

**FILOGEOGRAFIA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *MARMOSA*
(*MARMOSA*) *MURINA* (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE)****Michel Barros Faria**^{1,2}

michefaria@yahoo.com.br

João Alves de Oliveira³

jaoliv@mn.ufrj.br

Cibele Rodrigues Bonvicino^{2,4}

cibelerb@inca.gov.br

¹ Departamento de Genética, (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios Silvestres, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Divisão de Genética, Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

Filogeografia de Populações Brasileiras de *Marmosa* (*Marmosa*) *Murina* (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*). *Marmosa*, um gênero de marsupial sul-americano, tem 17 espécies distribuídas nos subgêneros *Marmosa* e *Micoureus*. Visando detectar padrões filogeográficos em *M. (Marmosa) murina*, foram analisados o gene mitocondrial Citocromo b e o éxon 28 do gene nuclear Fator de Von Willebrand. Análises de máxima verossimilhança e Bayesiana corroboraram a monofilia de *Marmosa* (incluindo *Micoureus*), e revelaram a monofilia de *M. murina*. Esta espécie aparece distribuída em três clados, um ao norte do rio Amazonas, outro entre os rios Tapajós e Araguaia, e o terceiro no sudeste do Brasil. O clado do sudeste do Brasil foi a primeira linhagem a se diferenciar, seguido dos outros dois clados, mais relacionados entre si. As análises mostraram estruturação, com populações do lado leste do rio Araguaia separadas das do lado oeste. A formação deste rio é posterior ao aparecimento da linhagem do clado Tapajós - Araguaia. A separação do clado norte do rio Amazonas dos demais sugere o rio Amazonas como barreira. Esse rio já existia antes da diferenciação de *M. murina*, estimada em 1,5 Ma, mas mudanças climáticas durante o Pleistoceno produziram expansões e contrações de ambientes áridos e úmidos, alterando o volume de água do rio e possibilitando a colonização das duas margens. A partir do Holoceno o rio Amazonas tornou-se barreira efetiva.

Palavras chave: *Marmosa*, Didelphidae, *mt-Cytb*, *e28-vWF*, filogeografia.

ABSTRACT

Phylogeography of *Marmosa* (*Marmosa*) *murina* Brazilian populations (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*). *Marmosa*, a genus of South American marsupial, includes 17 species distributed in the subgenera *Marmosa* and *Micoureus*. In search of phylogeographic patterns in *M. (Marmosa) murina* we analyzed the mitochondrial gene Cytochrome b and the exon 28 of the nuclear gene von Willebrand Factor. Maximum

Likelihood and Bayesian analyses corroborate the monophyly of *Marmosa* (including *Micoureus*) and revealed the monophyly of *M. murina*, which was divided into three clades, one north of the Amazon River, one between the rivers Tapajós and Araguaia, and one in southeastern Brazil. The clade from southeastern Brazil was the first lineage to diverge, followed by the other two clades, that form a sister group. Analyses showed populations from the east of the Araguaia river separated from those of the west of that river. The Araguaia river, was formed after the appearance of the Tapajós-Araguaia lineage. Separation of the north of Amazon clade from the other clades suggests the Amazon river as a barrier. This river already existed before the differentiation of the *M. murina* lineage, which was estimated to have occurred ca. 1.5 Ma bp., but climate changes during the Pleistocene produced expansions and contractions of arid and humid environments, changing the river water volume, and allowing colonization of the two banks. From the Holocene on, the Amazon river became an effective barrier.

Key words: *Marmosa*, *mt-Cytb*, *e28-vWF*, phylogeography

INTRODUÇÃO

Os Didelphidae, ordem Didelphimorphia, representam a mais diversificada família de marsupiais vivos do Novo Mundo, ocorrendo do sul do Canadá à Patagônia Argentina (VOSS e JANSÁ, 2009; WILSON e REEDER, 2005). Essa família é representada por 18 gêneros e 96 espécies, 55 das quais ocorrem no Brasil (VOSS e JANSÁ, 2009; PAGLIA *et al.*, 2012). O gênero *Marmosa*, como atualmente considerado (VOSS e JANSÁ, 2009), corresponde aos grupos *murina* e *cinerea* de TATE (1933). Esses grupos foram tratados como gêneros distintos por GARDNER e CREIGTON (1989). Estudos recentes, com base em marcadores moleculares, reuniram *Micoureus* e *Marmosa* como subgêneros de *Marmosa* (VOSS e JANSÁ, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2010). O número de espécies consideradas no gênero *Marmosa* não é consensual, sendo que alguns autores consideram 15 espécies, nove do subgênero *Marmosa* Gray 1821 e seis do subgênero *Micoureus*, Lesson 1842 (VOSS e JANSÁ, 2009), enquanto outros consideram *M. macrotarsus* e *M. waterhousei* como espécies válidas (GUTIERREZ *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2010), aumentando para 17 o número de espécies no gênero. *Marmosa (Marmosa) murina* é uma das espécies mais amplamente distribuídas do gênero, ocorrendo na Colômbia, Venezuela, Trinidad e Tobago, Guianas, Brasil, Leste do Equador, Peru e Bolívia (GARDNER e CREIGTON, 2008).

Diversos estudos filogenéticos vêm sendo realizados sobre o gênero *Marmosa* (e.g., VOSS e JANSÁ, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2010), porém estudos filogeográficos com marsupiais são escassos, com alguns trabalhos sobre *Thylamys* (PALMA, 1995; BRAUN *et al.*, 2005; PALMA *et al.*, 2002), *Marmosops* (MISTRANGI e PATTON, 1997), e diferentes espécies de didelfídeos (PATTON e COSTA, 2003). COSTA (2003) examinou pequenos mamíferos não voadores distribuídos na Mata Atlântica e Amazônia e, com base na variação de sequências parciais do gene Citocromo b, fez inferências genealógicas e geográficas,

detectando estruturação geográfica em *M. (Marmosa) murina* e apontando a necessidade de um estudo filogeográfico mais detalhado deste táxon.

