possível. Agradeço também à Coleção de Mamíferos da UnB, à Coleção de Mamíferos da UFSCar e ao Laboratório de Genética e Biodiversidade da UnB por me cederem as amostras de tecido utilizadas.

Obrigada ao professor Fernando Pacheco Rodrigues, que me deu a oportunidade de fazer o meu mestrado com algo novo para mim, que me ensinou, me orientou e ofereceu o caminho das pedras. Obrigada também à professora Lílian Gimenes Giugliano por ter me aceitado como sua orientanda e por ter me ensinado tantas coisas sobre a genética, a filogeografia, a filogenia, a estatística...

Muito obrigada aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia de Vertebrados, que me apresentaram, me ensinaram ou aprenderam junto comigo sobre o maravilhoso mundo dos pequenos mamíferos. Em especial para Anna Carla Camargo, Anderson Paz, André Mendonça, Camila Moniz, Daniela Behs, Jéssica Luna, Juliana Ribeiro, Nayara Sano, Nícolhas Camargo, Priscilla Zangrandi e Thayse Cazetta. Um agradecimento ainda mais especial ao professor Emerson Monteiro Vieira, por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me ensinado muito sobre este pequeno grande mundo.

Quero agradecer também aos colegas e amigos que compartilharam comigo o outro lado da força, a genética. Muito obrigada ao pessoal do Laboratório de Genética e Biodiversidade, Camila T Pontes, Lílian Nascimento, Leo Machado, Marcela Reis, Nadinne

Guimaraes, Niara Martins, Patricia Sardote, Sarah Borges e Thales Magalhães. Sem esquecer os grupos externos que tanto enriqueceram esse processo, começando pelo grupo dos répteis/anfíbios/peixes e afins: Fênix Pontes, Flávia Soares, Ricardo Mattos, Roger Ledo, Túlio Mozart, Victor Barros, Vitória Hadassa. E também o grupo das aves: Amanda Vaz, Cassia Lima, Diogo Nascimento, Gislaine Fernandes, Nina Freitas, Rosana Rezende, Samira Duarte, Priscila Vaz. Tenho muito a agradecer ao técnico Leandro e aos professores Lilian Giugliano, Fernando Rodrigues e Renato Caparroz.

Aos amigos que estiveram comigo durante todo o processo e sem dúvida o caminho para chegar aqui teria sido bem mais árduo: muito obrigada. André, Anna, Dani, Gislaine (Cidinha), João Lucas, Lud, Nayara, Nina, Rosana... e todos os outros amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu me construísse e pudesse realizar mais essa etapa na minha vida. E um agradecimento muito mais que especial para Flávia e Niara, que me ajudaram muuuuito nessa jornada, sofreram, leram, aprenderam e fizeram esse trabalho junto comigo, não tenho palavras para agradecer e nem gestos para retribuir o que fizeram por mim, muito obrigada de coração.

Por último, e o mais importante, quero agradecer imensamente à minha família que independente das minhas escolhas, certas ou não tão certas, loucas ou sãs, estiveram ao meu lado me apoiando e me dando força para continuar e ir até o fim. Muito obrigada meu sobrinho Antony Juan, minhas irmãs Mel e Carolina Armond, meu filho Cheetos Bolinha, e meus amados pais Fatima Armond e Pierre Armond, esse trabalho foi por vocês.

## Sumário

Agradecimentos.....	4
Sumário.....	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	11
1.1. O Cerrado.....	12
1.2 A genética como ferramenta para a determinação de espécies.....	15
1.3. Diversidade de roedores e a família Echimyidae.....	16
1.4. O gênero <i>Clyomys</i> .....	17
2. Objetivo.....	21
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Obtenção das amostras e extração de DNA.....	21
3.2. Amplificação do DNA.....	22
3.3. Sequenciamento e Alinhamento.....	25
3.4. Análises dos dados.....	25
4. Resultados.....	29
5. Discussão.....	39
6. Considerações Finais.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	45
8. Anexos.....	56

## Lista de Figuras

Figura 1: Mapa de distribuição do bioma Cerrado, evidenciando as áreas remanescentes (em verde) e as áreas desmatadas (em rosa) até 2010. Nos gráficos em forma de pizza são apresentadas as porcentagens das áreas desmatadas e não desmatadas em cada estado brasileiro. Mapa retirado do PPCerrado - Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado: 2ª fase (2014-2015) (MMA, 2014). ..... 13

Figura 2: Foto de indivíduos das espécies *Clyomys laticeps* (A) e *Clyomys bishopi* (B). Fotos: Cibele R. Bonvicino (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008) e J.C. Motta-Junior (BUENO, 2005). ..... 17

Figura 3: Mapa da América do Sul destacando a distribuição do gênero *Clyomys* registrada na International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (região rachurada) e os pontos de coleta de amostras utilizadas neste trabalho (pontos coloridos). ... 18

Figura 4: Grupos formados pelo BAPS com a análise dos genes CytB, COI, GHR, vWF e BFIB. Grupo 1 (laranja) composto pelas localidades Itirapina – SP (ITI) e Itapetininga – SP (ITA); grupo 2 (verde) por Parque Nacional da Chapada dos Guimarães – GO (PNG), Brasília – DF (BSB), Caldas Novas – GO (CAN), Parque Nacional de Emas – GO (PNE); e grupo 3 (azul) por Corumbá – MS (COR). ..... 29

Figura 5: Rede de haplótipos dos genes mitocondriais concatenados. As cores representam as localidades de coleta e os tons representam os grupos dos indivíduos (tons de laranja referem-se às localidades de São Paulo; de verde, à região central do Cerrado; e de azul, à Corumbá). O tamanho dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham, e os ramos estão em proporção ao número de passos mutacionais. .... 32

Figura 6: Rede de Haplótipos dos genes vWF (A) e BFIB (B). As cores representam as localidades de coleta, sendo que os tons representam os clados dos indivíduos (tons de laranja referem-se às localidades de São Paulo, verde à região central do Cerrado e azul à Corumbá). O tamanho dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham e os ramos estão em proporção ao número de passos mutacionais. .... 34

Figura 7: Topologia consenso da análise de máxima verossimilhança com a matriz concatenada de todos os genes. Os valores de suporte dos nós apresentados em porcentagem. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS. As siglas a frente dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta (Itirapina–SP (ITI), Itapetininga–SP (ITA), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães–GO (PNG), Brasília–DF (BSB), Caldas Novas–GO (CAN), Parque Nacional de Emas–GO (PNE) e Corumbá–MS (COR)). ..... 35

Figura 8: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando todos os genes concatenados, com 20 milhões de geração e burn-in de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS. As siglas a frente dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta (Itirapina–SP (ITI), Itapetininga–SP (ITA), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães–GO (PNG), Brasília–DF

(BSB), Caldas Novas–GO (CAN), Parque Nacional de Emas–GO (PNE) e Corumbá–MS (COR)).....36

Figura 9: Árvore de espécies reconstruída no programa \*Beast. Os valores de suporte dos ramos estão apresentados em probabilidade. Calibração secundária no ponto na separação dos gêneros *Clyomys* e *Euryzgomatomys*, média 5,7 e desvio 1 (UPHAM; PATTERSON, 2015). A barra mostra o tempo de divergência dos grupos. O grupo três divergiu em 0,79maa e os grupos um e dois divergiram em 0,42maa.....38



## Lista de Tabelas

- Tabela 1: Relação dos primers utilizados para a amplificação dos genes analisados neste trabalho, e suas temperaturas de anelamento. O gene vWF foi amplificado utilizando-se a combinação de primers V4+W1 e V1+W2 .....23
- Tabela 2: Cenários testados para fazer a delimitação das espécies pelo programa BP&P. Os cenários avaliam diferentes parâmetros de tamanho populacional ( $\theta$ ) e tempo de divergência ( $\tau_0$ ) .....28
- Tabela 3: Valores de diversidade genética observados para os genes CytB, COI, GHR, vWF e BFIB em 33 espécimes do gênero *Clyomys* analisados neste trabalho.....30
- Tabela 4: Distâncias genéticas médias, entre os grupos e dentro dos grupos delimitados pelo BAPS, para cada gene (CytB, COI, vWF e BFIB) e para a matriz concatenada dos genes mitocondriais (Mit\_Conc). Os valores apresentados estão em porcentagem.....31
- Tabela 5: Esquemas utilizados no BP&P para a delimitação de espécies a partir dos grupos encontrados pelo BAPS, o número de espécies (probabilidade) e a árvore de espécies sugeridas por cada esquema .....37

## Resumo

O Cerrado é um bioma brasileiro com alta riqueza de espécies e endemismo, sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade. Apesar da sua importância ecológica, este bioma é continuamente transformado pelas ações humanas, colocando em risco a conservação de muitas espécies que compõem a sua fauna e flora. Nesta situação se enquadram os roedores do gênero *Clyomys*, que apresentam hábitos coloniais e semi-fossoriais, e cuja distribuição no Cerrado, apesar de ampla, é descontínua. Não existe consenso entre os pesquisadores em relação ao número de espécies dentro do gênero. Para alguns autores ao menos duas espécies são encontradas, *C. bishopi* no estado de São Paulo e *C. laticeps* nas demais localidades, enquanto que para outros o gênero possui apenas uma única espécie (*C. laticeps*). Os marcadores moleculares mitocondriais e nucleares são importantes ferramentas para a análise da variação e estrutura genética existente dentro das espécies e em suas populações, e podem ser utilizados para a resolução de questões relacionadas à definição de *status* taxonômico. Para esclarecer dúvidas com relação a filogeografia do gênero *Clyomys* avaliamos, por análises genéticas, 33 indivíduos provenientes de várias localidades distribuídas por quase toda a sua área de ocorrência. A análise de sequências mitocondriais (*Citocromo b* – CytB; *Citocromo c Oxidase Subunidade I* - COI) e nucleares (*Fator de von Willebrand* – vWF, *Receptor do Hormônio de Crescimento* – GHR e, *Beta Fibrinogênio* – BFIB) utilizando métodos filogenéticos baseados em máxima verossimilhança e inferência bayesiana mostraram uma possível separação do gênero *Clyomys* em três espécies, uma ocorrendo em São Paulo, uma na região central do Brasil e a outra na região do Pantanal. Esses resultados foram corroborados com altas probabilidades encontradas nas análises do BP&P. A datação da divergência dessas potenciais espécies sugere que isto tenha ocorrido no Pleistoceno, sendo que a divergência da linhagem próxima ao pantanal ocorreu primeiro.

## Abstract

The Brazilian biome Cerrado is characterized by high species richness and endemism, and it's considered a biodiversity hotspot. Despite its ecological importance, this biome is constantly changing due to human actions which strongly affects the conservation of many species.

*Clyomys*, composed by colonial and semi-fossorial rodents, clearly fits in this situation. This genus has a large but discontinuous distributions over Cerrado area and there is no consensus among researchers regarding the number of species within the genus. Some authors consider two species, *C. bishopi* in São Paulo and *C. laticeps* in other locations, while for others *Clyomys* has only one species, *C. laticeps*. Molecular markers are important tools to access population genetic structure and it's a powerful tool for species delimitation. Thus, we used mitochondrial and nuclear sequences from 33 individuals sampled in almost all known *Clyomys* range to evaluate the taxonomic status within the genus. The mitochondrial (*Cytochrome b* - CytB;

*Cytochrome c Oxidase Subunit I* - COI) and nuclear (*von Willebrand Factor* - vWF, *Growth Hormone Receptor* - GHR and *Beta Fibrinogen* - BFIB) sequences were analyzed using phylogenetic methods based on maximum likelihood and Bayesian Inference. This analyses indicated a possible split into three species within *Clyomys*: one in São Paulo, one in central Brazil and another in the Pantanal. These results were corroborated by BAPS genetic clustering analysis and by a high probability for three distinct species in BP&P analyzes. Molecular dating based on \*Beast species tree analysis indicated a recent speciation of these potential three species during Pleistocene in which the Pantanal lineage diverged first.

## 1. Introdução

Especiação é o processo em que ocorre a diferenciação de uma linhagem em outras duas, formando um único braço na árvore da vida (CAMPBELL *et al.*, 2008). Esse processo resulta na evolução das espécies, que pode ocorrer por meio de modificações em pequena e em grande escala, micro e macroevolução respectivamente, resultando no isolamento genético entre as novas linhagens (CAMPBELL *et al.*, 2008; FREEMAN; HERRON, 2009).

O ambiente pode influenciar a evolução das espécies e resultar na especiação (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007). A latitude está diretamente ligada a riqueza do ambiente, propiciando a formação de um gradiente latitudinal de diversidade (HILLEBRAND, 2004). Outros fatores, como a elevação do terreno também podem influenciar a diversidade de espécies (MAESTRI; PATTERSON, 2016).

A combinação dos gradientes de latitude e longitude pode explicar o grande número de espécies encontrados na América do Sul (MAESTRI; PATTERSON, 2016). Neste continente são encontrados alguns *hotspots* como a Zona Tropical dos Andes e o Cerrado, refletindo a riqueza do mesmo (MYERS *et al.*, 2000; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

### 1.1. O Cerrado

O Cerrado, por sua vez, é o segundo maior bioma da América do Sul. Ele possui diversas fitofisionomias formadas durante as flutuações climáticas ocorridas no quaternário, as quais poderiam ter causado expansões e retrações nas vegetações (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002). Essas modificações nos habitats permitiram que o Cerrado fosse colonizado por espécies dos biomas adjacentes e que as especiações ocorressem aumentando o grau de endemismo do Cerrado (SILVA; BATES, 2002; SILVA, 1995).

Esse bioma ocupa cerca de 22% do território nacional, o que faz dele o segundo maior bioma brasileiro, ocupando os estados de Rondônia, Maranhão, Piauí, Bahia, Tocantins, Mato

Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e o Distrito Federal, concentrando-se, principalmente, no Planalto Central (Figura 1) (EITEN, 1972; KLINK; MACHADO, 2005; RATTER; RIBEIRO; S., 1997). Considerado um *hotspot* mundial (MYERS *et al.*, 2000), o Cerrado apresenta-se como um bioma heterogêneo e diverso, devido a sua larga extensão e as suas diversas regiões climáticas e composições de solo (EITEN, 1972; SILVA *et al.*, 2006).

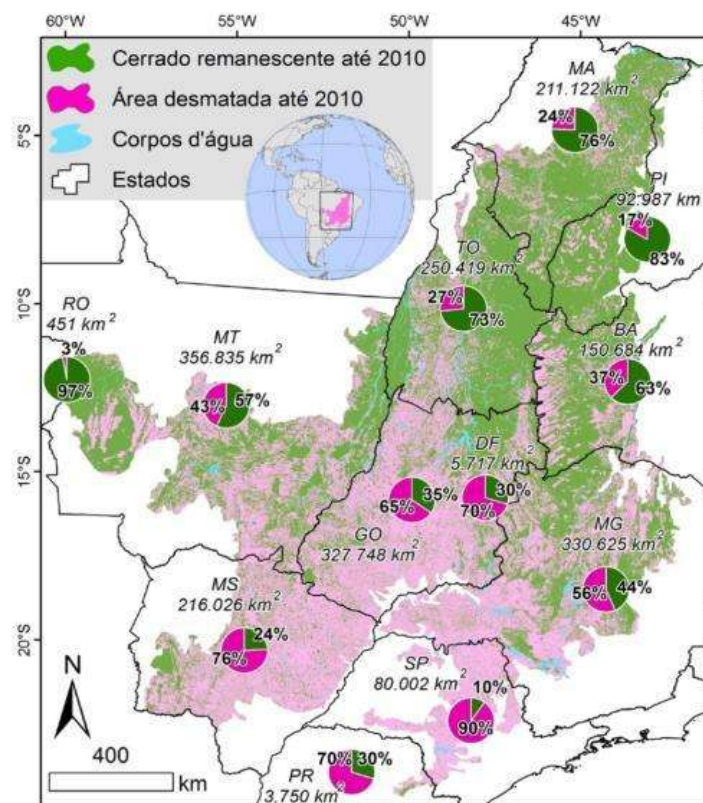


Figura 1: Mapa de distribuição do bioma Cerrado, evidenciando as áreas remanescentes (em verde) e as áreas desmatadas (em rosa) até 2010. Nos gráficos em forma de pizza são apresentadas as porcentagens das áreas desmatadas e não desmatadas em cada estado brasileiro. Mapa retirado do PPCerrado - Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado: 2ª fase (2014-2015) (MMA, 2014).

Em contato com quatro outros biomas brasileiros (i.e. Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e Pantanal), o Cerrado sofre influência dos mesmos e possui riqueza elevada nas áreas de intersecção, denominadas ecótonos (MMA, 2014). Um exemplo dessa influência é o que

ocorre na intersecção com o Pantanal, onde há áreas de cerrado com espécies florísticas típicas do Pantanal, diferenciando-se de outras áreas centrais de sua distribuição (COSTA; CUNHA; COSTA, 2010).

O bioma Cerrado apresenta uma grande diversidade de espécies, somente de espécies vegetais são mais de 23000 de plantas e aproximadamente 44% da sua flora é endêmica (MMA, 2014). Foram registradas cerca de 227 espécies de mamíferos do Cerrado, no entanto estima-se que o número real de espécies seja maior (CARMIGNOTTO; VIVO; LANGGUTH, 2012).

Devido, principalmente, às expansões populacionais e agrícolas, o Cerrado ocupa o segundo lugar em desmatamento entre os biomas brasileiros, ficando atrás apenas da Mata Atlântica (MMA, 2014). Em 2005, menos de 45% da sua área original era de área nativa (KLINK; MACHADO, 2005). Entre os anos de 2009 e 2010, a sua taxa de desmatamento foi de 0,3%, a maior entre os biomas brasileiros (MMA/IBAMA, 2011). São Paulo é o estado que possui a menor proporção de área nativa de Cerrado (Figura 1) e, atualmente, a região do MATOPIBA (zona que divide os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) é a que sofre maior pressão por ser considerada a nova fronteira agrícola do país (MMA, 2014).