Os objetivos do presente trabalho foram analisar as relações filogeográficas de *M. (Marmosa) murina* e sua relação filogenética com outras espécies de *Marmosa* a partir de análises filogenéticas com base no gene mitocondrial *mt-Cytb* e no gene nuclear *e28-vWF*, no sentido de evidenciar possíveis barreiras geográficas ao longo de sua área de distribuição.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois marcadores, um mitocondrial e um nuclear. Nas análises com o gene mitocondrial Citocromo b (*mt-Cytb*) foram utilizadas 52 amostras de *Marmosa* de localidades em diferentes domínios morfoclimáticos da América do Sul e em áreas de transição entre eles (Figura 1; Tabela 1). As espécies analisadas foram: *M. (Marmosa) murina* (n=24), *M. (Marmosa) waterhousei* (n=5), *M. (Marmosa) simonsi* (n=2), *M. (Marmosa) lepida* (n=2), *M. (Marmosa) mexicana* (n=2), *M. (Marmosa) isthmica* (n=2), *M. (Marmosa) xerophila* (n=2), *M. (Marmosa) robinsoni* (n=2), *M. (Marmosa) tyleriana* (n=4) e *M. (Marmosa) rubra* (n=2), *M. (Micoureus) demerarae* (n=1), *M. (Micoureus) paraguayanus* (n=1), *M. (Micoureus) constantiae* (n=1), *M. (Micoureus) regina* (n=1) e *M. (Micoureus) alstoni* (n=1). Para as análises filogenéticas com o éxon nuclear 28 do fator de Von Willebrand (*e28-vWF*) foram utilizadas 18 amostras de *Marmosa* de localidades em diferentes domínios morfoclimáticos da América do Sul, e áreas de transição entre eles (Figura 1; Tabela 1). As espécies analisadas foram *M. (Marmosa) murina* (n=11), *M. (Marmosa) lepida* (n=1), *M. (Marmosa) mexicana* (n=1), *M. (Marmosa) robinsoni* (n=1), *M. (Marmosa) rubra* (n=1), *M. (Micoureus) demerarae* (n=1), *M. (Micoureus) paraguayana* (n=1), *M. (Micoureus) regina* (n=1). Para constituir o grupo externo nas análises de ambos marcadores, foram sequenciadas uma amostra de *Gracilinanus agilis* e uma de *Cryptonanus agricolai*, e foram obtidas no GenBank uma sequência de *Caluromys lanatus* e outra de *Thylamys venustus* (Tabela 1).

Isolamento de DNA, amplificação, purificação, e sequenciamento. O DNA das amostras de fígado preservado em etanol 100% foi isolado pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). O *mt-Cytb* completo (1149 pb) e o *e28-vWF* (940 pb) foram amplificados por PCR usando iniciadores e ciclagens apropriadas (Tabela 2). Os produtos amplificados foram purificados com o conjunto de reagentes de purificação “GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), seguindo a recomendação do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos à eletroforese em tampão NaOH (10mM de NaOH e 45 mM de ácido bórico) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (concentração final de 0,3 µg/mL), e observado em um transiluminador com luz ultravioleta.

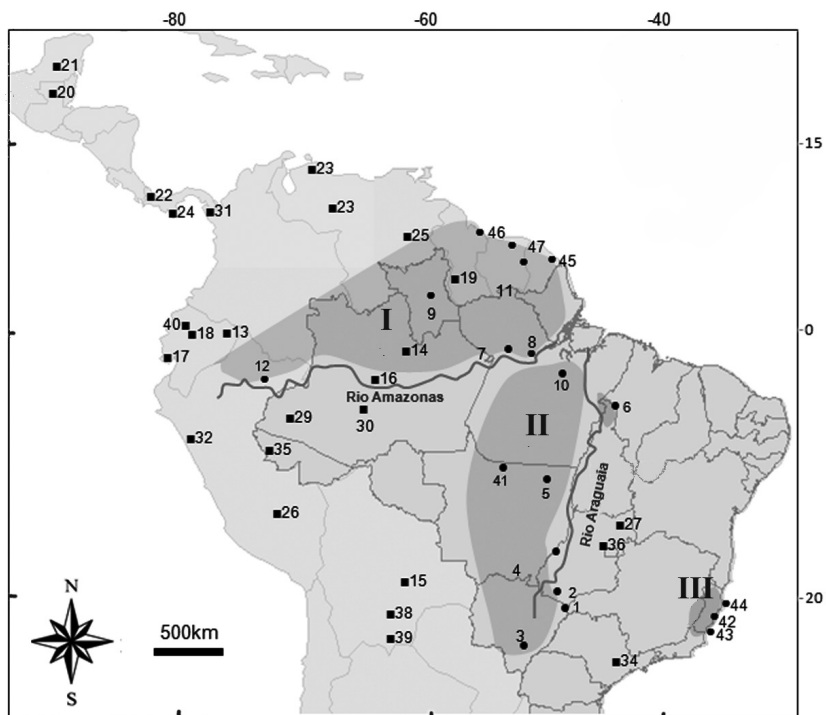


Figura 1 - Mapa mostrando as localidades de origem das amostras analisadas. Os números correspondem às localidades da Tabela 1. Círculos cheios= localidades de *M. (Marmosa) murina*; Quadrados= localidade das demais espécies de *Marmosa*; Áreas hachuradas= principais clados de *M. murina* recuperados pelas análises e indicados com números romanos, I= inclui amostras localizadas ao norte do rio Amazonas; II,. Amostras provenientes da região entre os rios Tapajós e Araguaia; III amostras do leste do Brasil.

Tabela 1 - Lista das amostras utilizadas nas análises indicando: **espécie**; **número de identificação da amostra**: LBCE = Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios Silvestres - IOC - FIOCRUZ, MN = Museu Nacional - UFRJ, CRB = C.R. Bonvicino, JAO = J. A. de Oliveira, o número de acesso das seqüências no GenBank para o *mt-Cytb* é KF619568 a KF619579, e para *e28-vWF* é KF619580 a KF619590; **haplótipo do mt-Cytb e e28-vWF**; **localidade de origem** (números entre parênteses representam as localidades na Figura 1), BO= Bolívia, EQ = Equador, GI = Guiana Inglesa, GF = Guiana Francesa, GU = Guatemala, ME = México=, PN = Panamá, PU = Peru, SU = Suriname, VE = Venezuela, BR = Brasil com os estados AC =Acre, AM = Amazonas, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, PA = Pará, TO = Tocantins, RR= Roraima, RJ = Rio de Janeiro, SP = São Paulo; **Referências**.

Espécie	Número	mt-Cytb	e28-vWF	Localidade	Referência
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 11974	H1	H1	BR: MS, Cassilândia (1)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 11979	H2	H2	BR: GO, Aporé (2)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106392	H3	-	BR: MS, Dourados (3)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106391	H4	-	BR: MT, Barra do Garça (4)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	CRB 2762	H5	H3	BR: MT, São José do Xingu (5)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	GU112899	H6	-	BR: MT, Alta Floresta (41)	AGRIZZI <i>et al.</i> (2009)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106395	H7	-	BR: PA, Rio Xingu (10)	GUTIERREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106394	H8	-	BR: PA, Rio Xingu (10)	GUTIERREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 14864	H9	H3	BR: TO, Araguatins (6)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 14857	H10	H3	BR: TO, Araguatins (6)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 14856, 14861	H11	H3	BR: TO, Araguatins (6)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	MBF 02	H12	H4	BR: PA, Oriximiná (7)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	LBCE 13825	H13	H5	BR: PA, Monte Alegre (8)	Este Estudo

Tabela 1 - Continuação

Espécie	Número	mt-Cytb	e28-vWF	Localidade	Referência
<i>M. (Marmosa) murina</i>	FJ159345	-	H6	PU: Loreto (12)	VOSS e JANSA (2009)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	JAO 2265	H14	H7	BR: RR, Caracará (9)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106390	H15	-	SU: Zanderij (33)	GUTIERREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	GU112897	H16	-	BR: ES, Santa Tereza (42)	AGRIZZI et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	GU112893	H17	-	BR: ES, Vitória (43)	AGRIZZI et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	GU112896	H18	-	BR: ES, Linhares (44)	AGRIZZI et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	AJ486995	H19	-	GF: Cayenne (45)	GUTIERREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106388	H20	-	GI: Demerara Mahaica (46)	GUTIERREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	AJ486996	H21	-	GF: Cayenne (45)	STEINER e CATZEFLIS (2003)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	HM106387	H22	-	SR: Brokopondo (11)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) murina</i>	AJ487002	H23	-	PU: Loreto, Rio Galvez (12)	STEINER e CATZEFLIS (2003)
<i>M. (Marmosa) waterhousei</i>	HM106386	H24	-	PU: Loreto (12)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) waterhousei</i>	HM106383	H25	-	EQ: Orellana (13)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) macrotarsus</i>	HM106397	H28	-	BO: Santa Cruz (15)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) macrotarsus</i>	HM106399	H29	-	BR: AM, Ilhazinha (16)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) macrotarsus</i>	HM106401	H30	-	PU: Loreto (12)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) simonsi</i>	HM063431	H31	-	EQ: Guayas (17)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) simonsi</i>	HM106342	H32	-	EQ: Esmeraldas (18)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) lepida</i>	HM106377	H33	-	PU: Loreto (12)	GUTIÉRREZ et al. (2010)

Tabela 1 - Continuação

Espécie	Número	mt-Cytb	e28-vWF	Localidade	Referência
<i>M. (Marmosa) lepida</i>	HM106376	H34	-	GI: Potaro-Siparuni (19)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) lepida</i>	FJ159343	-	H8	GI: Potaro Siparuni (19)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>M. (Marmosa) mexicana</i>	HM106356	H35	-	GU: El Petén (20)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) mexicana</i>	HM106359	H36	-	ME: Campeche (21)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) mexicana</i>	FJ159344	-	H9	GU: El Petén (20)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>M. (Marmosa) isthmica</i>	HM106364	H37	-	PN: Bocas Del Toro (22)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) isthmica</i>	HM106365	H38	-	PN: Bocas Del Toro (22)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) xerophila</i>	HM106348	H39	-	VE: Falcón (23)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) xerophila</i>	HM106347	H40	-	VE: Falcón (23)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) robinsoni</i>	HM106350	H41	-	VE: Falcón (23)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) robinsoni</i>	HM106354	H42	-	PN: Veraguas (24)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) robinsoni</i>	FJ159346	-	H10	PN: Darien (31)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>M. (Marmosa) tyleriana</i>	HM106379	H43	-	VE: Bolívar, Auyantepui (25)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) tyleriana</i>	CRB 2599	H26	-	BR: AM, Barcelos (14)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) tyleriana</i>	CRB 2100	H27	-	BR: AM, Barcelos (14)	Este Estudo
<i>M. (Marmosa) tyleriana</i>	HM106380	H44	-	VE: Bolívar, Auyantepui (25)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) rubra</i>	HM106367	H45	-	EQ: Orellana (13)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) rubra</i>	HM106366	H46	-	PU: Cusco (26)	GUTIÉRREZ et al. (2010)
<i>M. (Marmosa) rubra</i>	FJ159347	-	H11	PU: Huampani (32)	VOSS e JANSÁ (2009).

Tabela 1 - Continuação

Espécie	Número	mt- Cytb	e28- vWF	Localidade	Referência
<i>M. (Micoureus) demerarae</i>	CRB 874	H47	H12	BR: GO, Cavalcante (27)	Este Estudo
<i>M. (Micoureus) paraguayana</i>	HM1063721	H48	-	BR: SP, Capão Bonito (34)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Micoureus) paraguayana</i>	FJ159355	-	H13	BR: SP, Capão Bonito (34)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>M. (Micoureus) constantiae</i>	HM1063691	H49	-	BO: Santa Cruz (15)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Micoureus) regina</i>	HM1063701	H50	-	BR: AM, Igarapé (29)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>M. (Micoureus) regina</i>	FJ159356	-	H14	BR: AC, Porangaba (35)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>M. (Micoureus) alstoni</i>	JN8871341	H51	-	PN: Veraguas (24)	SANCHA <i>et al.</i> (2012)
<i>Gracilinanus agilis</i>	KF313931	H52	-	BR: GO, Cavalcante (27)	FARIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Gracilinanus agilis</i>	KF313986	-	H15	BR: GO, Mimoso de Goiás (36)	FARIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Marmosa paulensis</i>	KF314037	-	H16	BR: RJ, Petrópolis (37)	FARIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Cryptomys agricolai</i>	KF313984	H53	-	BR: GO, Serranópolis (28)	FARIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Cryptomys agricolai</i>	KF314038	-	H17	BR: GO, Serranópolis (28)	FARIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Thylamys venustus</i>	HM5834911	H54	-	BO: Chuquisaca (38)	GUTIÉRREZ <i>et al.</i> (2010)
<i>Thylamys venustus</i>	FJ59369	-	H18	BO: Tarija (39)	VOSS e JANSÁ (2009)
<i>Caluromys lanatus</i>	U346631	H55	-	BR: AM, Rio Uruçu (30)	PATTON <i>et al.</i> , (1996)
<i>Caluromys lanatus</i>	FJ159328	-	H19	EQ: Napo (40)	VOSS e JANSÁ (2009).