Os elevados níveis de perda de habitat e fragmentação, que podem causar perdas imensuráveis na biodiversidade do planeta, são considerados as principais causas para a extinção de espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Antes de serem extintas as populações, e conseqüentemente as espécies, tendem a passar por um processo pelo qual as populações diminuem seu tamanho e perdem diversidade genética. A genética da conservação é um campo da ciência que utiliza de técnicas e teorias genéticas para conhecer e preservar as espécies, a fim de serem capazes de se adaptarem as mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

## 1.2 A genética como ferramenta para a delimitação de espécies

A taxonomia se dedica a descrever novas espécies e, inicialmente, a metodologia usada para essas descrições era basicamente a análise de caracteres morfológicos, chamada taxonomia morfológica. Com o avanço científico e o desenvolvimento de novas metodologias de análise, foi possível incorporar técnicas moleculares e análises genéticas na resolução de incertezas taxonômicas.

Os genes conservam a história evolutiva das espécies por serem menos influenciados pelo ambiente e por disponibilizarem mais caracteres informativos, em comparação aos dados morfológicos (LOESCHCKE; TOMIUK; JAIN, 1994; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2014). A genética, com o uso de marcadores moleculares, tem possibilitado a análise de questões evolutivas em diferentes níveis taxonômicos (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2012).

Os marcadores moleculares são segmentos de DNA capazes de proporcionar informações sobre as populações e os indivíduos. Diferentes marcadores possuem distintas taxas de evolução, portanto é preciso escolher qual ou quais marcadores moleculares podem responder a determinadas perguntas (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). O desenvolvimento de técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilitou o acesso ao DNA por meio dos marcadores moleculares. Dois marcadores muito utilizados são o DNA nuclear e o DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial é uma molécula pequena, de origem predominantemente materna e, em sua maior parte, é formado por genes codantes, tornando-a uma molécula conservada e aumentando seu potencial para responder questões filogenéticas (AVISE *et al.*, 1987; VAWTER; BROWN, 1986). Estudos com genes mitocondriais como o Citocromo b têm apresentado bons resultados na reconstrução de relações evolutivas entre gêneros e entre espécies pertencentes à um mesmo gênero (ARANTES, 2011; CAÑÓN *et al.*, 2014).

### 1.3. Diversidade de roedores e a família Echimyidae

Dentre os mamíferos vivos, os roedores constituem uma das ordens de maior diversidade. Com cerca de 2277 espécies reconhecidas, a ordem *Rodentia* engloba 42% das espécies de mamíferos do mundo (CARLETON; MUSSER, 2005). As relações filogenéticas dentro deste grupo são imprecisas e com algumas divergências entre a filogenia molecular e a morfológica (HUCHON *et al.*, 2002).

O grupo é considerado polifilético desde os trabalhos de Graur *et al.* (1991) e D'Erchia *et al.* (1996), os quais sugerem que a espécie *Cavia porcellus* não é um roedor (BLANGA-KANFI *et al.*, 2009; CARLETON; MUSSER, 2005). A ordem *Rodentia* está dividida em algumas subordens, sendo algumas delas consideradas monofiléticas, como a subordem *Hystricognathi* (BLANGA-KANFI *et al.*, 2009; CARLETON; MUSSER, 2005).

Os *Echimyidae* constituem uma grande e diversa família dentro da subordem *Hystricognathi*, para a qual já foram realizados diversos estudos filogenéticos (FABRE *et al.*, 2013; LEITE; PATTON, 2002; LOSS, 2014; UPHAM; PATTERSON, 2012). No entanto essas filogenias são incompletas, dificultando as resoluções filogenéticas e a delimitação de espécies (LESSA *et al.*, 2014). As altas taxas de especiação, os altos níveis de homoplasia em caracteres morfológicos e as taxas de evolução heterogêneas podem estar interferindo na resolução filogenética do grupo (FABRE *et al.*, 2013).

Os ratos-de-espinho, como são chamados os integrantes da família *Echimyidae*, foram divididos em três clados polifiléticos (e.g. terrestre, arbóreo e semi-fossorial) de acordo com um estudo que utilizou o gene do *Fator von Willebrand* (vWF) (GALEWSKI *et al.*, 2005). O gênero *Clyomys* pertence ao clado semi-fossorial e tem sido foco de alguns trabalhos acerca da validação das suas espécies (ARANTES, 2011; BECKER *et al.*, 2007; BEZERRA; OLIVEIRA, 2013; BEZERRA *et al.*, 2012; BUENO *et al.*, 2004).



#### 1.4. O gênero *Clyomys*

O gênero *Clyomys* (THOMAS, 1916) foi descrito apenas com a espécie, *Clyomys laticeps* (THOMAS, 1909) (Figura 2A), baseado em um único espécime encontrado em uma expedição à Lagoa Santa, MG-Brasil. Coletas posteriores no Paraguai permitiram a descrição da subespécie *Clyomys laticeps whartoni* (MOOJEN, 1952). Em 1974, a avaliação de espécimes de dois estados brasileiros, Mato Grosso e São Paulo, evidenciou a existência de diferenças entre os exemplares dessas duas localidades (BISHOP, 1974). Em 1981, análises de espécimes provenientes de diferentes localidades brasileiras levaram a descrição de uma nova espécie para o gênero, denominada *Clyomys bishopi* (AVILA-PIRES; WUTKE, 1981) (Figura 2B).



Figura 2: Foto de indivíduos das espécies *Clyomys laticeps* (A) e *Clyomys bishopi* (B). Fotos: Cibele R. Bonvicino (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008) e J.C. Motta-Junior (BUENO, 2005).

Este gênero apresenta ampla distribuição em áreas de Cerrado da América do Sul, ocorrendo nos estados brasileiros de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, e no Chaco Paraguai (Figura 3) (AVILA-PIRES; WUTKE, 1981; BECKER *et al.*, 2007; BEZERRA; OLIVEIRA, 2010; VIEIRA, 1997). Os indivíduos do gênero são encontrados principalmente em áreas de transição entre mata e campo (ALHO *et al.*, 1987), onde se tem uma combinação de cobertura herbácea e arbórea (VIEIRA, 1989).

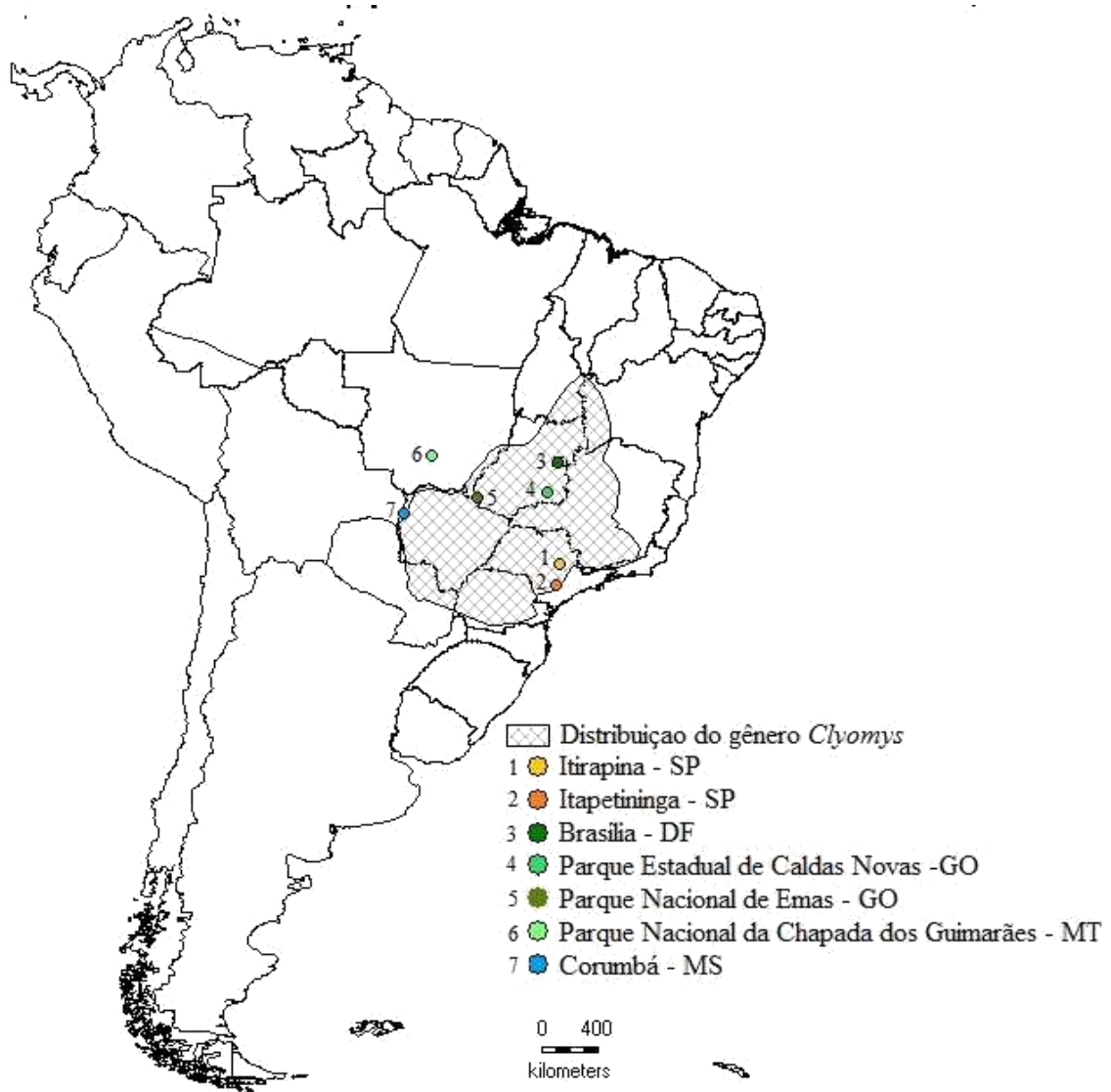


Figura 3: Mapa da América do Sul destacando a distribuição do gênero *Clyomys* registrada na International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (região rachurada) e os pontos de coleta de amostras utilizadas neste trabalho (pontos coloridos).

As diagnoses do gênero *Clyomys* são: bula auditiva hipertrofiada; garras dianteiras maiores, que auxiliam os hábitos fossoriais; e dentes molares pequenos, de superfícies circulares e com apenas um entalhe (BISHOP, 1974; THOMAS, 1916). Outras características morfológicas do gênero são: tamanho médio, pelagem ferrugínea com pelos guardas escuros e ventre esbranquiçado ou amarelado, patas pequenas e cauda menor que o corpo (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008; THOMAS, 1909).

*Clyomys* são roedores herbívoros, dispersores de sementes (ALHO *et al.*, 1987; BUENO *et al.*, 2004; VIEIRA, 1989). A espécie *C. bishopi* é especializada em monocotiledôneas, embora também se alimente de dicotiledôneas (VIEIRA, 1989). A ocorrência de *Clyomys* pode estar relacionada com a palmeira do gênero *Attalea*, sendo *Attalea geraensis* para *C. bishopi* em São Paulo e *Attalea phalerata* para *C. laticeps* no Pantanal (ALMEIDA; GALETTI, 2007; BUENO *et al.*, 2004; SAMPAIO; CAMILO-ALVES; MOURÃO, 2010). A ocorrência *C. laticeps* também foi associada com a bromélia *Bromelia balansae* no Pantanal, a qual pode ser usada como proteção contra predadores (CAMILO *et al.*, 2010).

O grupo apresenta hábitos semi-fossoriais (BISHOP, 1974; LACHER; ALHO, 1989; THOMAS, 1916). Um estudo com *C. bishopi* mostrou que por viver em buracos a espécie é sensível às baixas concentrações de oxigênio e gás carbônico, sendo capaz de tornar a troca gasosa por meio de ventilação pulmonar bifásica e a redução do metabolismo mais eficientes (BARROS *et al.*, 2004).

Para este gênero é descrito a ocorrência do desenvolvimento de sistema social colonial (ALHO *et al.*, 1987; BUENO *et al.*, 2004; VIEIRA, 1989), no qual animais solitários constroem suas tocas próximas as de outros (BURDA *et al.*, 2000).

Apesar de existirem poucas diferenças nas medidas craniais entre as espécies descritas (AVILA-PIRES; WUTKE, 1981; BEZERRA; OLIVEIRA, 2010), *C. laticeps* e *C. bishopi* se distinguem por algumas características morfológicas, como coloração dorsal mais amarela em *C. laticeps* e mais ruiva em *C. bishopi*, as medidas da série molar e o comprimento palatal (AVILA-PIRES; WUTKE, 1981).

Não há consenso na comunidade científica sobre a validade das espécies descritas para o gênero. Estudos baseados na morfologia de crânio sugerem que não há divisão entre as espécies e que todos os indivíduos do gênero pertencem à espécie *C. laticeps* (BEZERRA; OLIVEIRA, 2010). Por outro lado, foram encontrados cariótipos diferentes em algumas localidades: em Itapetininga/SP os animais possuem cariótipo  $2n$  de 34 e o número fundamental de cromossomos autossômicos (NF) de 60, em Brasília/DF os indivíduos também apresentaram  $2n=34$ , mas NF=62, e os indivíduos do Parque Nacional de Emas/GO apresentaram  $2n=32$  e NF=54 (BEZERRA *et al.*, 2012; SOUZA; YONENAGA-YASSUDA, 1984; YONENAGA, 1975), indicando haver diferenciação genética entre diferentes localidades de ocorrência. Além disso, estudos preliminares utilizando um pequeno segmento do gene *Citocromo b* (CytB) revelaram a existência de ao menos duas linhagens monofiléticas dentro desse gênero, separando os animais de São Paulo (*C. bishopi*) das demais localidades do Brasil Central e Pantanal (*C. laticeps*) (ARANTES, 2011).

Baseados nos estudos de morfologia de crânio, órgãos como a IUCN e catálogos de roedores como o de Bonvicino, Oliveira e D'Andrea (2008) passaram a considerar a espécie *Clyomys bishopi* sinônimo da espécie *Clyomys laticeps*, tendo impacto direto sobre a conservação de *C. bishopi*, espécie até então considerada endêmica dos remanescente de Cerrado do estado de São Paulo.

## 2. Objetivo

Diante das incertezas taxonômicas apresentadas acima, este trabalho tem como objetivo avaliar a diferenciação genética existente entre indivíduos pertencentes ao gênero *Clyomys* e investigar o número de espécies nele existentes por meio da análise de genes nucleares e mitocondriais de espécimes coletados em várias localidades, envolvendo quase toda a distribuição do gênero. Com base nos estudos anteriores acerca deste gênero nós esperamos encontrar pelo menos duas espécies bem definidas.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Obtenção das amostras e extração de DNA

Ao todo, foram utilizadas amostras de tecido muscular de 33 espécimes do gênero *Clyomys*, coletadas por colaboradores, oriundas das seguintes localidades da distribuição do gênero: Estação Ecológica de Itirapina - SP (ITI) (n = 8), Itapetininga - SP (ITA) (n = 6), Parque Nacional de Brasília - DF (BSB) (n = 1), Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF (BSB) (n = 1) (agrupadas na população de Brasília para a realização das análises), Parque Nacional das Emas - GO (PNE) (n = 3), Parque Estadual de Caldas Novas - GO (CAN) (n = 3), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães - MT (PNG) (n = 5) e Corumbá - MS (COR) (n = 6) (Figura 3). Todas as amostras foram conservadas em álcool absoluto e mantidas em freezer - 20°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

As amostras foram submetidas a um protocolo de extração de DNA baseado no método de fenol:clorofórmio descrito por Sambrook e Russel (2001). Após a extração, a qualidade do DNA foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com Brometo de Etídio, sendo posteriormente quantificado utilizando-se um espectrofotômetro modelo

NanoDrop 2000, da Thermo Scientific®. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma solução de uso contendo 20 ng de DNA por microlitro.

Como grupos externos, incluímos em nossas análises sequências de até nove espécies, sendo elas *Trichomys sp.*, cuja sequência foi gerada nesse trabalho a partir de um espécime cedido pela Coleção de Vertebrados da UFSCar, campus Sorocaba, *Capromys pilorides*, *Carterodon sulcidens*, *Euryzygomatomys spinosus*, *Trinomys iheringi*, *Myocastor coypus*, *Callistomys pictus*, *Hoplomys gymnurus* e *Proechimys cuvieri*, cujas sequências de DNA estão disponíveis no Genbank (Números de acesso do Genbank no anexo 1).

### 3.2. Amplificação do DNA

Para avaliação taxonômica do gênero amplificamos, por meio da PCR, fragmentos de cinco *loci* gênicos (três nucleares e dois mitocondriais): 680pb (pares de bases) do éxon 10 do gene do *Receptor do Hormônio de Crescimento* (GHR), 1130pb do éxon 28 do *fator de von Willebrand* (vWF), 760pb do íntron 7 do *Betafibrinogênio* (BFIB), 600pb do gene mitocondrial *Citocromo b* (CytB) e 694pb do gene mitocondrial *Citocromo c Oxidase Subunidade I* (COI). A relação de *primers* utilizados para a amplificação desses segmentos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes analisados neste trabalho, e suas temperaturas de anelamento. O gene vWF foi amplificado utilizando-se a combinação de primers V4+W1 e V1+W2.

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Ta (°C)
<i>CytB</i>	MVZ05 Irwin <i>et al.</i> 1991	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	58
	MVZ16 Smith e Patton 1993	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	
<i>COI</i>	FISH F2 Ward <i>et al.</i> , 2005	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	48
	FISH R2 Ward <i>et al.</i> , 2005	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
<i>GHR</i>	GHR02 Adkins <i>et al.</i> , 2001	GATTTTGTTACAGTTGGTCTGTGCTCAC	62
	GHR10 Adkins <i>et al.</i> , 2001	GGRAARTTRGAGGAGGTGAACACMATCTT	
<i>vWF</i>	V4 Huchon; Catzeflis; Douzery, 1999	AAGCAGGCCCTGAAAACAA	64
	W1 Huchon; Catzeflis; Douzery, 1999	TGCAGGACCAGGTCAGGAGCCTCTC	
	V1 Huchon; Catzeflis; Douzery, 1999	TGTCAACCTCACCTGTGAAGCCTG	60
	W2 Huchon; Catzeflis; Douzery, 1999	ACGTCCATGCGCTGGATCACCT	
BFIB	BFIB Wickliffe <i>et al.</i> , 2003	CACAACGGCATGTTCTTCAGCAC	61
	B17 Wickliffe <i>et al.</i> , 2003	ACCCAGTAGTATCTGCCGTTTGGAT	

As PCRs para os genes GHR e vWF seguiram as seguintes concentrações: 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tampão 10X, 10µM de cada *primer* e 40 ng de DNA. Para o gene nuclear BFIB as concentrações usadas foram: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,75U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tampão 10X, 0,25 µM de cada *primer* e 30 ng de DNA. Para amplificação do gene GHR usamos um ciclo de PCR iniciado por temperatura de desnaturação de 94°C por 10min seguido por 35 repetições de 94°C por 30s, 62°C por 90s e 72°C por 90s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 20min. Para o gene vWF utilizamos o mesmo ciclo, acrescentando um *touchdown* com 10 ciclos iniciados dois graus acima da temperatura de anelamento do *primer*. Usamos para as reações do gene BFIB um ciclo iniciado a 94°C por 5min seguido por 40 repetições de 94°C por 45s, 61°C por 90s e 72°C por 90s e finalizado com uma extensão na temperatura de 72°C por 6min.

Para a amplificação do gene mitocondrial CytB, utilizamos os reagentes nas concentrações que se seguem: 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tampão 10X, 0,3µM de cada *primer* e 40 ng de DNA. As concentrações utilizadas para o gene COI foram: 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,75U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tampão 10X, 0,5µM de cada *primer* e 30 ng de DNA. O ciclo da PCR utilizado para CytB consistiu em uma temperatura de desnaturação de 95°C por 120s seguido por 30 repetições de 95°C por 45s, 58°C por 60s e 72°C por 90s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 8min. Para o COI iniciamos o ciclo a 95°C por 10min, seguido por 35 repetições de 95°C por 1min, 48°C por 1min e 72°C por 90s, e finalizamos com 72°C por 7min.

Após a finalização das PCRs, verificamos o sucesso de amplificação e da qualidade do produto por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.



### 3.3. Sequenciamento

Após a amplificação dos diferentes segmentos gênicos, 13µl do produto final foram purificados com 2,6U da enzima Exonuclease I (*Exo I*) e 2,3U da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), mantidos em um termociclador à 37°C por 1h e 30min, seguido por 80°C por 20min. Posteriormente, encaminhamos os produtos purificados ao Centro de Genômica do Distrito Federal, localizado na Universidade Católica de Brasília, onde foram sequenciados utilizando-se o equipamento ABI 3130xl Genetic Analyser, da Applied Biosystems®. As amostras do gene COI e algumas do gene BFIB foram enviadas para a empresa Macrogen® (Seoul, Korea).

### 3.4. Alinhamento e Análises dos dados

As sequências obtidas foram analisadas e editadas no programa Geneious® versão 6.0.6 (KEARSE *et al.*, 2012). Em seguida, o alinhamento múltiplo foi feito no Software BioEdit (HALL, 1999) utilizando o algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), que faz o alinhamento de forma local ou por sítios, variando as penalidades de GAP em relação ao sítio (HICKSON; SIMON; PERREY, 2000).

Fizemos a concatenação dos genes no programa DAMBE versão 5 (XIA, 2013), substituindo os *gaps* por *missing data*. Utilizamos uma matriz concatenada de todos os genes para a construção das árvores de máxima verossimilhança e bayesiana, enquanto outra matriz concatenada apenas dos genes mitocondriais foi utilizada para a construção da rede de haplótipos. Nas análises separadas para cada gene utilizamos apenas os indivíduos para os quais obtivemos sucessos na amplificação e no sequenciamento, enquanto que para as análises dos genes concatenados as sequências faltantes foram substituídas por códigos de *missing data*.

Separamos os indivíduos em grupos por meio de análise bayesiana de delimitação de grupos com o programa BAPS versão 5 (CORANDER *et al.*, 2008). A partir do resultado

fizemos as análises de polimorfismo e calculamos o valor de  $F_{ST}$  entre os grupos encontrados, além de estimar índices de diversidade haplotípica e nucleotídica de cada gene utilizando o programa DNAsp versão 5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Com o mesmo programa determinamos os haplótipos de cada gene e da matriz com os genes mitocondriais concatenados, desconsiderando os sítios com *gaps/ missing datas*.

A partir dos grupos encontrados pelo BAPS calculamos as distâncias genéticas dentro e entre os grupos, para todos os genes e para os genes mitocondriais concatenados. As distâncias foram obtidas com o programa MEGA v7.0.14 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando o modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros* para o cálculo das distâncias par-a-par de cada gene individualmente, exceto GHR, e para os genes mitocondriais concatenados. O gene GHR não foi utilizado para o cálculo da distância genética por não apresentar polimorfismo entre os indivíduos analisados.

Com o programa Network, versão 4.6.1.1 (Fluxus Technology, 2012) estimamos as relações entre os haplótipos encontrados nos diferentes genes (exceto GHR) por meio da construção de uma rede haplotípica utilizando o método Median-Joining (BANDELDT; FORSTER; RÖHL, 1999). Como o gene GHR não apresentou polimorfismo não foi possível construir rede de haplótipos para este gene.

As árvores filogenéticas de máxima verossimilhança de cada gene e da matriz concatenada foram criadas com programa PhyML 3.0, versão online disponível em <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/> (GUINDON; GASCUEL, 2003) utilizando o modelo GTR com suporte de 10000 replicações de bootstrap. O modelo GTR foi utilizado por ser o mais robusto disponível no programa.

Elaboramos árvores por meio de Inferência Bayesiana utilizando o programa MrBayes (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), com 2 milhões de gerações de cadeias Markov de

Monte Carlo (MCMC) para as análises de cada gene e 20 milhões para a matriz concatenada, utilizando o modelo GTR. Obtivemos árvores a cada 1000 gerações, aplicando-se 25% de *burn-in*, necessário para a eliminação das cadeias frias de acordo com o programa TRACER 1.6 (RAMBAUT *et al.*, 2014).

Utilizamos os grupos encontrados pelo programa BAPS como base para a delimitação de espécies por inferência bayesiana com o programa BP&P versão 3.2 (YANG, 2015). Aplicamos a função do programa que estima a árvore de espécies. A qual servirá de base para a delimitação das espécies. Apesar de se basear em uma árvore guia, o algoritmo que o BP&P usa para a delimitação de espécies, o *reversible-jump Markov chain Monte Carlo* (rjMCMC), não limita a escolha dos melhores nós pela árvore guia, ou seja, o nó da árvore de espécies pode ser rejeitado caso não haja probabilidade do mesmo acontecer (RANNALA; YANG, 2013). Para estas análises, testamos diferentes cenários, combinando diversas possibilidades dos parâmetros de tamanho populacional e tempo de divergência de acordo com o proposto por LEACHÉ; FUJITA, 2010 (Tabela 2). Cada cenário foi rodado mais de uma vez com os dois algoritmos disponíveis no BP&P 3.2 para garantir a mistura correta entre as cadeias. Alguns trabalhos têm testado a eficácia do BP&P em delimitar espécies e os resultados tem sido positivos, inclusive utilizando poucos genes (CAMARGO; SITES, 2013; GIARLA; VOSS; JANSA, 2014).

Após a delimitação das espécies construímos uma árvore de espécies datada com o programa \*Beast (HELED; DRUMMOND, 2010). Fizemos a calibração de forma secundária, utilizando os resultados obtidos por UPHAM; PATTERSON, 2015 na separação dos gêneros *Clyomys* e *Euryzygomatomys* (média= 5,7, desvio padrão=1).

Tabela 2: Cenários testados para fazer a delimitação das espécies pelo programa BP&P. Os cenários avaliam diferentes parâmetros de tamanho populacional ( $\theta$ ) e tempo de divergência ( $\tau_0$ ).

CENÁRIO	ALGORITIMO	$\theta$	$T_0$	DESCRIÇÃO
1	0	G(1,10)	G(1,10)	População grande Divergência profunda
2	0	G(2,2000)	G(2,2000)	População pequena Divergência recente
3	0	G(1,10)	G(2,2000)	População grande Divergência recente
4	1	G(1,10)	G(1,10)	População grande Divergência profunda
5	1	G(2,2000)	G(2,2000)	População pequena Divergência recente
6	1	G(1,10)	G(2,2000)	População grande Divergência recente

## 4. Resultados

Ao final do sequenciamento e das edições, obtivemos seqüências de 33 indivíduos para os genes CytB, COI, GHR e vWF e de 32 indivíduos para o gene BFIB, perfazendo um total de 3864 pares de bases. Lista completa dos indivíduos e dos genes sequenciados para cada um em anexo (Anexo 2).

A análise de agrupamento realizada com o software BAPS separou as localidades de coleta em três grupos: grupo 1, indivíduos de Itirapina e Itapetininga (laranja – São Paulo); grupo 2, indivíduos de Caldas Novas, Parque Nacional de Emas, Brasília e Parque Nacional da Chapada dos Guimarães (verde - Central); e grupo 3, indivíduos de Corumbá (azul- Pantanal) (Figura 4).

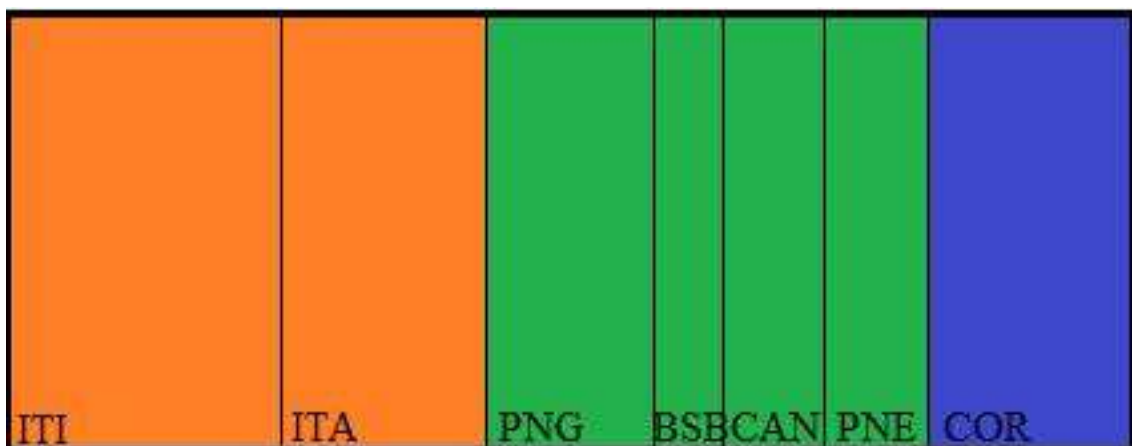


Figura 4: Grupos formados pelo BAPS com a análise dos genes CytB, COI, GHR, vWF e BFIB. Grupo 1 (laranja) composto pelas localidades Itirapina – SP (ITI) e Itapetininga – SP (ITA); grupo 2 (verde) por Parque Nacional da Chapada dos Guimarães – GO (PNG), Brasília – DF (BSB), Caldas Novas – GO (CAN), Parque Nacional de Emas – GO (PNE); e grupo 3 (azul) por Corumbá – MS (COR).

O gene CytB apresentou 14,12% dos seus 694 sítios variáveis, formando 24 haplótipos com Fst igual a 0,50, diversidade haplotípica (Hd) de 0,96 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,025. Já o COI teve 8% dos seus 600 sítios variáveis com 16 haplótipos, com Fst = 0,82, Hd = 0,93 e  $\pi$  = 0,026. O GHR foi pouco variável dentro do gênero, com apenas duas bases

variáveis, constituindo 0,29% de variação do total de 680 sítios. Dessa forma encontramos apenas um haplótipo para esse gene, não sendo, portanto, possível estimar valores de diversidade. O gene *vWF* teve 3,19% dos seus 1130 sítios variáveis, gerando 26 haplótipos, com  $F_{st} = 0,63$ ,  $H_d = 0,63$  e  $\pi = 0,006$ . Já o *BFIB* apresentou 3,68% das suas 760 bases variáveis, gerando 11 haplótipos, com  $F_{st} = 0,57$ ,  $H_d = 0,71$  e  $\pi = 0,006$  (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de diversidade genética observados para os genes *CytB*, *COI*, *GHR*, *vWF* e *BFIB* em 33 espécimes do gênero *Clyomys* analisados neste trabalho.

Gene	Número de bases	% de sítios variáveis	Números de haplótipos	$F_{st}$	Diversidade haplotípica ( $H_d$ )	Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )
<i>CytB</i>	694	14,12	24	0,50	0,96	0,025
<i>COI</i>	600	8,0	16	0,82	0,93	0,026
<i>GHR</i>	680	0,29	-	-	-	-
<i>vWF</i>	1130	3,19	26	0,63	0,63	0,006
<i>BFIB</i>	760	3,68	11	0,57	0,71	0,006

O cálculo das distâncias genéticas entre os grupos delimitados pelo BAPS resultou em valores médios maiores para os genes mitocondriais e a concatenação dos mesmos, variando entre 3,1% e 4,9%. Para estes genes, as médias de distâncias entre os grupos 1 e 2 variaram de 3,1 a 3,9, já entre os grupos 1 e 3 estas variaram de 4,2% a 4,9%, enquanto que entre os grupos 2 e 3 a variação foi de 2,7 a 3,6. Com os genes nucleares as variações das médias de distância entre os grupos foram de 0,5 a 0,7 entre os grupos 1 e 2, de 1,0 a 1,1 entre os grupos 1 e 3 e entre os grupos 2 e 3 as médias foram iguais a 0,8 para ambos os genes. Já dentro dos grupos a maior média de distância encontrada foi de 1%, exceto no grupo 3, o qual apresentou 3% o gene *CytB*. O grupo 1 apresentou distâncias iguais a zero para os genes *COI*, *vWF* e *BFIB*. Os valores médios das distâncias estão apresentados na tabela 4 e as matrizes com as distâncias estão contidas nos anexos 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4: Distâncias genéticas médias, entre os grupos e dentro dos grupos delimitados pelo BAPS, para cada gene (CytB, COI, vWF e BFIB) e para a matriz concatenada dos genes mitocondriais (Mit\_Conc). Os valores apresentados estão em porcentagem.

	CytB (%)	COI (%)	Mit_Conc (%)	vWF (%)	BFIB (%)
Entre grupos					
1 X 2	3,1	3,9	3,5	0,7	0,5
2 X 3	3,6	2,7	3,1	0,8	0,8
1 X 3	4,2	4,9	4,5	1,0	1,1
Dentro grupos					
1	1,0	0	0,4	0	0
2	1,0	1,0	1,3	0,9	0,6
3	3,0	1,0	1,9	0	0,4

A rede de haplótipos construída com a concatenação dos genes mitocondriais (i.e Cytb e COI) não apresentou compartilhamento de haplótipos entre as diferentes localidades. O maior número de passos mutacionais (36) foi observado em dois pontos: um entre indivíduos da população de Corumbá – MS; e outro entre dois vetores médios que separam os indivíduos dos pontos de São Paulo das demais localidades (Figura 5). A distância genética encontrada dentro do grupo formado pelos indivíduos do Pantanal (3%, Tabela 4) reflete o número de passos mutacionais encontrado para o gene CytB. As redes de haplótipos dos genes Cytb e COI estão nos anexos 8 e 9 respectivamente.

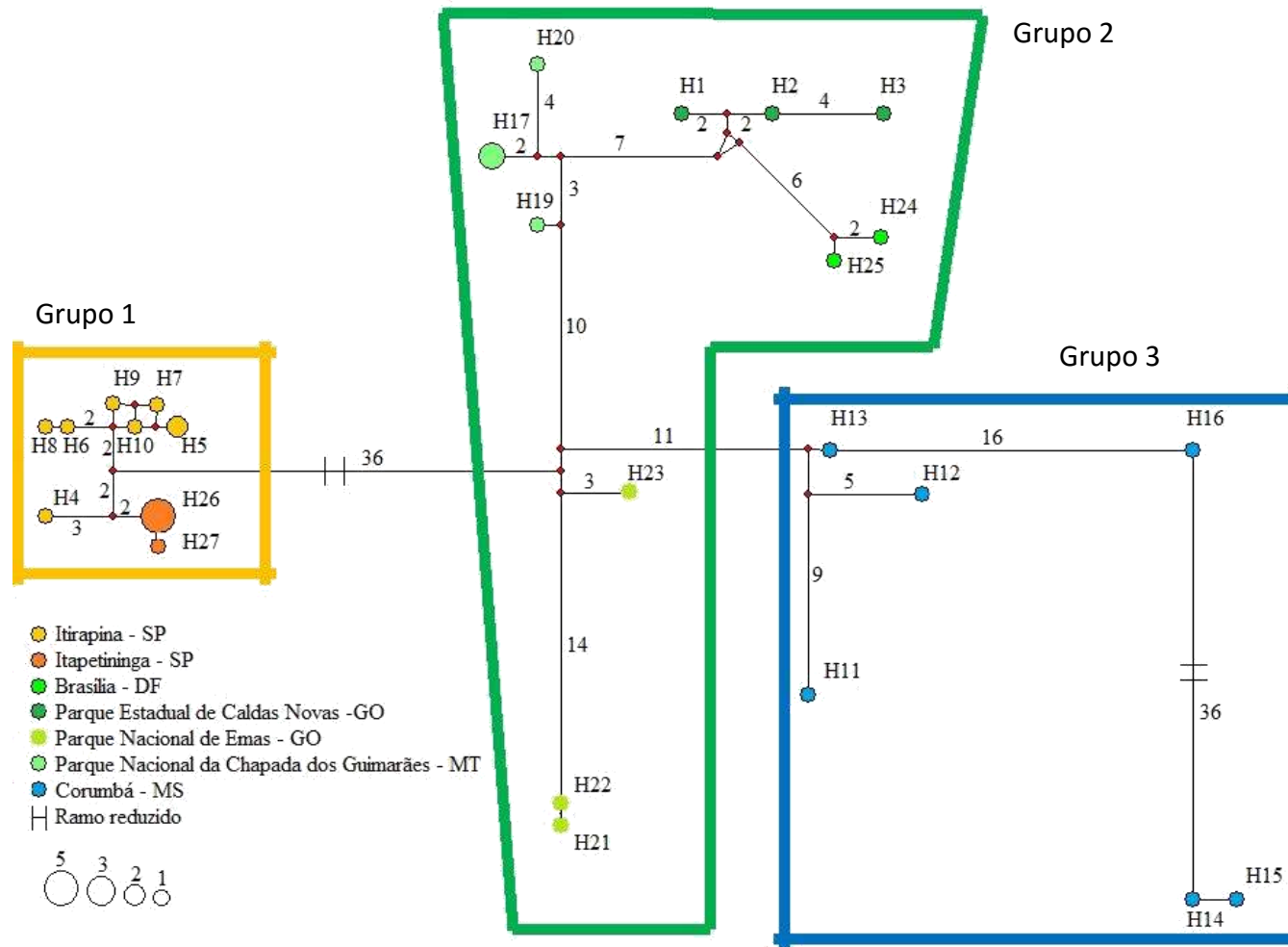


Figura 5: Rede de haplótipos dos genes mitocondriais concatenados. As cores representam as localidades de coleta e os tons representam os grupos dos indivíduos (tons de laranja referem-se às localidades de São Paulo; de verde, à região central do Cerrado; e de azul, à Corumbá). O tamanho dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham, e os ramos estão em proporção ao número de passos mutacionais.