Tabela 2 - Iniciadores usados para amplificação (sublinhados) e sequenciamento do *mt-Cytb* e do *e28-vWF*, com as sequência e o sentido da fita.

Iniciador	Sequência	Posição	Referência
<i>mt-Cytb</i>			
<u>Cytb rev</u>	5'GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG	anti-senso	CASADO <i>et al.</i> (2010)
Sot in1	5'CAYGAAACAGGATCYAAYAA	anti-senso	CASSENS <i>et al.</i> (2000)
Sot in2	5'TGAGGACAAAATATCATTYTGAG	Senso	CASSENS <i>et al.</i> (2000)
<u>L14Z24</u>	5'CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG	Senso	IRWIN <i>et al.</i> (1991)
MVZ16	5'ATYAAACCAGAATGATAYTTCC	anti-senso	SMITH e PATTON (1993)
aot	5'CATGAGGCCAAAATATCATTCTGAGG	Senso	MENEZES <i>et al.</i> (2010)
GraciR	5'GCCTGTTTCGTGRAGGAATA	anti-senso	Presente estudo
<i>e28-vWF</i>			
<u>F104</u>	5'GGTGTGATGGAGCGTTTACACATCTC	Senso	VOSS e JANSA (2009)
<u>F120</u>	5'GACTTGGCYTTYCTSYTGGATGGCTC	Senso	VOSS e JANSA (2009)
F557	5'CCCTGGGCTACCCTCTGTGACCTGGT	Senso	VOSS e JANSA (2009)
R655	5'CTTCTAGCACAAAACACCACATCCAGAACCA	anti-senso	VOSS e JANSA (2009)
R743	5'CTCACATCCATYCGTTGCATCA	anti-senso	VOSS e JANSA (2009)
<u>R1141</u>	5'ATCTCATCSGTRCRRGGATTGC	anti-senso	VOSS e JANSA (2009)

As reações de sequenciamento foram preparadas com o conjunto de reagentes "Big Dye @ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante e processadas em um sequenciador automático ABI3130xl (Tóquio, Japão). Os eletroferogramas foram editados com os programas Chromas versão 1.45 (MACCARTHY, 1998) e Chromas PRO versão 1.41 (Technelysium Pty Ltd), e as seqüências alinhadas manualmente utilizando o programa MEGA na versão 5 (TAMURA *et al.*, 2007).

Análises filogenéticas e estimativas de distância genética. Os haplótipos foram verificados com o programa DNASP versão 5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009), e os testes de saturação para comparar a taxa de transição (s) e transversão (v) do *mt-Cytb*, e do *e28-vWF* foram realizados com o programa DAMBE 5.2.57 (XIA *et al.*, 2003; XIA e LEMEY, 2009).

As estimativas de distância genética com o algoritmo de distância Kimura-2-parâmetros (K2p) (KIMURA, 1980) foram realizadas com programa MEGA 5. O modelo K2p foi escolhido por ser eficiente para avaliar a divergência genética entre grupos intimamente ligados (TAMURA e KUMAR, 2002), e para facilitar comparações com outros estudos com marsupiais (COSTA, 2003; PATTON e COSTA, 2003; SOLARI, 2010; CARAMASCHI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2011).

O modelo de evolução foi escolhido para cada conjunto de dados pelo teste AIC [Critério de Informação de Akaike ("Akaike information criterion"), Akaike 1973], com modificações (POSADA e CRANDALL, 2001), usando o programa ModelGenerator 0.85 (KEANE *et al.*, 2006). As análises de máxima verossimilhança (MV) e de inferência Bayesiana (BI) com o *mt-Cytb* foram realizadas usando o modelo evolutivo HKY (HASEGAWA *et al.*, 1985) com proporção de sítios invariáveis e taxa de distribuição de substituição gama (HKY+I+G). Para o *e28-vWF* o modelo mais adequado para MV foi o K80 (KIMURA, 1980) com a distribuição gama (K80+G), e para a análise Bayesiana foi o modelo HKY+I+G.

As topologias de MV (FELSENSTEIN, 1981) foram obtidas com o programa PhyML, versão 3.0 (GUINDON e GASCUEL, 2003), com os parâmetros: equilíbrio de seqüências otimizado, proporção de sítios variáveis estimado, α estimado, árvore inicial BioNj, topologia de tamanho de ramos otimizados, valores de suporte de aLRT obtidos com base em 1.000 réplicas (ANISIMOVA e GASCUEL, 2006; GUINDON *et al.*, 2010).

As análises Bayesianas foram realizadas com o programa Mr.Bayes 3.1.2 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001; RONQUIST e HUELSENBECK, 2003) com a cadeia de Markov Monte Carlo conjugada ao algoritmo de Metropolis (MCMCMC). Foram executadas duas cadeias por 1.000.000 de gerações, e uma árvore foi coletada a cada 100 gerações. A qualidade das corridas foi avaliada pela convergência entre as corridas independentes usando o programa TRACER versão 1.5 (RAMBAUT e DRUMMOND, 2007), e os 10% iniciais da corrida foram descartados (*burn-in*). Posteriormente, a melhor topologia foi obtida através de

consenso estrito.

Para avaliar a estrutura e os padrões de distribuição geográfica das subpopulações de *M. (Marmosa) murina* foi realizada uma análise de rede com o programa Network (www.fluxusengineering.com) pelo método de *Median-Joining* (MJ; BANDELT *et al.*, 1999). Nesta análise foram utilizados os sítios variáveis das sequências de *mt-Cytb*.