Já os genes nucleares vWF e BFIB, por sua vez, apresentaram compartilhamento de haplótipos entre diferentes localidades na rede gerada. No vWF, o maior número de passos mutacionais foi de 12 passos observados entre o haplótipo de um indivíduo de Itapetininga (H21) e um haplótipo compartilhado por indivíduos de Itirapina, Brasília e Caldas Novas (H1) (Figura 6A). Por outro lado, BFIB apresentou oito passos mutacionais, no seu maior ramo, entre um indivíduo do Parque Nacional de Emas (PNE) e um haplótipo ancestral (Figura 6B).

A árvore consenso das topologias geradas pelo método de máxima verossimilhança utilizando todos os genes concatenados (Figura 7) apresentou politomia em algumas de suas relações, com o clado de São Paulo melhor estruturado e com maior valor de suporte. A topologia gerada por inferência bayesiana (Figura 8) apresentou poucas politomias nos ramos e valores de suporte maiores que os da topologia por máxima verossimilhança. Os genes mais informativos para essas análises foram os genes mitocondriais. As topologias geradas para cada gene isoladamente estão nos anexos de 10 a 14.

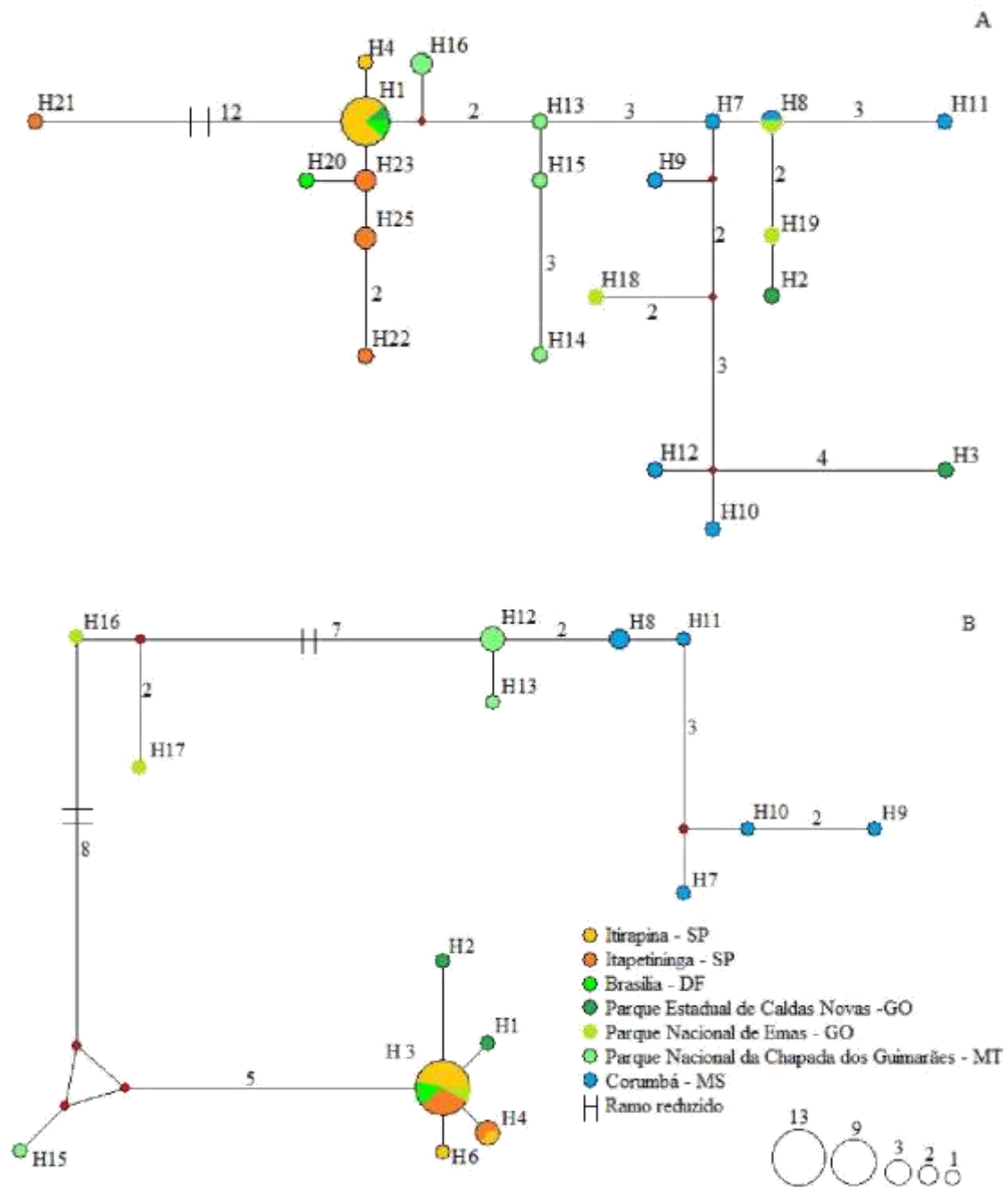


Figura 6: Rede de Haplótipos dos genes vWF (A) e BFIB (B). As cores representam as localidades de coleta, sendo que os tons representam os clados dos indivíduos (tons de laranja referem-se às localidades de São Paulo, verde à região central do Cerrado e azul à Corumbá). O tamanho dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham e os ramos estão em proporção ao número de passos mutacionais.

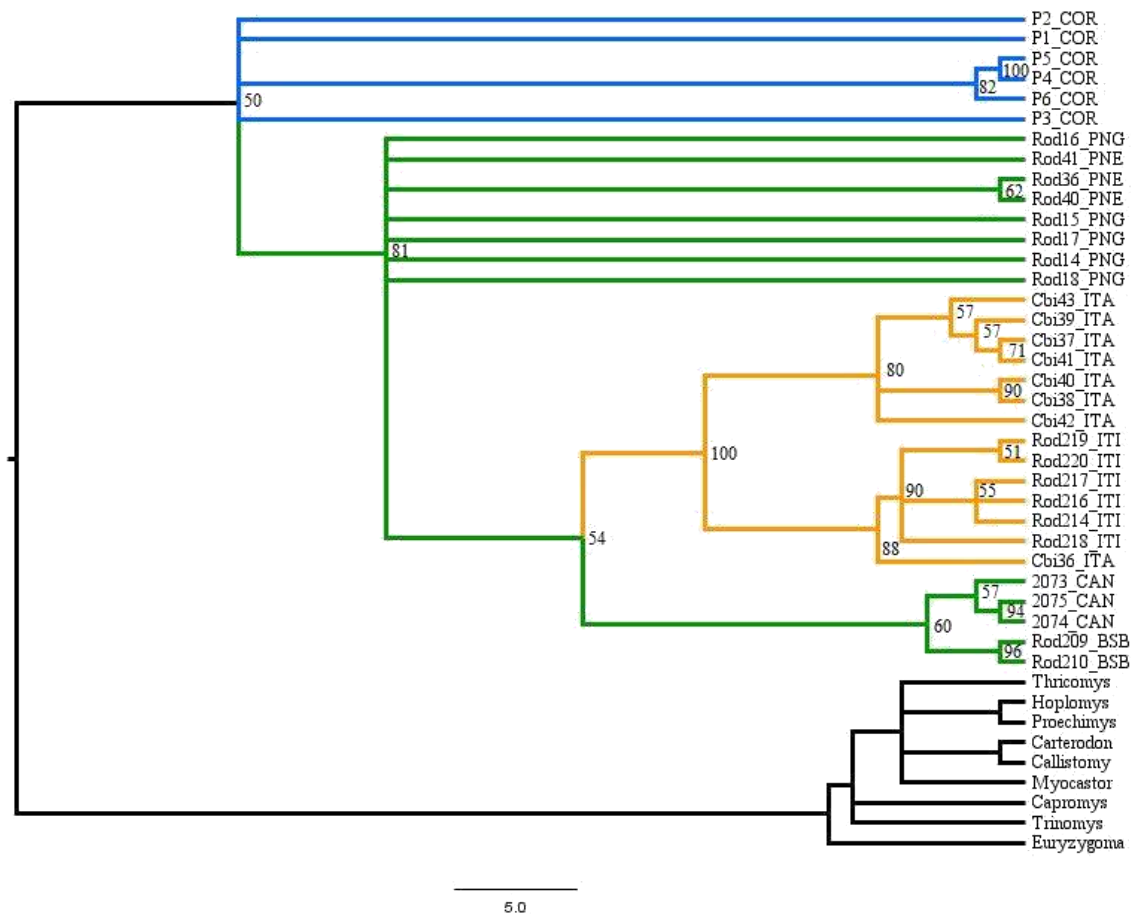


Figura 7: Topologia consenso da análise de máxima verossimilhança com a matriz concatenada de todos os genes. Os valores de suporte dos nós apresentados em porcentagem. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS. As siglas a frente dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta (Itirapina–SP (ITI), Itapetininga–SP (ITA), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães–GO (PNG), Brasília–DF (BSB), Caldas Novas–GO (CAN), Parque Nacional de Emas–GO (PNE) e Corumbá–MS (COR)).

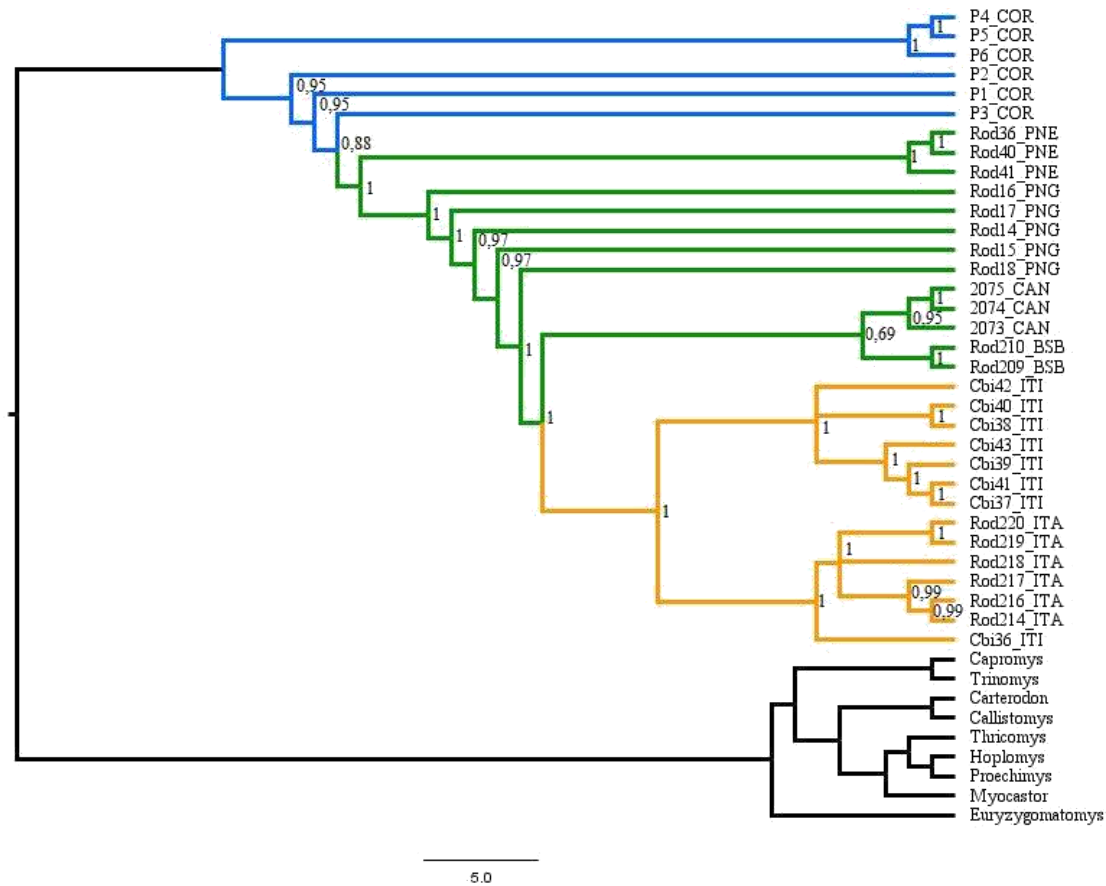


Figura 8: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando todos os genes concatenados, com 20 milhões de geração e *burn-in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS. As siglas a frente dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta (Itirapina–SP (ITI), Itapetininga–SP (ITA), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães–GO (PNG), Brasília–DF (BSB), Caldas Novas–GO (CAN), Parque Nacional de Emas–GO (PNE) e Corumbá–MS (COR)).

Os grupos formados no BAPS foram confirmados como potenciais espécies pelo programa BP&P com probabilidade igual a 1 em todos os cenários testados. As árvores de espécies estimadas em cada cenário foram iguais entre si, contendo as seguintes relações ((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3) (Tabela 5).

Tabela 5: Esquemas utilizados no BP&P para a delimitação de espécies a partir dos grupos encontrados pelo BAPS, o número de espécies (probabilidade) e a árvore de espécies sugeridas por cada esquema. Grupo 1 composto por indivíduos das localidades de Itirapina–SP (ITI) e Itapetininga–SP (ITA), o grupo 2 por Parque Nacional da Chapada dos Guimarães–GO (PNG), Brasília–DF (BSB), Caldas Novas–GO (CAN), Parque Nacional de Emas–GO (PNE); e o grupo 3 por Corumbá–MS (COR)

Esquema	Número de espécies (probabilidade)	Árvore de Espécies
1	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)
2	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)
3	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)
4	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)
5	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)
6	3 (1)	((Grupo 2, Grupo 1), Grupo 3)

A árvore de espécies com todos os genes construída com o programa \*BEAST reafirmou a topologia estimada pelo BP&P. A datação desta topologia mostra que a primeira divergência formando o grupo 3 teria acontecido em torno de 0,79 milhões de anos atrás (maa), enquanto que a divergência entre os grupos 1 e 2, por volta de 0,42maa, ambas ocorrendo no Pleistoceno (Figura 9).

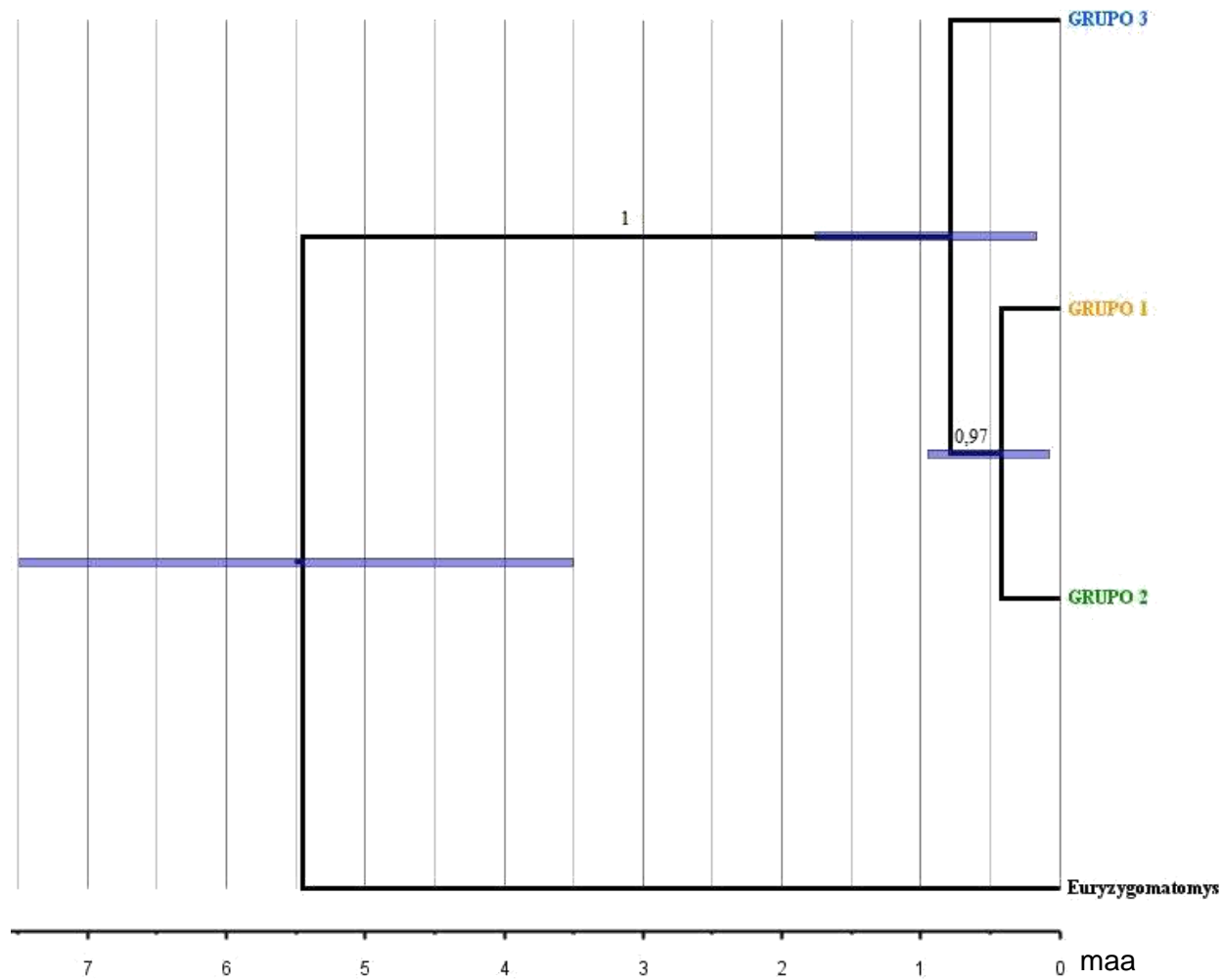


Figura 9: Árvore de espécies reconstruída no programa \*Beast. Os valores de suporte dos ramos estão apresentados em probabilidade. Calibração secundária no ponto na separação dos gêneros *Clyomys* e *Euryzygomatomys*, média 5,7 e desvio 1 (UPHAM; PATTERSON, 2015). A barra mostra o tempo de divergência dos grupos. O grupo três divergiu em 0,79maa e os grupos um e dois divergiram em 0,42maa

## 5. Discussão

Nossos resultados evidenciam a existência de três potenciais espécies dentro do gênero *Clyomys*, sendo uma de ocorrência restrita ao Cerrado do estado de São Paulo, de forma que *Clyomys bishopi* retomaria o status de espécie; outra na região mais central da distribuição do Cerrado, a chamada *Clyomys laticeps*; e uma terceira espécie ocorrendo em enclaves de Cerrado no Pantanal. Embora as topologias das árvores filogenéticas geradas não sejam bem estruturadas, outras análises como a de agrupamento do BAPS, as distâncias genéticas médias entre e dentro dos grupos e a análise com o BP&P indicaram fortemente a separação dos grupos confirmando estes como potenciais espécies. No caso do BP&P, as potenciais espécies foram validadas independentemente do tamanho estimado da população (grande ou pequeno) e o tempo de divergência (recente ou antigo).