O programa ARLEQUIN foi usado para calcular a distribuição par-a-par (*mismatch* distribution) (SLATKIN e HUDSON, 1991; ROGERS e HARPENDING, 1992). Intervalos de confiança foram baseados em 1000 repetições de bootstrap com nível de significância de 0,05 (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999). O modelo de expansão demográfica foi testado usando valores de bootstrap e a soma dos desvios quadrados (SSD) entre a distribuição par-a-par (*mismatch*) observada e simulada (test of goodness-of-fit) (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999; EXCOFFIER, 2004).

A hipótese de isolamento das populações de *M. (Marmosa) murina* por distância foi testada por meio do teste de Mantel (programa IBD versão 3.23) (BOHONAK, 2002; JENSEN *et al.*, 2005). Amostras foram divididas em três subgrupos de acordo com as análises filogenéticas e de rede, clados I, II e III (Figura 1). As distâncias geográficas foram calculadas usando a localidade mais distante (Guiana Francesa para o clado I, Dourados para o clado II, e Vitória para o clado III) e mais próxima de cada clado (Monte Alegre para o clado I, Araguatins para o clado II, e Santa Tereza para o clado III). Distâncias genéticas entre subpopulações e entre sequências foram calculadas utilizando o PhiST e Kimura-2 parâmetros, respectivamente, com 10.000 permutações.

O tempo de divergência entre as linhagens foi estimado através de análises Bayesianas com o programa BEAST, versão 1.7.0 (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007), usando o *mt-Cytb* e dois pontos de calibração baseados em registro fóssil: (i) o tempo de separação entre Didelphinae e Caluromyinae (15,9 a 16,3 Ma; MARSHALL, 1976), e (ii) a idade mínima de 6,8 Ma para a separação de Didelphinae e Marmosinae (KIRSCH e PALMA, 1995).

Para estimar o tempo de divergência foi utilizado um prior de relógio molecular relaxado não correlacionado (DRUMMOND *et al.*, 2006), com o modelo evolutivo "HKY e coalescência", para possibilitar taxas de evolução diferentes nos diversos ramos; essas taxas podem ser calculadas independentemente através de uma distribuição dos valores de taxa de substituição de nucleotídeos. Foi utilizada uma árvore filogenética amostrada por MCMC para calibrar o tempo de divergência usando a distribuição normal e uniforme para os pontos de calibração. As estimativas da probabilidade posterior foram obtidas por amostragem MCMCMC a cada 5.000 passos ao longo de um total de 50.000.000 passos. Para verificar se o logaritmo da árvore gerada *a posteriori* conjunta se tornou estacionário, foi usado o programa Tracer (RAMBAUT e DRUMMOND, 2007); os 10% das árvores iniciais foram removidas e a topologia mais suportada foi indicada usando o programa TreeAnnotator do pacote BEAST 1.7.0 (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007).

RESULTADOS

As estimativas de distância genética interespecíficas de *Marmosa* variaram para o *mt-Cytb* de 9,37% entre *M. (Marmosa) tyleriana* e *M. (Marmosa) waterhousei*, a 23,42% entre *M. (Marmosa) alstoni* e *M. (Marmosa) tyleriana*. Para o *e28-vWF* as estimativas de distância genética variaram de 0,81% entre *M. (Micoureus) paraguayana* e *M. (Micoureus) demerarae*, a 5,98% entre *M. (Marmosa) mexicana* e *M. (Marmosa) rubra*. As distâncias interespecíficas para *Marmosa*, e intraespecífica para *M. (Marmosa) murina*, para os dois marcadores variaram entre os clados recuperados pelas análises MV, BY e MJ, assim como as taxas de transições e transversões, e valores de diversidade nucleotídica e genética (Tabela 3).

As sequências de *mt-Cytb* de *Marmosa* (n=52) mostraram 51 haplótipos, um compartilhado por 2 espécimes (H11) de *M. (Marmosa) murina* da mesma localidade (Araguatins, TO). As demais amostras não compartilharam haplótipos (Tabela 1). As sequências do *e28-vWF* de *Marmosa* (n=18) mostraram 14 haplótipos, cinco compartilhados por amostras de *M. (Marmosa) murina* (MT e TO, n=5; Tabela 1). Para ambos os marcadores, houve sinal filogenético e predominância de transições, com o *mt-Cytb* apresentando indícios de saturação, e o *e28-vWF* não tendo saturação (Figura 2).

As topologias de máxima verossimilhança e Bayesiana obtidas com o *mt-Cytb* revelaram o monofilétismo de *Marmosa* (aLRT=100 e PP=1), com o gênero dividido em dois grupos com alto suporte nodal (Figura 3). As espécies *M. (Marmosa) mexicana*, *M. (Marmosa) isthmica*, *M. (Marmosa) robinsoni*, *M. (Marmosa) xerophila*, *M. (Marmosa) simonsi*, e *M. (Marmosa) rubra* (aLRT=88 e PP=0,99), agruparam-se isoladas do clado que contém o restante das amostras. Este último (aLRT=68 e PP= 0,87) se divide em várias linhagens, uma contendo *M. (Marmosa) lepida* (aLRT=100 e PP=1), outra (aLRT=60 e pp=0,68) contendo os haplótipos de *Micoureus* (aLRT=100 e PP=1), e outra linhagem com o restante das amostras (aLRT=100 e PP=1). Este último clado também se divide em dois, um com *M. (Marmosa) waterhousei* e *M. (Marmosa) tyleriana* (aLRT=98 e PP=0,96), e outro com *M. (Marmosa) murina* e *M. (Marmosa) macrotarsus*, com suporte baixo (aLRT=69 e PP=0,75; Figura 3).

As topologias de máxima verossimilhança e Bayesiana obtidas com o *e28-vWF* (Figura 4) também mostraram *Marmosa* monofilética, com alto valor de suporte (aLRT=99 e PP=1), e *M. (Marmosa) murina* estruturada, mas como era esperado, tiveram menor resolução para resolver algumas relações interespecíficas.

As análises com os dois marcadores revelaram as amostras de *M. (Marmosa) murina* monofiléticas e geograficamente estruturadas para os marcadores *mt-Cytb* e *e28-vWF* (Figuras 3 e 4). A análise de rede com *mt-Cytb* recuperou a estruturação em três grupos encontrada na MV e BY com vários vetores médios dentro e entre os grupos (Figura 5).

Os grupos são: o clado I, com amostras localizadas ao norte do rio Amazonas no bioma Amazônia do Peru, Brasil e das Guianas; o clado II, com

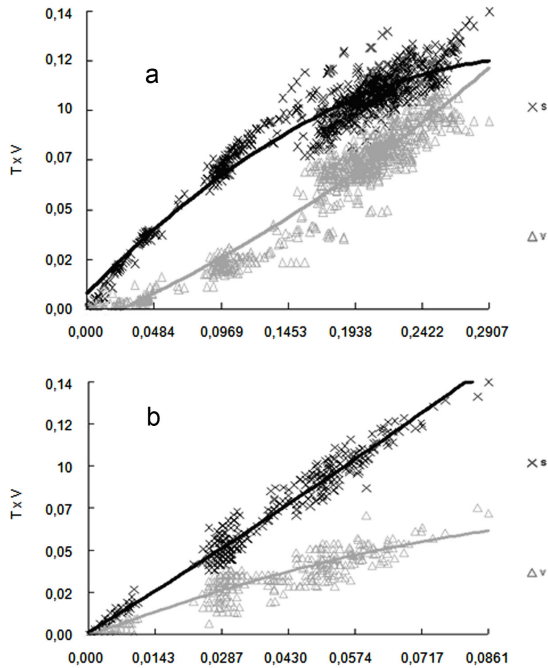


Figura 2 - Gráfico das taxas de transição e transverso (s e v) versus distância genética K2p de *mt-Cytb* (a) e do *e28-vWF* (b), para testar o sinal filogenético dos marcadores estudados. Eixo x= taxas de transição. Eixo y= distância genética.

amostras localizadas no extremo Leste do bioma Amazônia e no extremo oeste do bioma cerrado, entre os rios Tapajós e Araguaia; o clado III, com amostras do sudeste do Brasil, obtidas no bioma Mata Atlântica.

Não foram analisadas amostras do clado III do Sudeste do Brasil com o *e28-vWF*; por isso nessa análise encontramos *M. (Marmosa) murina* estruturada em dois clados, um ao norte do rio Amazonas (clado I) e outro ao sul desse rio (clado II).

Os padrões de distribuição propostos pela análise de *Mismatch Distribution* para inferir a história demográfica das populações usando o *mt-Cytb* resultaram em curvas multimodais para os clados I, II e III, sugerindo equilíbrio demográfico (Figura 6).

O teste de Mantel realizado com dados do *mt-Cytb* não revelou associação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas.

A análise Bayesiana com *mt-Cytb* estimou um tempo de 1,55 Ma para o surgimento da linhagem de *M. (Marmosa) murina*, no Pleistoceno. As idades para todas as espécies analisadas, assim como para os principais clados de *Marmosa* estão representadas na Figura 7.

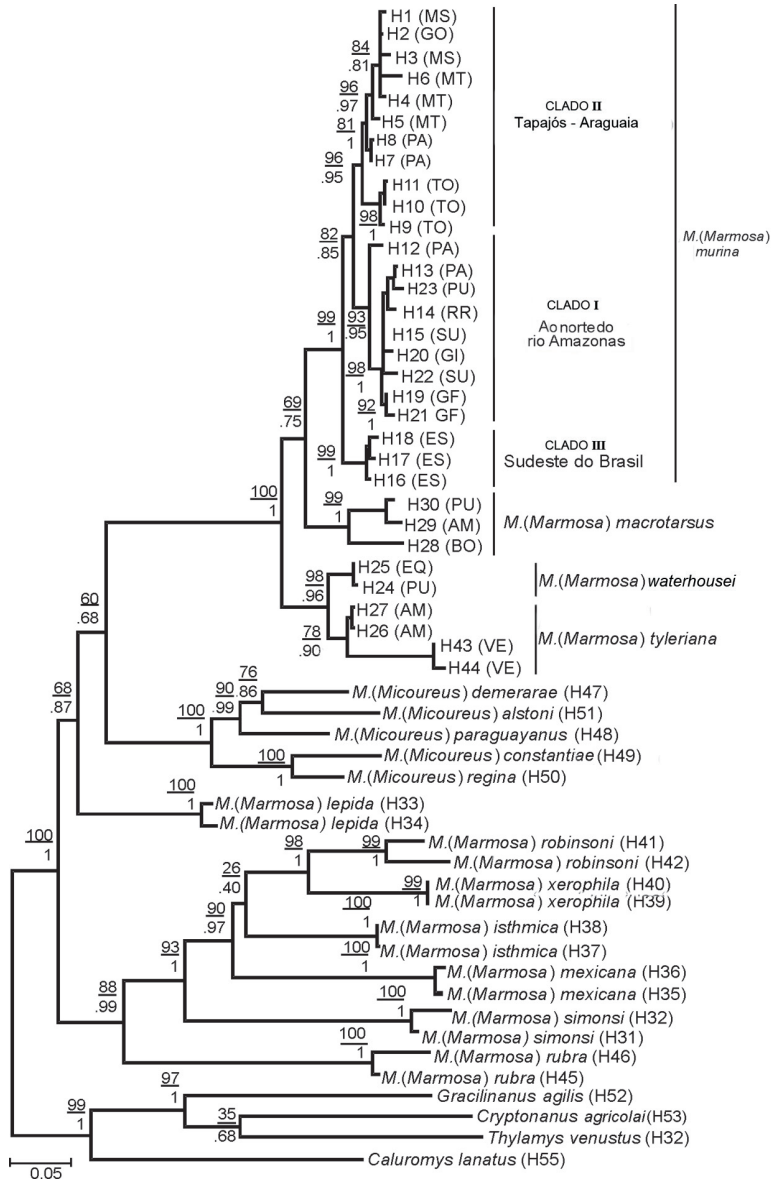


Figura 3 - Topologias de máxima verossimilhança e Bayesiana com mt-Cytb mostrando as relações filogenéticas de *Marmosa*. Os números próximos aos nós representam valores de aLRT (acima) e probabilidade posterior (abaixo).