Em uma análise de morfologia de crânio Bezerra e Oliveira (2010) não encontraram diferenças entre as espécies do gênero *Clyomys*, e sugeriram que estas fossem sinonimizadas e, assim, passaria a existir somente a espécie *C. laticeps*. No entanto, outros trabalhos, tanto morfológicos quanto genéticos, apontaram diferenças entre indivíduos de diferentes regiões (ARANTES, 2011; AVILA-PIRES; WUTKE, 1981; BEZERRA; OLIVEIRA, 2013; BEZERRA *et al.*, 2012; SOUZA; YONENAGA-YASSUDA, 1984; YONENAGA, 1975).

Um estudo baseado na morfologia fálica de indivíduos do Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraguai apontou diferenças no báculo entre as populações analisadas, sendo que cada uma possui uma morfologia própria do báculo (BEZERRA; OLIVEIRA, 2013). Com relação aos caracteres genéticos, foram encontradas diferenças entre cariótipos. Em Itapetininga/SP os animais possuem cariótipo

2n de 34 e o número fundamental de cromossomos autossômicos (NF) de 60, em Brasília/DF os indivíduos também apresentaram 2n=34, no entanto o NF=62, enquanto os indivíduos do Parque Nacional de Emas/GO apresentaram 2n=32 e NF=54 (BEZERRA *et al.*, 2012; SOUZA; YONENAGA-YASSUDA, 1984; YONENAGA, 1975). Outra evidência de divergência entre as populações foi apontado em um estudo com um segmento de 252pb do gene CytB, o qual revelou a existência de ao menos duas linhagens separando os animais de São Paulo (*C. bishopi*) das demais localidades do Brasil Central e Pantanal (*C. laticeps*) (ARANTES, 2011).

O rearranjo de cariótipos pode gerar isolamentos reprodutivos de populações, levando à especiações, principalmente por suprimir a recombinação entre os cromossomos (RIESEBERG, 2001). Os distintos cariótipos no gênero *Clyomys* encontrados na literatura podem estar refletindo diferenciações genéticas significativas, as quais podem não ter sido detectadas na delimitação de espécies analisando apenas o DNA. Assim, embora existam similaridades no DNA dos indivíduos de Brasília e Parque Nacional de Emas, os diferentes cariótipos podem inviabilizar a reprodução entre indivíduos.

A maioria das espécies de mamíferos apresentam distâncias médias de no mínimo 2% para o CytB (JOHNS; AVISE, 1998). Para morcegos a distância mínima encontrada por Bradley e Baker (2001) utilizando também o CytB foi de 2,5%. Em outras análises com o CytB, porém com roedores da América do Sul, foram encontradas distâncias genéticas de 1,3% dentro do gênero *Calomys* (HAAG *et al.*, 2007) e de 3% entre espécies do gênero *Akodon* (SMITH; PATTON, 1991). O gene COI também tem sido utilizado para a delimitação de espécies. Para espécies de pequenos mamíferos, esse gene apresentou distância interespecífica de no mínimo 1,5 (BORISENKO *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram valores de no mínimo 2% para 98% de 13320 espécies de



invertebrados analisados (HEBERT; RATNASINGHAM; DEWAARD, 2003) e, para aves, a menor distância encontrada foi de 1% (HEBERT *et al.*, 2004).

Desta forma, as diferenças morfológicas (AVILA-PIRES; WUTKE, 1981; BEZERRA; OLIVEIRA, 2013) e genéticas (ARANTES, 2011; BEZERRA *et al.*, 2012; SOUZA; YONENAGA-YASSUDA, 1984; YONENAGA, 1975) encontradas em outros trabalhos, bem como os valores médios de distâncias genéticas relatados na literatura para os genes mitocondriais, favorecem nosso resultado de que há isolamento genético entre as populações de São Paulo, Brasil Central e Pantanal. As altas probabilidades de ocorrência de três espécies indicadas pelo BP&P, que considera potenciais espécies aquelas em que o fluxo gênico cessa com a separação das mesmas (YANG; RANNALA, 2010), também embasam nossos resultados.

Nas nossas análises, os genes mitocondriais foram mais informativos para a delimitação das potenciais espécies. A divergência entre os resultados dos dois conjuntos de genes pode ser explicada pelas diferenças nas respostas destes aos processos evolutivos. O DNA mitocondrial é composto por uma molécula pequena, herdado por linhagem materna, e que apresentam alta taxa de mutação e rápido tempo de coalescência, enquanto que os genes nucleares levam um tempo maior para refletirem mudanças recentes, uma vez que possuem taxas de mutação menores e herança biparental (AVISE *et al.*, 1987; ZINK; BARROWCLOUGH, 2008). Em um teste empírico, comparando as respostas de genes mitocondriais e nucleares para estudos filogenéticos em 30 espécies de aves, genes mitocondriais foram bons marcadores na estimativa de divergência interpopulacionais (HUNG; DROVETSKI; ZINK, 2016).

Diferentes análises podem divergir quanto aos resultados gerados, devido ao aporte estatístico de cada análise. A inferência bayesiana leva em consideração uma topologia baseada em probabilidade bem estabelecida para iniciar sua busca da árvore

mais provável de ocorrer, enquanto que a máxima verossimilhança utiliza a frequência dos ramos para determinar as relações filogenéticas (BARKER, 2014). Por considerarem a matriz concatenada como um único segmento, as análises com esta matriz podem fazer leitura incompleta dos dados, refletindo nas topologias geradas. No entanto, a árvore de espécies diminui esses erros, pois é uma análise multilocus das relações entre populações ou espécies (LEACHÉ; RANNALA, 2011). Nesse caso, o fato de cada gene representar uma região do genoma ou de ter origens distintas é levado em consideração e reflete em uma melhor interpretação dos dados.

Giarla, Voss e Jansa (2014) também encontraram diferenças em análises com diferentes métodos e genes em estudos com espécies do gênero *Thylamys* que ocorrem ao longo dos Andes. Os autores sugerem que estas divergências se dão em função das diferentes pressões de seleção nos genes e a forma como cada método de análise interpreta os dados. Embasados por bons resultados com o programa BP&P os autores validaram as espécies crípticas da região.

Tanto na árvore de espécie estimada pelo BP&P, quanto na árvore reconstruída pelo \*BEAST, os grupos 1 e 2 agruparam mais próximos entre si e o grupo 3 ficou mais basal em comparação com os outros dois. A datação das potenciais espécies encontradas indicou que estas teriam divergido no Pleistoceno, sendo que a primeira a divergir foi a potencial espécie 3, por volta de 790 mil anos atrás, e a separação das potenciais espécies 1 e 2 teria ocorrido mais recentemente a cerca de 420 mil anos atrás.

Muitas hipóteses tentam explicar a grande diversidade existente no Cerrado. Uma hipótese amplamente explorada é a teoria do refúgio, que sugere a expansão de áreas abertas no período quaternário (HAFFER, 1969). O Pleistoceno foi um período de grandes flutuações climáticas, com sucessivos eventos de expansão e retração das áreas abertas no centro da América do Sul, e essas modificações podem ter favorecido a grande

biodiversidade existente no Cerrado por criar barreiras entre as populações (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002; RATTER; RIBEIRO; S., 1997; WERNECK *et al.*, 2012).

O surgimento de barreiras ao longo do tempo pode ter contribuído para a especiação das populações de *Clyomys*. O registro de um fóssil do gênero *Clyomys* na argentina (VUCETICH; VERZI; TONNI, 1997) evidencia uma maior distribuição do gênero em relação a atual. A especiação dentro do gênero pode ter sido favorecida por diversos motivos, como a baixa dispersão dos indivíduos, seus hábitos semi-fossoriais, seu sistema social de viver em colônias de tocas e também pela relação com a ocorrência de palmeiras do gênero *Attalea*. É possível ter havido coevolução entre os gêneros *Clyomys* e *Attalea*, uma vez que os espécimes de *Clyomys* do Pantanal e de São Paulo apresentam associação com diferentes espécies deste gênero de palmeira.

## 6. Considerações Finais

Apesar das resoluções das árvores filogenéticas não serem claras quanto à delimitação das diferentes espécies dentro do gênero *Clyomys*, o suporte estatístico que encontramos nas análises multilocus nos permite acreditar na provável existência de mais de uma potencial espécie para o gênero *Clyomys*. Nossos dados indicam a existência de uma potencial espécie na região do Pantanal. A subespécie *C. laticeps whartoni* descrita por Moojen em 1952 na região do Chaco Paraguai, por ser geograficamente próximo ao Pantanal, pode corroborar a validação da potencial espécie referente ao grupo 3, mas para isso seria interessante o desenvolvimento de análises com indivíduos proveniente do Chaco Paraguai a fim de identificar uma possível relação com os indivíduos do Pantanal. A inconsistência das relações nas topologias e o compartilhamento de haplótipos são evidências de que a divergência entre as potenciais

espécies analisadas tenha ocorrido recentemente e ainda não está bem estruturada nos genes nucleares. No entanto, os genes mitocondriais já deixam claro a separação das mesmas.

Com a separação das espécies, *C. bishopi* retorna ao nível de espécie, interferindo diretamente nas políticas de conservação voltadas para ela, que é endêmica do Cerrado do estado de São Paulo. Como esta região sofre historicamente com desmatamento e a alta pressão antrópica, provocando altos índices de perda e fragmentação de habitat, a ocorrência de uma espécie endêmica mostra a necessidade de programas eficazes de conservação e manejo. Além disso, nossos resultados e a literatura indica a existências de grupos genéticos desconhecidos apontando a necessidade de políticas de conservação das áreas de ocorrência de todo o gênero.

## 7. Referências Bibliográficas

- ADKINS, R. M. et al. Molecular Phylogeny and Divergence Time Estimates for Major Rodent Groups: Evidence from Multiple Genes. **Mol Biol Evol**, v. 18, n. 1996, p. 777–791, 2001.
- ALHO, C. J. R. et al. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: I - levantamento preliminar de espécies. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, n. 2, p. 151–164, 1987.
- ALMEIDA, L. DE B.; GALETTI, M. Seed dispersal and spatial distribution of *Attalea geraensis* (Arecaceae) in two remnants of Cerrado in Southeastern Brazil. **Acta Oecologica**, v. 32, n. 2, p. 180–187, 2007.
- ARANTES, A. C. R. **Avaliação do status taxonômico e análise populacional de *Clyomys bishopi*, um roedor endêmico dos Cerrados do estado de São Paulo.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- AVILA-PIRES, F. D. DE; WUTKE, M. R. C. Taxonomia e Evolução de *Clyomys* Thomas, 1916 (Rodentia, Echimyidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, n. 3, p. 529–534, 1981.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489–522, 1987.
- BANDELT, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- BARKER, D. Seeing the wood for the trees: philosophical aspects of classical, Bayesian

- and likelihood approaches in statistical inference and some implications for phylogenetic analysis. **Biology and Philosophy**, v. 30, n. 4, p. 505–525, 2014.
- BARROS, R. C. H. et al. Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 138, n. 1, p. 97–104, 2004.
- BECKER, R. G. et al. Estrutura de comunidades de pequenos mamíferos e densidade de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Sigmodontinae) em áreas abertas de cerrado no Brasil. **Mastozoología Neotropical**, v. 14, n. 2, p. 157–168, 2007.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a Ecossistemas**. 4<sup>o</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- BEZERRA, A. M. R. et al. A new karyotype for the spiny rat *Clyomys laticeps* (Thomas, 1909) (Rodentia, Echimyidae) from Central Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 153–161, 2012.
- BEZERRA, A. M. R.; OLIVEIRA, J. A. DE. Taxonomic implications of cranial morphometric variation in the genus *Clyomys* Thomas, 1916 (Rodentia: Echimyidae). **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 1, p. 260–272, 2010.
- BEZERRA, A. M. R.; OLIVEIRA, J. A. DE. Variação geográfica na morfologia fálica em *Clyomys laticeps* (Thomas, 1909) (Rodentia, Echimyidae, Eumysopinae). **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 66, n. 2010, p. 1–8, 2013.
- BISHOP, I. R. an Annotated List of Caviomorph Rodents Collected in North-Eastern Mato Grosso Brazil. **Mammalia**, v. 38, n. 3, 1974.
- BLANGA-KANFI, S. et al. Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 71, 2009.

- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A. DE; D'ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. v. 1
- BORISENKO, A. V. et al. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: A field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 3, p. 471–479, 2008.
- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A Test of the Genetic Species Concept: Cytochrome-b Sequences and Mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 960–973, 2001.
- BUENO, A. D. A. et al. Association of the “IUCN vulnerable” spiny rat *Clyomys bishopi* (Rodentia: Echimyidae) with palm trees and armadillo burrows in southeastern Brazil. **Revista de Biología Tropical**, v. 52, n. 4, p. 1009 – 1011, 2004.
- BURDA, H. et al. Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 47, n. 5, p. 293–303, 2000.
- CAMARGO, A.; SITES, J. J. Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. In: PAVLINOV, I. Y. (Ed.). . **The species problem - ongoing issues**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 225–247.
- CAMILO, A. R. et al. Ocupação de Manchas Florestais no Pantanal por duas Espécies de Roedores: *Clyomys laticeps* e *Thrichomys pachyurus*. **Simpósio Sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal**, v. 2010, p. 1–6, 2010.
- CAMPBELL, N. A. et al. **Biology**. 8<sup>a</sup>. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2008.
- CAÑÓN, C. et al. A multilocus perspective on the phylogenetic relationships and diversification of rodents of the tribe Abrotrichini (Cricetidae: Sigmodontinae). **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 5, p. 443–454, 2014.

- CARLETON, M. D; MUSSER, G. G. Order Rodentia. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). . **Mammal Species of the World**. 3°. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p. 745 – 752.
- CARMIGNOTTO, A. P.; VIVO, M. DE; LANGGUTH, A. R. Mammals of Cerrado and Caatinga: Distribution Patterns of the Tropical Open Biomes of Central South America. In: PATTERSON, B. D.; COSTA, L. P. (Eds.). . **Bones Clones and Biomes: The History and Geography of Recent Neotropical Mammals**. 1. ed. Chicago: The University of Chicago Press, 2012. p. 307–350.
- CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 539, 2008.
- COSTA, C. DA P.; CUNHA, C. DA N.; COSTA, S. C. Caracterização da flora e estrutura do estrato arbustivo-arbóreo de um cerrado no Pantanal de Poconé , MT Introdução Material e Métodos. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 61–73, 2010.
- EITEN, G. The Cerrado Vegetation of Brazil. **Botanical review**, v. 38, n. 2, p. 201–341, 1972.
- FABRE, P.-H. et al. Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. **Zoologica Scripta**, v. 42, n. 2, p. 117–134, 2013.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.
- FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise Evolutiva**. 4<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Artmed, 2009.
- GALEWSKI, T. et al. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 601–615, 2005.



- GIARLA, T. C.; VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Hidden diversity in the Andes: Comparison of species delimitation methods in montane marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 70, n. 1, p. 137–151, 2014.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.
- HAAG, T. et al. Phylogenetic Relationships among Species of the Genus *Calomys* with Emphasis on South American Lowland Taxa. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 3, p. 769–776, 2007.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131–137, 1969.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.
- HEBERT, P.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, n. August 2003, p. 96–99, 2003.
- HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 3, p. 570–580, 2010.
- HICKSON, R. E.; SIMON, C.; PERREY, S. W. The performance of several multiple-sequence alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 530–539, 2000.

- HILLEBRAND, H. On the Generality of the Latitudinal Diversity Gradient. **The American Naturalist**, v. 163, n. 2, p. 192–211, 2004.
- HUCHON, D. et al. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. **Molecular biology and evolution**, v. 19, n. 7, p. 1053–1065, 2002.
- HUCHON, D.; CATZEFLIS, F. M.; DOUZERY, E. J. Molecular evolution of the nuclear von Willebrand factor gene in mammals and the phylogeny of rodents. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 5, p. 577–589, 1999.
- HUNG, C.-M.; DROVETSKI, S. V; ZINK, R. M. Matching loci surveyed to questions asked in phylogeography. **Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences**, p. 12–14, 2016.
- JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 11, p. 1481–1490, 1998.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 12, p. 1647–9, 2012.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado.pdf. v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.
- LACHER, T. E.; ALHO, C. J. R. Microhabitat Use among Small Mammals in the Brazilian Pantanal. **Journal of Mammalogy**, v. 70, n. 2, p. 396–401, 1989.

- LEACHÉ, A. D.; FUJITA, M. K. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 277, n. 1697, p. 3071–3077, 2010.
- LEACHÉ, A. D.; RANNALA, B. The accuracy of species tree estimation under simulation: A comparison of methods. **Systematic Biology**, v. 60, n. 2, p. 126–137, 2011.
- LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): The star-phylogeny hypothesis revisited. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, n. 3, p. 455–464, 2002.
- LESSA, E. P. et al. Rodent diversity in South America: transitioning into the genomics era. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 2, n. July, p. 1–7, 2014.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S. K. Introductory remarks: Genetics and Conservation Biology. In: LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S. K. (Eds.). . **Conservation Genetics**. 1. ed. Boston: Springer Basel AG, 1994. p. 3 – 8.
- LOSS, A. C. **Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.
- MAESTRI, R.; PATTERSON, B. D. Patterns of species richness and turnover for the South American rodent fauna. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. DE M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o Método da Parcimônia. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. DE C. (Eds.). . **Biologia Molecular e Evolução**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2012. p. 113 – 122.