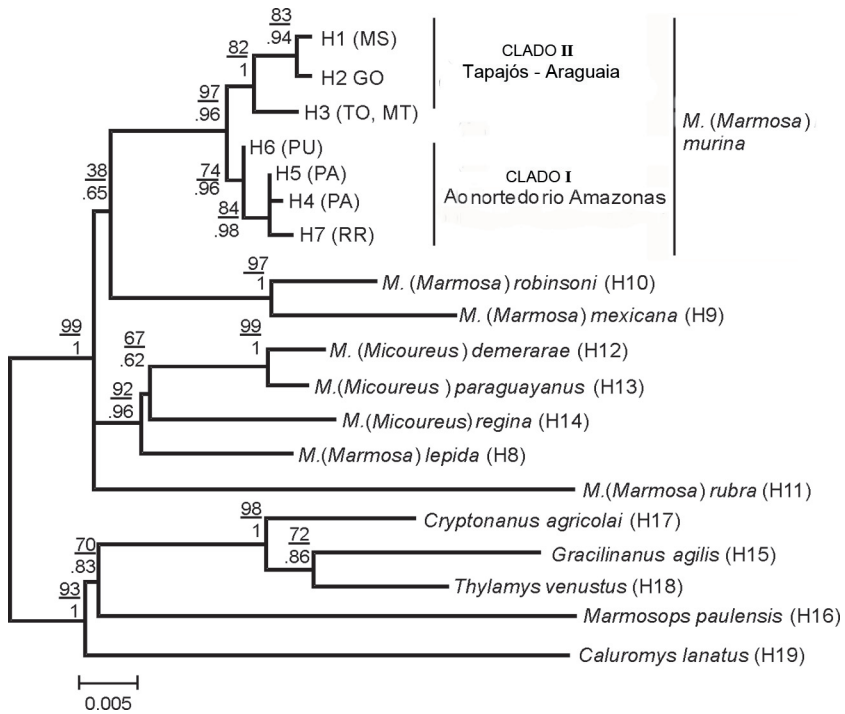


Figura 4 - Topologia de máxima verossimilhança e Bayesiana com *e28-vWF* mostrando as relações filogenéticas de *Marmosa*. Os números próximos aos nós representam valores de aLRT (acima) e probabilidade posterior (abaixo).

DISCUSSÃO

As análises suportam o monofiletismo de *Marmosa*, a posição de *Micoureus* como subgênero de *Marmosa*, e a posição de *M. (Marmosa) murina* como grupo irmão de *M. (Marmosa) macrotarsus*. Esses resultados corroboram estudos moleculares recentes que revelaram esse arranjo filogenético (GUTIERREZ *et al.*, 2010), e vão contra a opinião de VOSS e JANSÁ (2009) que consideram *M. (Marmosa) macrotarsus* sinônimo júnior de *M. (Marmosa) murina*. As análises com os marcadores *mt-Cytb* e *e28-vWF* mostraram estruturação em *M. (Marmosa) murina*, sugerindo o rio Amazonas como uma possível barreira geográfica. Os resultados aqui encontrados com *mt-Cytb* estão de acordo com os encontrados por COSTA (2003) que, usando o mesmo marcador, encontrou *M. (Marmosa) murina* estruturada em quatro clados, um no sudeste do Brasil, um no extremo oeste da Amazônia ao sul do rio Amazonas, um terceiro ao norte

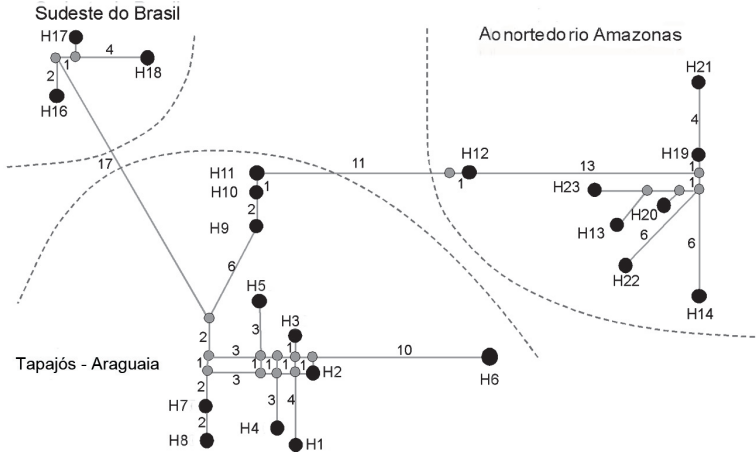


Figura 5 - Rede de haplótipos de *M. (Marmosa) murina* com o mt-Cytb obtida pelo método de Median-Joining (BANDELDT *et al.*, 1999), utilizando os sítios variáveis das sequências de mt-Cytb. Pontos negros representam haplótipos e seus diâmetros são proporcionais ao número de amostras que compartilham cada haplótipo. Pontos cinza representam vetores médios. Números nas linhas ligando os haplótipos ou vetores médios representam o número de substituições. Os números de haplótipos (H) são os mesmos listados na Tabela 1.

do rio Amazonas e um quarto na região central do Brasil (CA), que inclui as localidades de nossas amostras do clado II. Porém, as relações filogenéticas entre os cladogramas foram diferentes das encontradas por COSTA (2003). Naquele trabalho as amostras do sudeste do Brasil formam um grupo irmão do clado Central do Brasil (nosso clado II), com ambos cladogramas separados daqueles ao norte e ao sul oeste do rio Amazonas. No presente trabalho, o clado II de Tapajós-Araguaia é grupo irmão do clado I do norte do rio Amazonas ambos formando um grupo irmão do clado III do sudeste do Brasil. Esse resultado pode ser consequência do tamanho das sequências analisadas, uma vez que COSTA (2003) utilizou parte do *mt-Cyb*, com sequências de tamanho variável, com até no máximo 801 pares de base, e analisou amostras de localidades diferentes, que não incluíam localidades à oeste do rio Negro e ao norte do rio Amazonas, enquanto um terço das amostras aqui analisadas são dessa região.