- MMA/IBAMA. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite: monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010**. 1. ed. Brasília: [s.n.]. v. 1
- MMA, M. DO MEIO AMBIENTE. **PPCerrado - Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado:2<sup>a</sup> fase (2014-2015)**. 1. ed. Brasília: [s.n.]. v. 1
- MOOJEN, J. A new *Clyomys* from Paraguay (Rodentia : Echimyidae). **Journal of the Washington Academy Sciences**, v. 42, n. 3, p. 102, 1952.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Eds.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. 1. ed. New York: Columbia University Press, 2002. p. 91–120.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. 1. ed. Londrina: [s.n.].
- RAMBAUT, A. et al. **Tracer v1.6**, 2014.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. **Genetics**, v. 194, n. 1, p. 245–253, 2013.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; S., B. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223–230, 1997.
- RIESEBERG, L. H. Chromosomal Rearrangements and Speciation in Animals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 351–358, 2001.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

- SAMPAIO, C. DE; CAMILO-ALVES, P.; MOURÃO, G. DE M. Palms use a bluffing strategy to avoid seed predation by rats in Brazil. **Biotropica**, v. 42, n. 2, p. 167–173, 2010.
- SILVA, J. M. C. DA; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225 – 233, 2002.
- SILVA, J. F. et al. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 536–548, 2006.
- SILVA, J. M. C. Birds of the Cerrado Region, South America. **Steenstrupia**, v. 21, n. SEPTEMBER 1995, p. 69–92, 1995.
- SMITH, M. F.; PATTON, J. L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). **Molecular biology and evolution**, v. 8, n. 1, p. 85–103, 1991.
- SOLÉ-CAVA, A.; CUNHA, H. A. A genética e a conservação da natureza. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. DE C. (Eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2012. p. 217 – 223.
- SOUZA, M. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. G- and C- band patterns and nucleolus organizer regions in somatic chromosomes of *Clyomys laticeps laticeps* (Rodentia, Echimyidae). **Experientia**, v. 40, n. 1, p. 96–97, 1984.
- THOMAS, O. Notes on some South-American Mammals, with Descriptions of new Species. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 4, n. 8, p. 230–242, 1909.
- THOMAS, O. Some Notes on the Echimyinae. **Annals and Magazine of Natural History**, v. xviii, n. 1916, p. 294 – 301, 1916.

- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193–1213, 2013.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Guia prático para estudos filogeográficos**. [s.l.] SBG, 2014.
- UPHAM, N. S.; PATTERSON, B. D. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 2, p. 417–429, 2012.
- UPHAM, N. S.; PATTERSON, B. D. Evolution of caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. In: VASSALLO, A. I.; ANTENICCI, D. (Eds.). . **Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution**. Buenos Aires: SAREM Series A, 2015. v. 1p. 63–120.
- VAWTER, L.; BROWN, W. M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 234, n. 4773, p. 194–196, 1986.
- VIEIRA, M. V. **Dinâmica de populações, variação sazonal de nichos e seleção de microhabitats numa comunidade de roedores de cerrado brasileiro**. [s.l: s.n.].
- VIEIRA, M. V. **Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil***Revista Brasileira de Biologia*, 1997.
- VUCETICH, M. G.; VERZI, D. H.; TONNI, E. P. Paleoclimatic implications of the presence of *Clyomys* (Rodentia, Echimyidae) in the Pleistocene of central Argentina. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 128, n. 1-4, p. 207–214, 1997.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions**

of the Royal Society of London. **Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 2005.

WERNECK, F. P. et al. Deep diversification and long-term persistence in the south american “dry diagonal”: Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. **Evolution**, v. 66, n. 10, p. 3014–3034, 2012.

WICKLIFFE, J. K. et al. 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**, v. 219, n. 1, p. 1–6, 2003.

XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720 – 1728, 2013.

YANG, Z. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. **Current Zoology**, v. 61, n. 5, p. 854–865, 2015.

YANG, Z.; RANNALA, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9264–9269, 2010.

YONENAGA, Y. Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. **Caryologia**, v. 28, n. 3, p. 269–286, 1975.

ZINK, R. M.; BARROWCLOUGH, G. F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 9, p. 2107–2121, 2008.

## 8. Anexos

Anexo 1: Números de acessos das sequencias dos grupos externos retiradas do GenBank.

INDIVÍDUO	GENE CYTB	GENE COI	GENE VWF	GENE GHR
<i>Capromys pilorides</i>	JF297657.1		AJ251142.1	KM013983.1
<i>Carterodon sulcidens</i>	KJ742666.1		KJ742615.1	KJ742640.1
<i>Euryzomatomys spinosus</i>	JF297804.1	JF297657.1	JF297706.1	KJ742629.1
<i>Trinomys iheringi</i>	EU313254.1		KF590677.1	KF590695.1
<i>Myocastor coypus</i>	EU544663.1		AJ251140.1	AF520662.1
<i>Callistomys pictus</i>	KJ742659.1		KJ742614.1	KJ742627.1
<i>Hoplomys gymnurus</i>	AF422922.1		JN415080.1	AF520661.1
<i>Proechimys cuvieri</i>	AJ251400.1		KF590675.1	KF590693.1



Anexo 2: Tabela com indivíduos utilizados nas análises, suas localidades e os genes sequenciados para cada um.

INDIVÍDUO	LOCALIDADE	GENE CYTB	GENE COI	GENE VWF	GENE GHR	GENE BIFIB
CBI36	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI37	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI38	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI39	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI40	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI41	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI42	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
CBI43	Itirapina - SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD214	Itapetininga - SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD216	Itapetininga – SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD217	Itapetininga – SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD218	Itapetininga – SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD219	Itapetininga – SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD220	Itapetininga - SP	✓	✓	✓	✓	✓
ROD209	P. N. Brasília - DF	✓	✓	✓	✓	✓
ROD210	P. N. Brasília – DF	✓	✓	✓	✓	✓
ROD36	P. N. Emas – GO	✓	✓	✓	✓	✓
ROD40	P. N. Emas – GO	✓	✓	✓	✓	✓
ROD41	P. N. Emas – GO	✓	✓	✓	✓	✓
2073	Caldas Novas - GO	✓	✓	✓	✓	✓
2074	Caldas Novas - GO	✓	✓	✓	✓	✓
2075	Caldas Novas - GO	✓	✓	✓	✓	X
ROD14	P. N. Chapada dos Guimarães - MT	✓	✓	✓	✓	✓
ROD15	P. N. Chapada dos Guimarães – MT	✓	✓	✓	✓	✓
ROD16	P. N. Chapada dos Guimarães – MT	✓	✓	✓	✓	✓
ROD17	P. N. Chapada dos Guimarães – MT	✓	✓	✓	✓	✓
ROD18	P. N. Chapada dos Guimarães – MT	✓	✓	✓	✓	✓
P1	Corumbá - MS	✓	✓	✓	✓	✓
P2	Corumbá – MS	✓	✓	✓	✓	✓
P3	Corumbá – MS	✓	✓	✓	✓	✓
P4	Corumbá – MS	✓	✓	✓	✓	✓
P5	Corumbá – MS	✓	✓	✓	✓	✓
P6	Corumbá - MS	✓	✓	✓	✓	✓

Anexo 3: Matriz de distâncias do gene CytB calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	2073	2074	2075	Cbi36	Cbi37	Cbi38	Cbi39	Cbi40	Cbi41	Cbi42	Cbi43	P1	P2	P3	P4	P5	P6
2073																	
2074	0.002																
2075	0.005	0.003															
Cbi36	0.031	0.032	0.032														
Cbi37	0.029	0.031	0.031	0.016													
Cbi38	0.031	0.033	0.033	0.014	0.009												
Cbi39	0.031	0.033	0.033	0.014	0.002	0.007											
Cbi40	0.031	0.033	0.033	0.014	0.009	0.000	0.007										
Cbi41	0.029	0.031	0.031	0.016	0.000	0.009	0.002	0.009									
Cbi42	0.027	0.029	0.029	0.010	0.005	0.003	0.003	0.003	0.005								
Cbi43	0.029	0.031	0.031	0.012	0.003	0.005	0.002	0.005	0.003	0.002							
P1	0.016	0.018	0.018	0.032	0.031	0.033	0.033	0.033	0.031	0.029	0.031						
P2	0.012	0.014	0.014	0.029	0.027	0.025	0.029	0.025	0.027	0.025	0.027	0.014					
P3	0.012	0.014	0.014	0.029	0.027	0.029	0.029	0.029	0.027	0.025	0.027	0.014	0.003				
P4	0.064	0.067	0.067	0.067	0.069	0.066	0.071	0.066	0.069	0.066	0.069	0.067	0.054	0.050			
P5	0.067	0.069	0.069	0.069	0.071	0.069	0.073	0.069	0.071	0.069	0.071	0.069	0.056	0.052	0.002		
P6	0.023	0.025	0.025	0.036	0.038	0.036	0.040	0.036	0.038	0.036	0.038	0.025	0.014	0.010	0.038	0.040	
Rod14	0.010	0.012	0.016	0.034	0.033	0.035	0.035	0.035	0.033	0.031	0.033	0.023	0.016	0.016	0.069	0.071	0.027
Rod15	0.010	0.012	0.016	0.034	0.033	0.035	0.035	0.035	0.033	0.031	0.033	0.023	0.016	0.016	0.069	0.071	0.027
Rod16	0.009	0.010	0.014	0.036	0.035	0.037	0.037	0.037	0.035	0.033	0.035	0.021	0.014	0.014	0.067	0.069	0.025
Rod17	0.009	0.010	0.014	0.036	0.035	0.037	0.037	0.037	0.035	0.033	0.035	0.021	0.014	0.014	0.062	0.065	0.025
Rod18	0.010	0.012	0.016	0.034	0.033	0.035	0.035	0.035	0.033	0.031	0.033	0.023	0.016	0.016	0.069	0.071	0.027
Rod36	0.020	0.021	0.018	0.038	0.037	0.038	0.038	0.038	0.037	0.035	0.037	0.025	0.018	0.018	0.071	0.073	0.029
Rod40	0.018	0.020	0.016	0.036	0.035	0.037	0.037	0.037	0.035	0.033	0.035	0.023	0.016	0.016	0.069	0.071	0.027
Rod41	0.007	0.009	0.012	0.031	0.029	0.031	0.031	0.031	0.029	0.027	0.029	0.016	0.012	0.012	0.065	0.067	0.023
Rod209	0.009	0.010	0.014	0.032	0.031	0.032	0.032	0.032	0.031	0.029	0.031	0.025	0.019	0.019	0.064	0.066	0.031
Rod210	0.009	0.010	0.014	0.036	0.034	0.036	0.036	0.036	0.034	0.032	0.034	0.025	0.019	0.019	0.064	0.066	0.031
Rod214	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034
Rod216	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034
Rod217	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034
Rod218	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034
Rod219	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034
Rod220	0.025	0.027	0.027	0.005	0.010	0.009	0.009	0.009	0.010	0.005	0.007	0.027	0.023	0.023	0.064	0.066	0.034

Continuação Anexo 3: Matriz de distâncias do gene CytB calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	Rod14	Rod15	Rod16	Rod17	Rod18	Rod36	Rod40	Rod41	Rod209	Rod210	Rod214	Rod216	Rod217	Rod218	Rod219	Rod220
2073																
2074																
2075																
Cbi36																
Cbi37																
Cbi38																
Cbi39																
Cbi40																
Cbi41																
Cbi42																
Cbi43																
P1																
P2																
P3																
P4																
P5																
P6																
Rod14																
Rod15	0.000															
Rod16	0.005	0.005														
Rod17	0.005	0.005	0.003													
Rod18	0.000	0.000	0.005	0.005												
Rod36	0.023	0.023	0.021	0.021	0.023											
Rod40	0.021	0.021	0.020	0.020	0.021	0.002										
Rod41	0.014	0.014	0.009	0.012	0.014	0.020	0.018									
Rod209	0.018	0.018	0.016	0.016	0.018	0.027	0.025	0.016								
Rod210	0.018	0.018	0.016	0.016	0.018	0.027	0.025	0.016	0.003							
Rod214	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031						
Rod216	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031	0.000					
Rod217	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031	0.000	0.000				
Rod218	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031	0.000	0.000	0.000			
Rod219	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000		
Rod220	0.029	0.029	0.031	0.031	0.029	0.033	0.031	0.025	0.027	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Anexo 4: Matriz de distâncias do gene COI calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	2073	2074	2075	Cbi36	Cbi37	Cbi38	Cbi39	Cbi40	Cbi41	Cbi42	Cbi43	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
2073																		
2074	0.003																	
2075	0.003	0.000																
Cbi36	0.035	0.033	0.033															
Cbi37	0.035	0.033	0.033	0.000														
Cbi38	0.035	0.033	0.033	0.000	0.000													
Cbi39	0.037	0.035	0.035	0.002	0.002	0.002												
Cbi40	0.035	0.033	0.033	0.000	0.000	0.000	0.002											
Cbi41	0.035	0.033	0.033	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000										
Cbi42	0.037	0.035	0.035	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002									
Cbi43	0.035	0.033	0.033	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002								
P1	0.030	0.030	0.030	0.049	0.049	0.049	0.051	0.049	0.049	0.051	0.049							
P2	0.032	0.032	0.032	0.051	0.051	0.051	0.053	0.051	0.051	0.053	0.051	0.002						
P3	0.028	0.028	0.028	0.047	0.047	0.047	0.049	0.047	0.047	0.049	0.047	0.002	0.003					
P4	0.028	0.028	0.028	0.045	0.045	0.045	0.047	0.045	0.045	0.047	0.045	0.008	0.010	0.007				
P5	0.028	0.028	0.028	0.045	0.045	0.045	0.047	0.045	0.045	0.047	0.045	0.008	0.010	0.007	0.000			
P6	0.028	0.028	0.028	0.045	0.045	0.045	0.047	0.045	0.045	0.047	0.045	0.008	0.010	0.007	0.000	0.000		
Rod14	0.008	0.008	0.008	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.028	0.030	0.026	0.026	0.026	0.026	
Rod15	0.008	0.008	0.008	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.028	0.030	0.026	0.026	0.026	0.026	0.000
Rod16	0.010	0.010	0.010	0.043	0.043	0.043	0.045	0.043	0.043	0.045	0.043	0.026	0.028	0.024	0.028	0.028	0.028	0.005
Rod17	0.014	0.014	0.014	0.043	0.043	0.043	0.045	0.043	0.043	0.045	0.043	0.034	0.036	0.032	0.032	0.032	0.032	0.005
Rod18	0.008	0.008	0.008	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.028	0.030	0.026	0.026	0.026	0.026	0.000
Rod36	0.023	0.023	0.023	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.024	0.026	0.023	0.023	0.023	0.023	0.017
Rod40	0.023	0.023	0.023	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.024	0.026	0.023	0.023	0.023	0.023	0.017
Rod41	0.019	0.019	0.019	0.037	0.037	0.037	0.039	0.037	0.037	0.039	0.037	0.017	0.019	0.015	0.019	0.019	0.019	0.017
Rod209	0.007	0.007	0.007	0.032	0.032	0.032	0.034	0.032	0.032	0.034	0.032	0.030	0.032	0.028	0.028	0.028	0.028	0.008
Rod210	0.007	0.007	0.007	0.032	0.032	0.032	0.034	0.032	0.032	0.034	0.032	0.030	0.032	0.028	0.028	0.028	0.028	0.008
Rod214	0.039	0.037	0.037	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.003	0.053	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.041
Rod216	0.041	0.039	0.039	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005	0.005	0.007	0.005	0.055	0.057	0.053	0.051	0.051	0.051	0.043
Rod217	0.039	0.037	0.037	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.003	0.053	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.041
Rod218	0.039	0.037	0.037	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.003	0.053	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.041
Rod219	0.039	0.037	0.037	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.003	0.053	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.041
Rod220	0.039	0.037	0.037	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.003	0.053	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.041

Continuação Anexo 4: Matriz de distâncias do gene COI calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	Rod14	Rod15	Rod16	Rod17	Rod18	Rod36	Rod40	Rod41	Rod209	Rod210	Rod214	Rod216	Rod217	Rod218	Rod219
2073															
2074															
2075															
Cbi36															
Cbi37															
Cbi38															
Cbi39															
Cbi40															
Cbi41															
Cbi42															
Cbi43															
P1															
P2															
P3															
P4															
P5															
P6															
Rod14															
Rod15															
Rod16	0.005														
Rod17	0.005	0.010													
Rod18	0.000	0.005	0.005												
Rod36	0.017	0.023	0.023	0.017											
Rod40	0.017	0.023	0.023	0.017	0.000										
Rod41	0.017	0.015	0.023	0.017	0.010	0.010									
Rod209	0.008	0.014	0.014	0.008	0.015	0.015	0.019								
Rod210	0.008	0.014	0.014	0.008	0.015	0.015	0.019	0.000							
Rod214	0.041	0.047	0.047	0.041	0.041	0.041	0.041	0.035	0.035						
Rod216	0.043	0.049	0.049	0.043	0.043	0.043	0.043	0.037	0.037	0.002					
Rod217	0.041	0.047	0.047	0.041	0.041	0.041	0.041	0.035	0.035	0.000	0.002				
Rod218	0.041	0.047	0.047	0.041	0.041	0.041	0.041	0.035	0.035	0.000	0.002	0.000			
Rod219	0.041	0.047	0.047	0.041	0.041	0.041	0.041	0.035	0.035	0.000	0.002	0.000	0.000		
Rod220	0.041	0.047	0.047	0.041	0.041	0.041	0.041	0.035	0.035	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	

Anexo 5: Matriz de distâncias dos genes mitocondriais concatenados calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	2073	2074	2075	Cbi36	Cbi37	Cbi38	Cbi39	Cbi40	Cbi41	Cbi42	Cbi43	P1	P2	P3	P4	P5	P6
2073																	
2074	0.003																
2075	0.004	0.002															
Cbi36	0.033	0.033	0.033														
Cbi37	0.032	0.032	0.032	0.008													
Cbi38	0.033	0.033	0.033	0.007	0.004												
Cbi39	0.034	0.034	0.034	0.008	0.002	0.004											
Cbi40	0.033	0.033	0.033	0.007	0.004	0.000	0.004										
Cbi41	0.032	0.032	0.032	0.008	0.000	0.004	0.002	0.004									
Cbi42	0.032	0.032	0.032	0.006	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003								
Cbi43	0.032	0.032	0.032	0.006	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002							
P1	0.023	0.024	0.024	0.041	0.040	0.041	0.042	0.041	0.040	0.040	0.040						
P2	0.022	0.023	0.023	0.040	0.039	0.038	0.041	0.038	0.039	0.039	0.039	0.008					
P3	0.020	0.021	0.021	0.038	0.037	0.038	0.039	0.038	0.037	0.037	0.037	0.008	0.003				
P4	0.046	0.047	0.047	0.056	0.057	0.056	0.059	0.056	0.057	0.057	0.057	0.036	0.031	0.027			
P5	0.047	0.048	0.048	0.057	0.058	0.057	0.060	0.057	0.058	0.058	0.058	0.037	0.032	0.028	0.001		
P6	0.026	0.027	0.027	0.041	0.042	0.041	0.044	0.041	0.042	0.042	0.042	0.017	0.012	0.009	0.018	0.019	
Rod14	0.009	0.010	0.012	0.036	0.035	0.036	0.037	0.036	0.035	0.035	0.035	0.026	0.023	0.021	0.047	0.048	0.027
Rod15	0.009	0.010	0.012	0.036	0.035	0.036	0.037	0.036	0.035	0.035	0.035	0.026	0.023	0.021	0.047	0.048	0.027
Rod16	0.009	0.010	0.012	0.040	0.039	0.040	0.041	0.040	0.039	0.039	0.039	0.024	0.021	0.019	0.047	0.048	0.027
Rod17	0.011	0.012	0.014	0.040	0.039	0.040	0.041	0.040	0.039	0.039	0.039	0.028	0.025	0.023	0.047	0.048	0.028
Rod18	0.009	0.010	0.012	0.036	0.035	0.036	0.037	0.036	0.035	0.035	0.035	0.026	0.023	0.021	0.047	0.048	0.027
Rod36	0.021	0.022	0.020	0.038	0.037	0.038	0.039	0.038	0.037	0.037	0.037	0.025	0.022	0.020	0.046	0.047	0.026
Rod40	0.020	0.021	0.019	0.037	0.036	0.037	0.038	0.037	0.036	0.036	0.036	0.024	0.021	0.019	0.045	0.046	0.025
Rod41	0.013	0.014	0.016	0.034	0.033	0.034	0.035	0.034	0.033	0.033	0.033	0.017	0.016	0.014	0.041	0.042	0.021
Rod209	0.008	0.009	0.010	0.032	0.031	0.032	0.033	0.032	0.031	0.031	0.031	0.028	0.026	0.024	0.046	0.047	0.029
Rod210	0.008	0.009	0.010	0.034	0.033	0.034	0.035	0.034	0.033	0.033	0.033	0.028	0.026	0.024	0.046	0.047	0.029
Rod214	0.032	0.032	0.032	0.004	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.040	0.039	0.037	0.057	0.058	0.042
Rod216	0.033	0.033	0.033	0.005	0.008	0.007	0.008	0.007	0.008	0.006	0.006	0.041	0.040	0.038	0.058	0.059	0.043
Rod217	0.032	0.032	0.032	0.004	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.040	0.039	0.037	0.057	0.058	0.042
Rod218	0.032	0.032	0.032	0.004	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.040	0.039	0.037	0.057	0.058	0.042
Rod219	0.032	0.032	0.032	0.004	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.040	0.039	0.037	0.057	0.058	0.042
Rod220	0.032	0.032	0.032	0.004	0.007	0.006	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.040	0.039	0.037	0.057	0.058	0.042

Continuação Anexo 5: Matriz de distâncias dos genes mitocondriais concatenados calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	Rod14	Rod15	Rod16	Rod17	Rod18	Rod36	Rod40	Rod41	Rod209	Rod210	Rod214	Rod216	Rod217	Rod218	Rod219	Rod220
2073																
2074																
2075																
Cbi36																
Cbi37																
Cbi38																
Cbi39																
Cbi40																
Cbi41																
Cbi42																
Cbi43																
P1																
P2																
P3																
P4																
P5																
P6																
Rod14																
Rod15	0.000															
Rod16	0.005	0.005														
Rod17	0.005	0.005	0.007													
Rod18	0.000	0.000	0.005	0.005												
Rod36	0.020	0.020	0.022	0.022	0.020											
Rod40	0.019	0.019	0.021	0.021	0.019	0.001										
Rod41	0.016	0.016	0.012	0.017	0.016	0.015	0.014									
Rod209	0.013	0.013	0.015	0.015	0.013	0.021	0.020	0.017								
Rod210	0.013	0.013	0.015	0.015	0.013	0.021	0.020	0.017	0.002							
Rod214	0.035	0.035	0.039	0.039	0.035	0.037	0.036	0.033	0.031	0.033						
Rod216	0.036	0.036	0.040	0.040	0.036	0.038	0.037	0.034	0.032	0.034	0.001					
Rod217	0.035	0.035	0.039	0.039	0.035	0.037	0.036	0.033	0.031	0.033	0.000	0.001				
Rod218	0.035	0.035	0.039	0.039	0.035	0.037	0.036	0.033	0.031	0.033	0.000	0.001	0.000			
Rod219	0.035	0.035	0.039	0.039	0.035	0.037	0.036	0.033	0.031	0.033	0.000	0.001	0.000	0.000		
Rod220	0.035	0.035	0.039	0.039	0.035	0.037	0.036	0.033	0.031	0.033	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	

Anexo 6: Matriz de distâncias do gene vWF calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	2073	2074	2075	Cbi36	Cbi37	Cbi38	Cbi39	Cbi40	Cbi41	Cbi42	Cbi43	P1	P2	P3	P4	P5	P6
2073																	
2074	0.015																
2075	0.015	0.000															
Cbi36	0.000	0.015	0.015														
Cbi37	0.000	0.015	0.015	0.000													
Cbi38	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000												
Cbi39	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000											
Cbi40	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000										
Cbi41	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
Cbi42	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
Cbi43	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
P1	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010						
P2	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000					
P3	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000				
P4	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000			
P5	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000		
P6	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Rod14	0.005	0.010	0.010	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Rod15	0.005	0.021	0.021	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Rod16	0.010	0.015	0.015	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod17	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod18	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod36	0.010	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Rod40	0.015	0.010	0.010	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Rod41	0.015	0.000	0.000	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Rod209	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod210	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod214	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod216	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod217	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod218	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod219	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Rod220	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010



Continuação Anexo 6: Matriz de distâncias do gene vWF calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	Rod14	Rod15	Rod16	Rod17	Rod18	Rod36	Rod40	Rod41	Rod209	Rod210	Rod214	Rod216	Rod217	Rod218	Rod219	Rod220
2073																
2074																
2075																
Cbi36																
Cbi37																
Cbi38																
Cbi39																
Cbi40																
Cbi41																
Cbi42																
Cbi43																
P1																
P2																
P3																
P4																
P5																
P6																
Rod14																
Rod15	0.010															
Rod16	0.005	0.005														
Rod17	0.005	0.005	0.010													
Rod18	0.005	0.005	0.010	0.000												
Rod36	0.005	0.015	0.010	0.010	0.010											
Rod40	0.010	0.010	0.005	0.015	0.015	0.005										
Rod41	0.010	0.021	0.015	0.015	0.015	0.005	0.010									
Rod209	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015								
Rod210	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000							
Rod214	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000						
Rod216	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000					
Rod217	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000				
Rod218	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
Rod219	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
Rod220	0.005	0.005	0.010	0.000	0.000	0.010	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

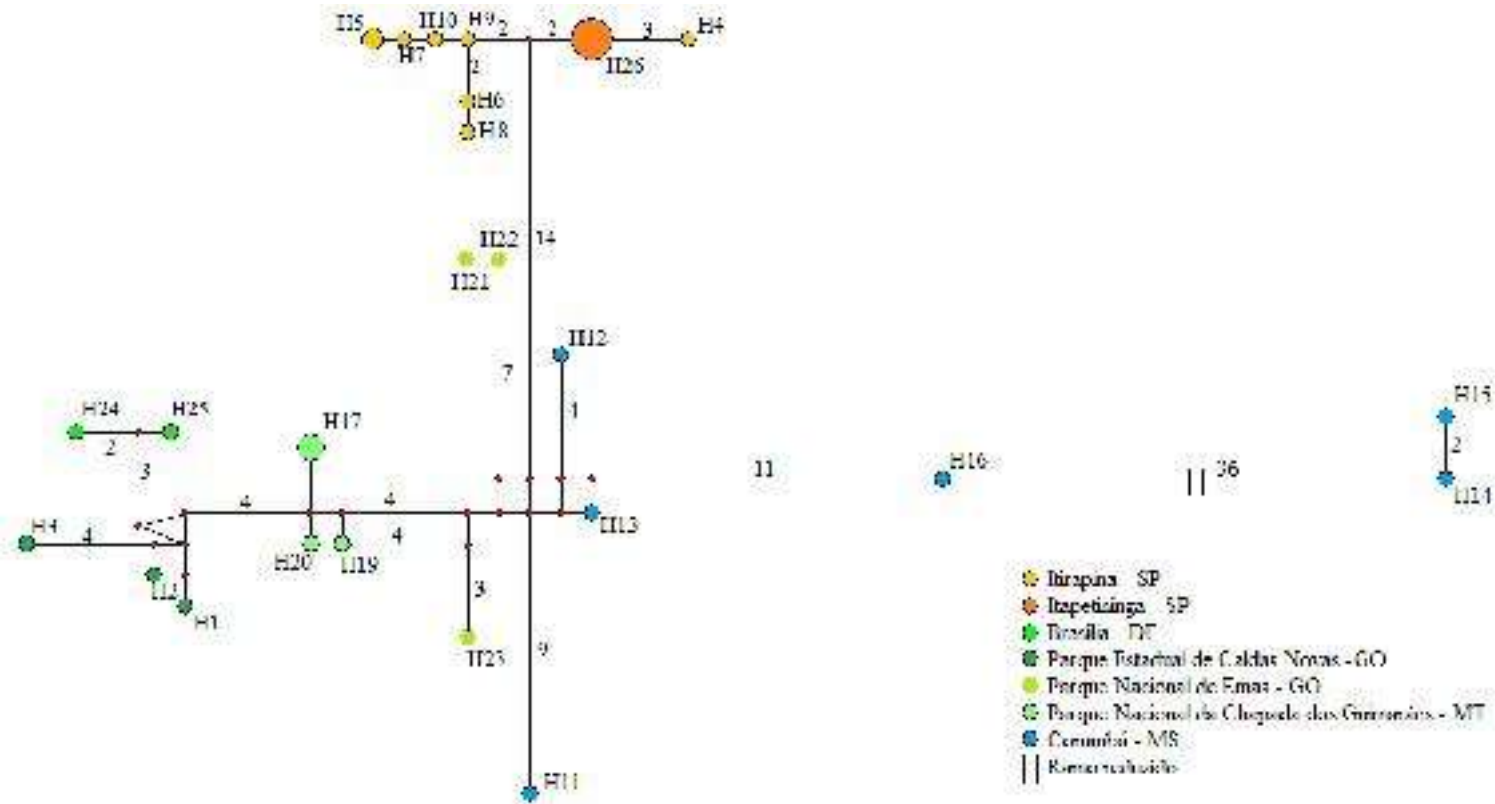
Anexo 7: Matriz de distâncias do gene BFIB calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

	2073	2074	Cbi36	Cbi37	Cbi38	Cbi39	Cbi40	Cbi41	Cbi42	Cbi43	P1	P2	P3	P4	P5	P6
2073																
2074	0.004															
Cbi36	0.002	0.002														
Cbi37	0.002	0.002	0.000													
Cbi38	0.002	0.002	0.000	0.000												
Cbi39	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000											
Cbi40	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000										
Cbi41	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
Cbi42	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
Cbi43	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
P1	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010						
P2	0.015	0.015	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.006					
P3	0.010	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.002	0.008				
P4	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.006	0.002			
P5	0.015	0.015	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.006	0.000	0.008	0.006		
P6	0.017	0.017	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.004	0.002	0.006	0.004	0.002	
Rod14	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	0.002	0.006	0.004	0.002	0.004
Rod15	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	0.002	0.006	0.004	0.002	0.004
Rod16	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	0.002	0.006	0.004	0.002	0.004
Rod17	0.012	0.012	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	0.002	0.006	0.004	0.002	0.004
Rod18	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.004	0.006	0.008
Rod36	0.010	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.006	0.004	0.008	0.006	0.004	0.006
Rod40	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod41	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.004	0.006	0.008
Rod209	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod210	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod214	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod216	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod217	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod218	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod219	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015
Rod220	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.012	0.008	0.010	0.012	0.015

Continuação Anexo 7: Matriz de distâncias do gene BFIB calculada com modelo de evolução *Kimura-2-parâmetros*.

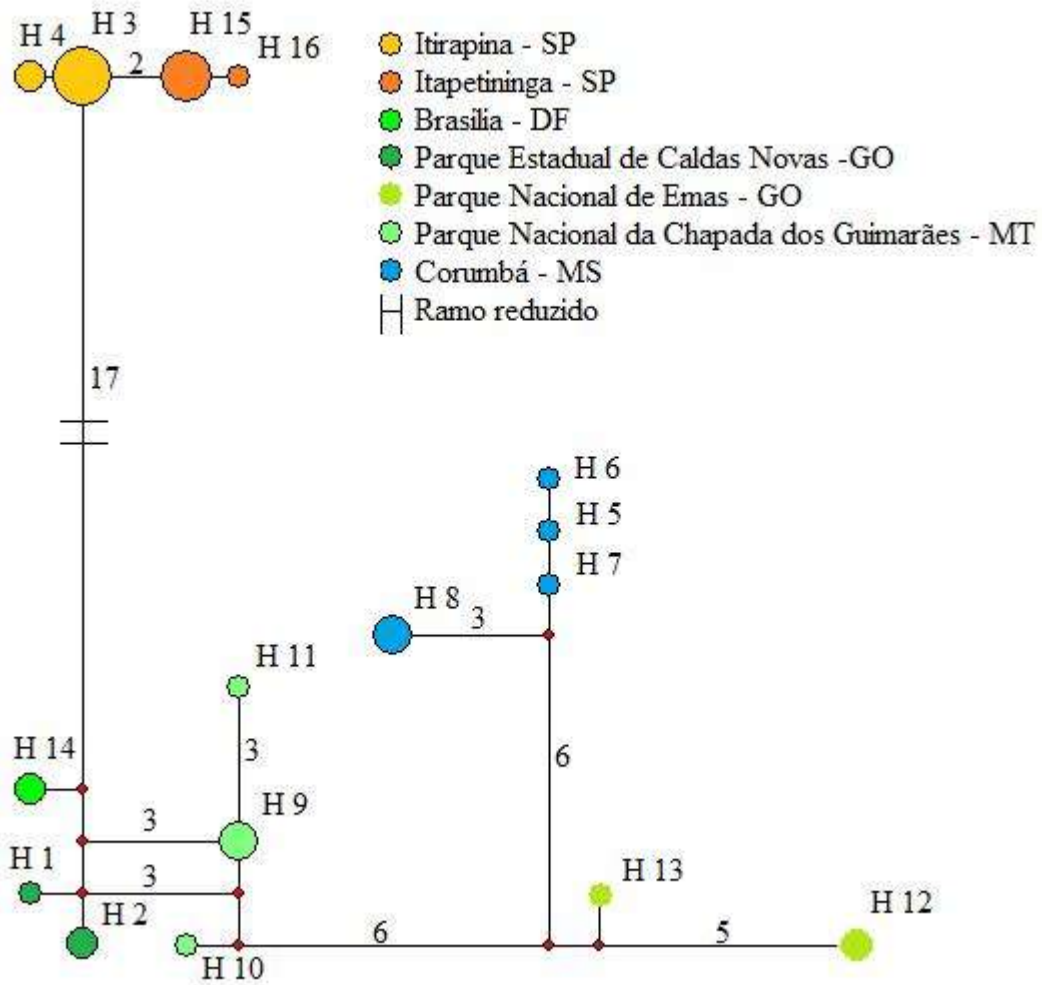
	Rod14	Rod15	Rod16	Rod17	Rod18	Rod36	Rod40	Rod41	Rod209	Rod210	Rod214	Rod216	Rod217	Rod218	Rod219	Rod220
2073																
2074																
Cbi36																
Cbi37																
Cbi38																
Cbi39																
Cbi40																
Cbi41																
Cbi42																
Cbi43																
P1																
P2																
P3																
P4																
P5																
P6																
Rod14																
Rod15	0.000															
Rod16	0.000	0.000														
Rod17	0.000	0.000	0.000													
Rod18	0.004	0.004	0.004	0.004												
Rod36	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002											
Rod40	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008										
Rod41	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006									
Rod209	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006								
Rod210	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000							
Rod214	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000						
Rod216	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000					
Rod217	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000				
Rod218	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
Rod219	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
Rod220	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.008	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Anexo 8



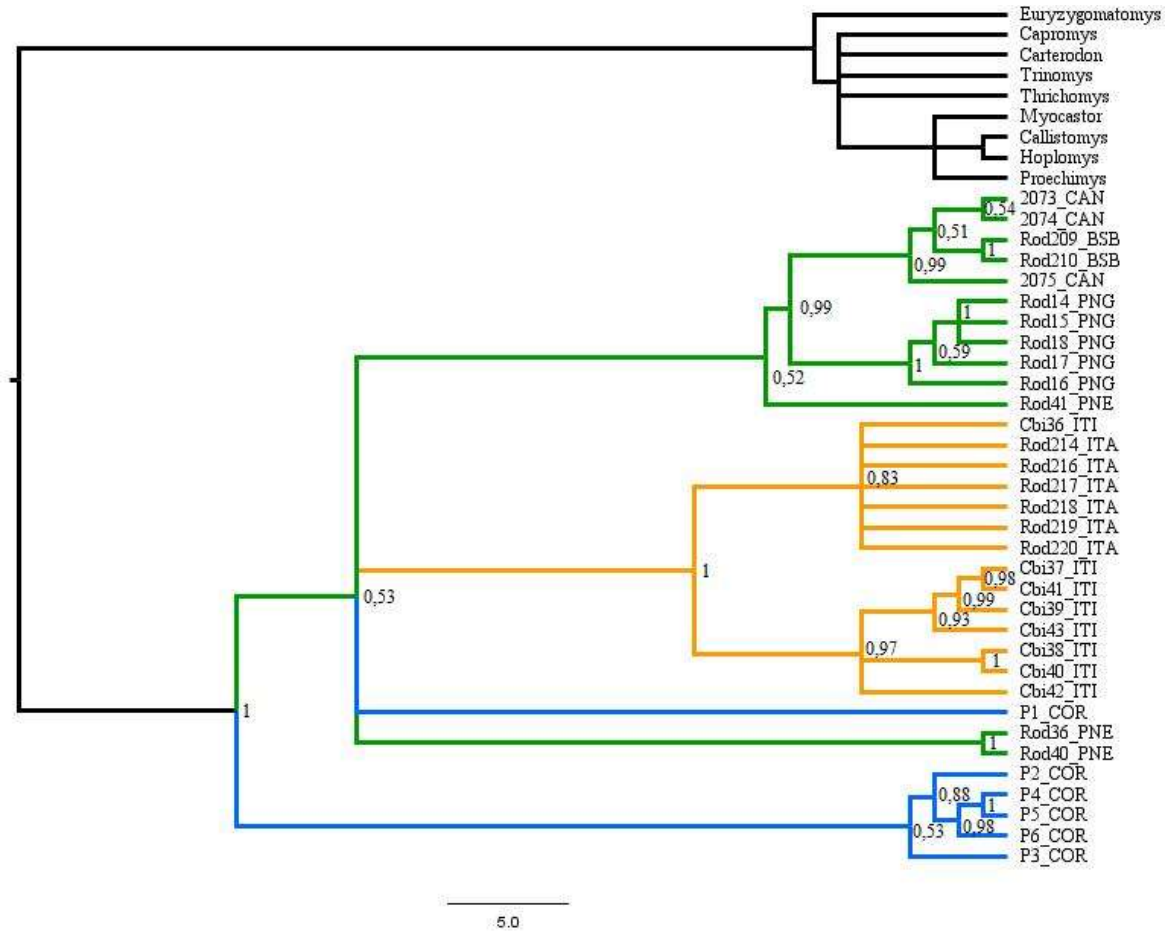
Anexo 8: Rede de Haplótipos do gene CytB. As cores representam as localidades de coleta, sendo que os tons representam os clados dos indivíduos (Tons de laranja referem-se à São Paulo, verde à região central do Cerrado e azul ao Pantanal). Os tamanhos dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham.

Anexo 9



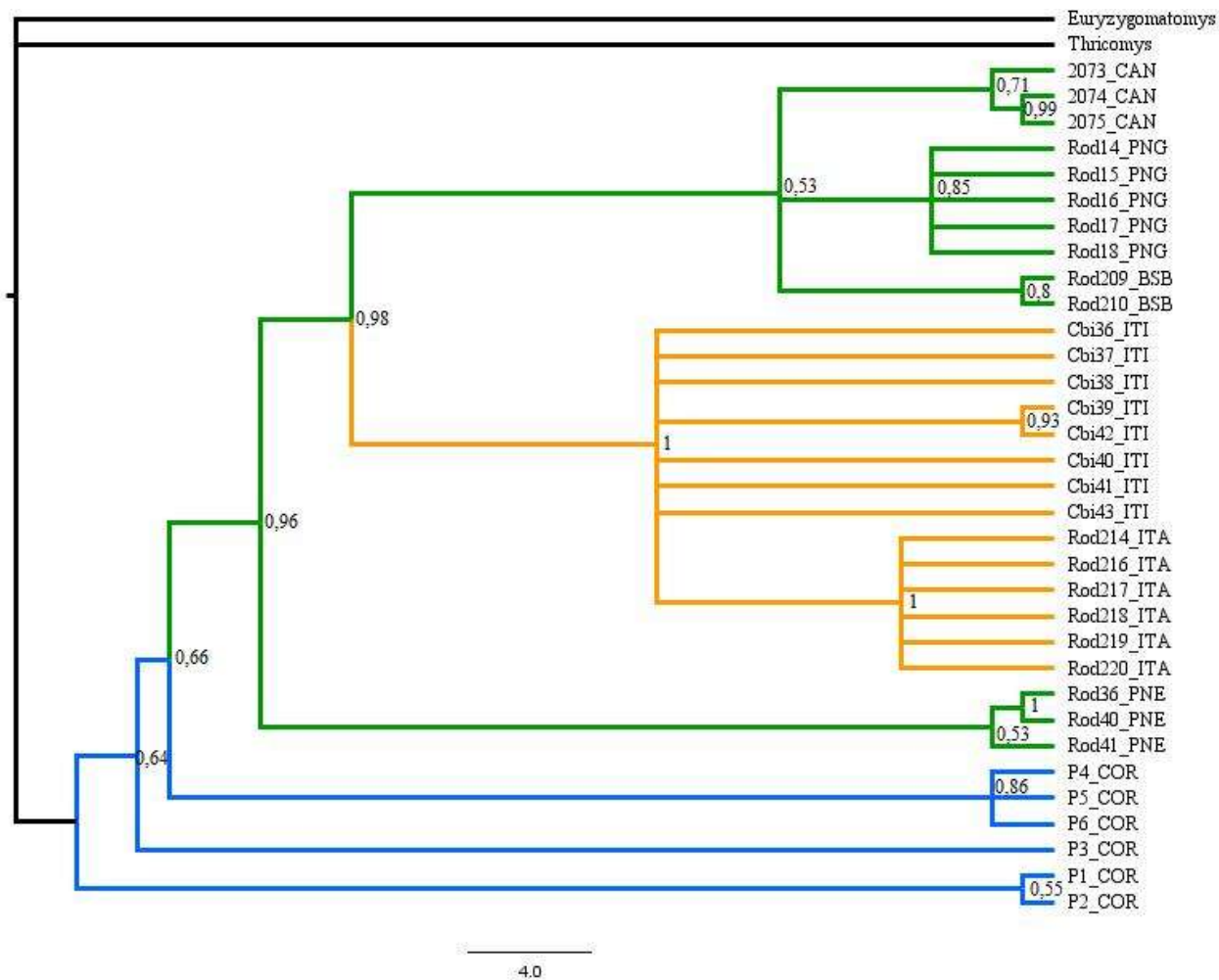
Anexo 9: Rede de Haplótipos do gene COI. As cores representam as localidades de coleta, sendo que os tons representam os clados dos indivíduos (Tons de laranja referem-se à São Paulo, verde à região central do Cerrado e azul ao Pantanal). Os tamanhos dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que os compartilham.

Anexo 10



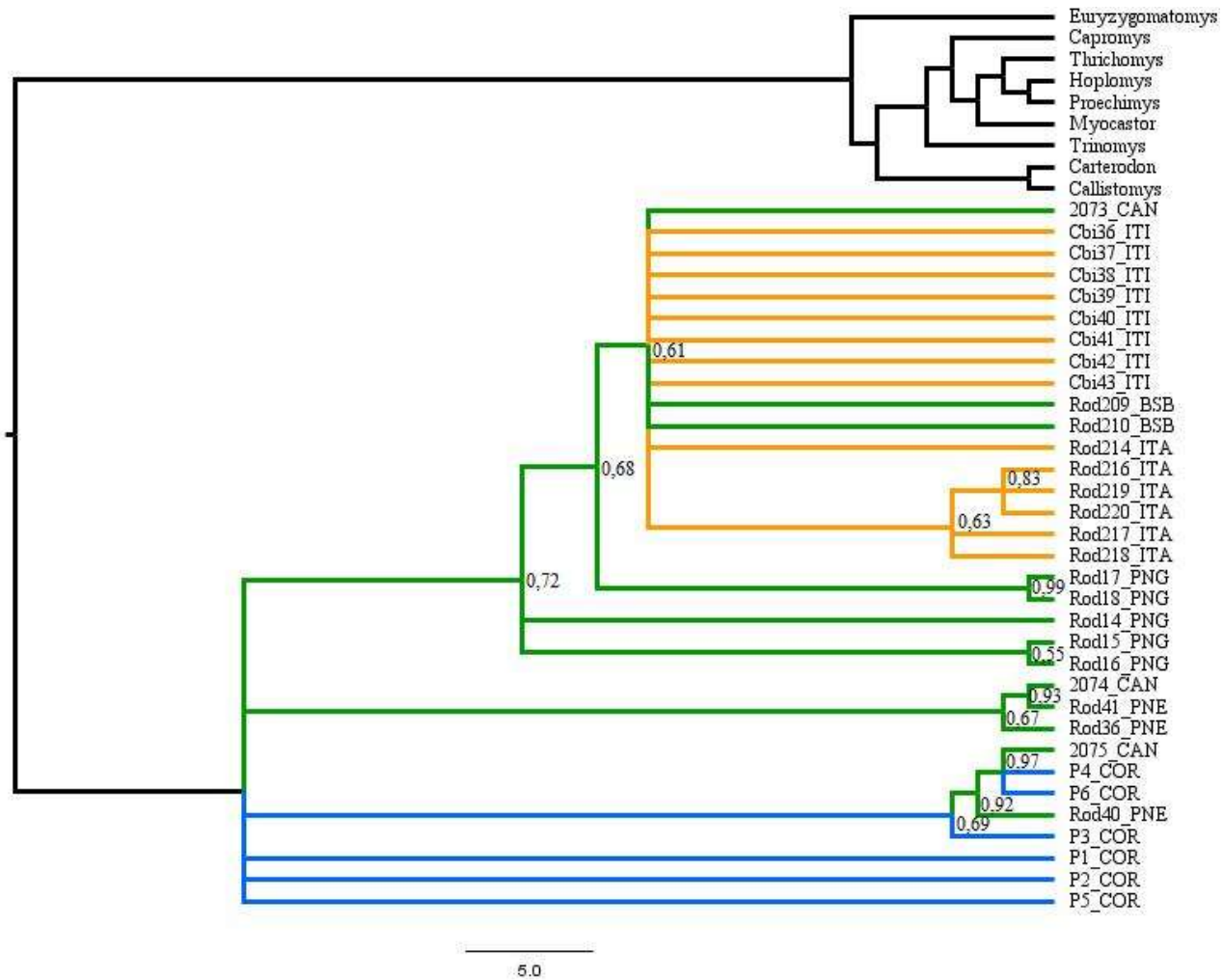
Anexo 10: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando o gene CytB, com 2 milhões de geração e *burn in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS.

Anexo 11



Anexo 11: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando o gene COI, com 2 milhões de geração e *burn in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS.

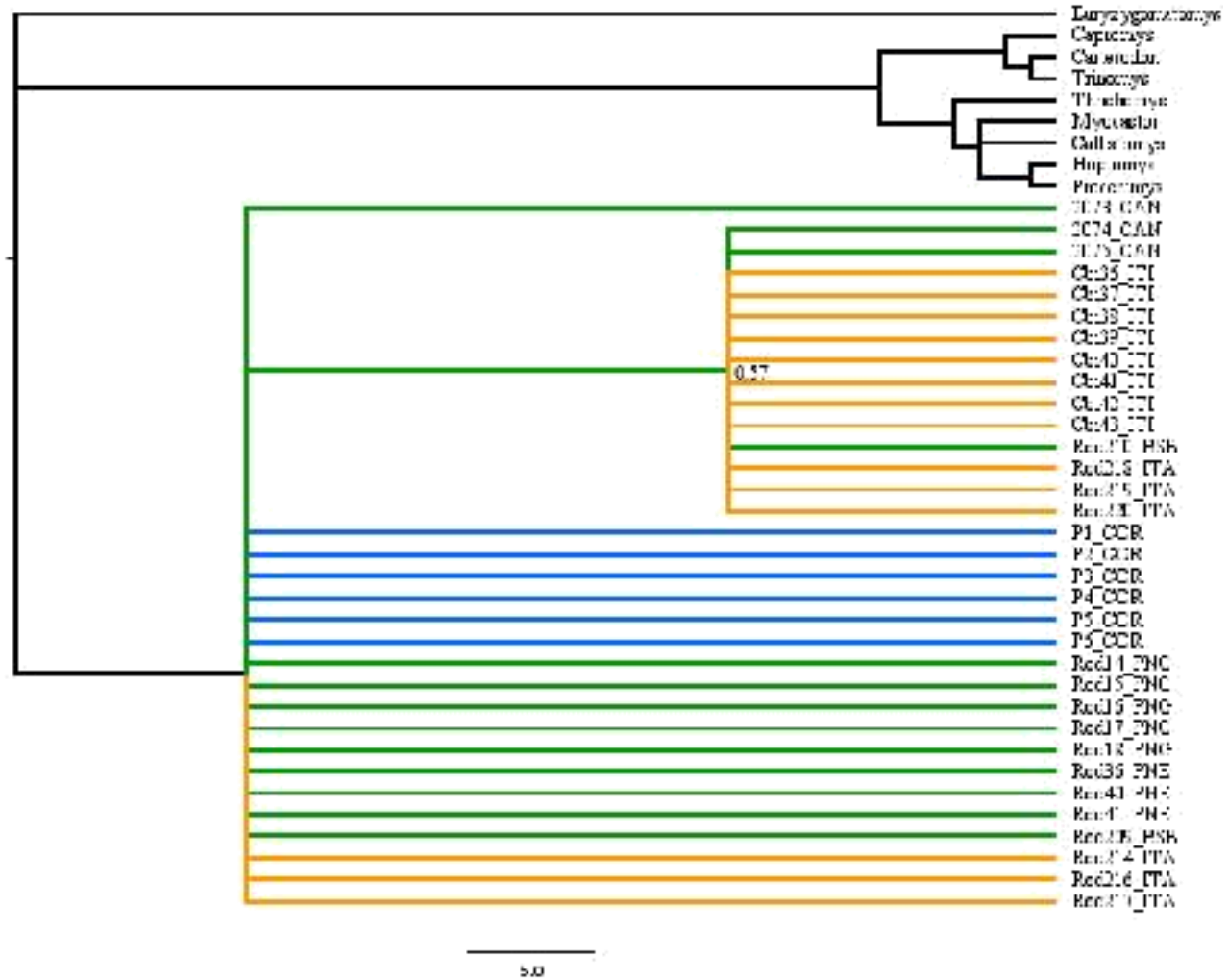
Anexo 12



Anexo 12: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando o gene vWF, com 2 milhões de geração e *burn in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS.

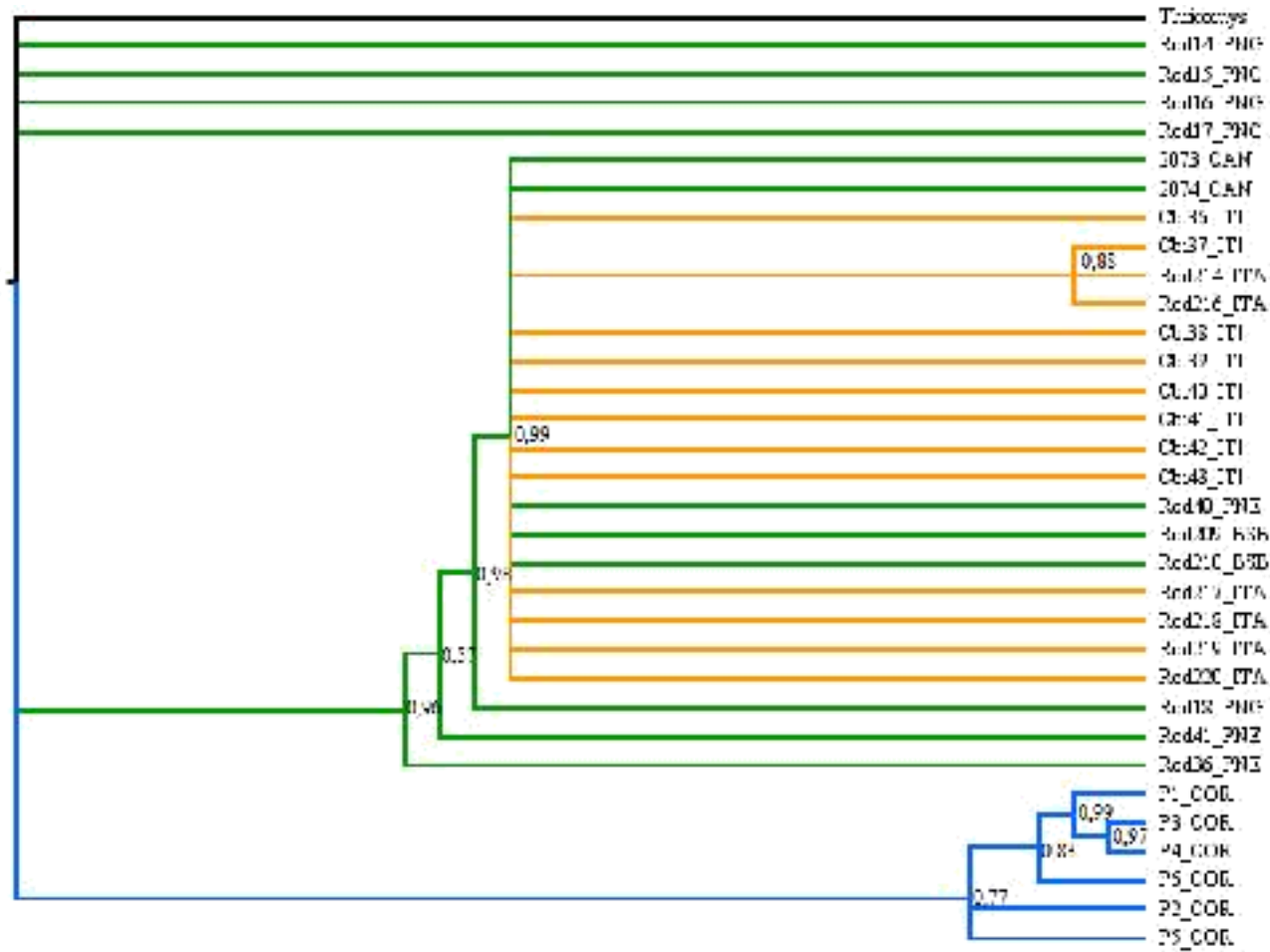


Anexo 13



Anexo 13: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando o gene GHR, com 2 milhões de geração e *burn in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS.

Anexo14



Anexo 14: Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana utilizando o gene BFIB, com 2 milhões de geração e *burn in* de 25%. Os valores de suporte dos nós apresentados estão em probabilidades. As cores representam os grupos delimitados pelo BAPS.