As análises com o marcador *e28-vWF* também evidenciaram o papel do rio Amazonas na estruturação encontrada, separando o grupo ao norte do rio Amazonas do grupo ao sul deste rio. O médio/baixo rio Amazonas atua como barreira para a distribuição de duas outras espécies de marsupiais didelfídeos, *Marmosops bishopi* e *Monodelphis emiliae* restritas ao sul do rio Amazonas (GARDNER e CREIGHTON, 2008; ROSSI *et al.*, 2010). Esse rio também atua como barreira geográfica para outros grupos de mamíferos, como os roedores

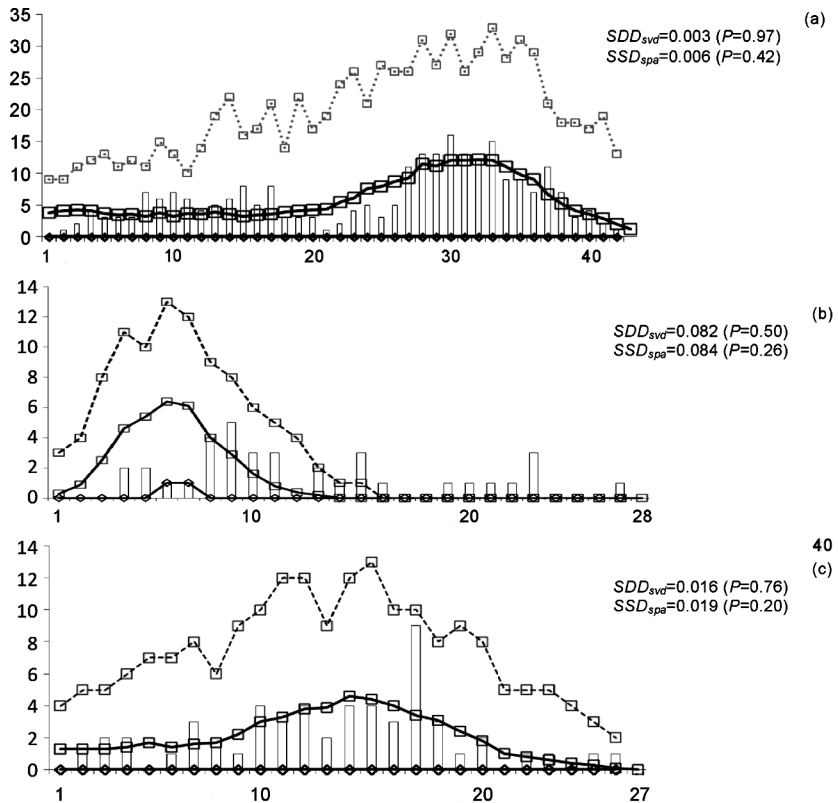


Figura 6 - Distribuição par-a-par das curvas observadas e simuladas para *Marmosa murina* com o mt-Cytb para (a) todos os cladogramas, (b) clado I ao norte do rio Amazonas, e (c) clado II Tapajós - Araguaia. O clado III sudeste do Brasil não foi analisado devido ao número restrito de amostras. Barras brancas= distribuição observada; linhas sólidas= distribuição em modelo de expansão simulada; linhas tracejadas= percentagens respectivas de 95% e 5%; SSD_{svd} e SSD_{spa}= soma dos desvios quadrados de acordo com um modelo de expansão populacional súbita (Svd) e espacial (Spa).

sigmodontíneos do gênero *Zygodontomys*, restrito ao norte desse rio, e do gênero *Oxymycterus* restrito ao sul. O mesmo se observa para os gêneros *Oecomys* e *Oligoryzomys*, com as espécies *Oecomys trinitatis*, *Oecomys concolor* e *Oligoryzomys fulvescens* restritas à margem esquerda do rio Amazonas, e *Oecomys bicolor*, *Oecomys roberti* e *Oligoryzomys microtis*, restritas à margem direita (BONVICINO *et al.*, 2008). O rio Amazonas também é barreira para a distribuição de roedores *Echimyidae* como espécies do gênero *Proechimys*, com *P. quadruplicatus*, *P. arapubu*, *P. guyannensis* e *P. goeldi* restritas à margem

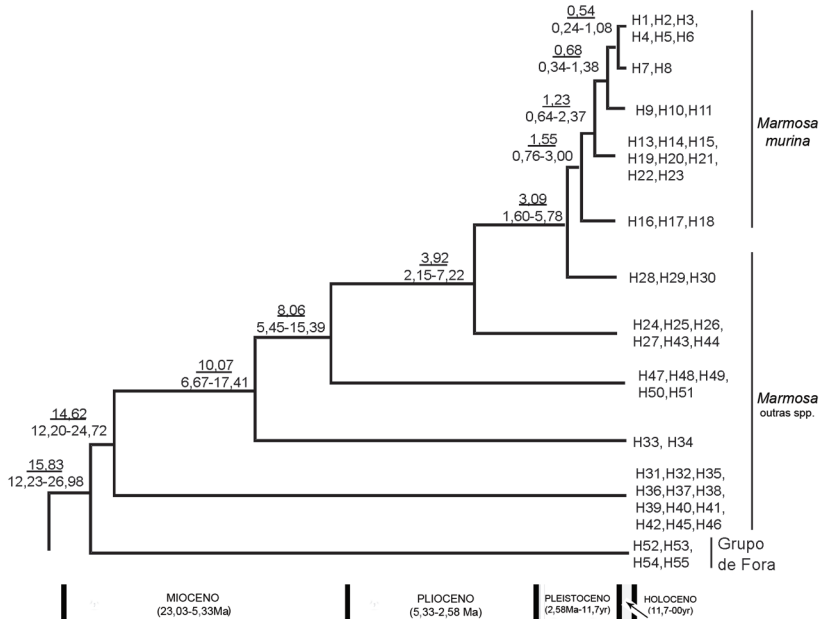


Figura 7 - Topologia da análise Bayesiana com mt-Cytb e pontos de calibração baseados na separação de Caluromyidae de Didelphidae e na separação de *Marmosa* dos demais gêneros.

esquerda, e *P. kulinae*, *P. simonsi*, *P. pattoni*, *P. gardneri* e *P. steerei* restritas à margem direita (BONVICINO *et al.*, 2008). O papel do rio Amazonas como barreira para primatas é evidente, com táxons restritos à margem esquerda (*Saguinus midas*, *S. nigricollis*, *Cebus olivaceus*, *Aotus trivirgatus*, *Aotus vociferans*, *Alouatta seniculus*, *Ateles paniscus*, *Logothrix lagotricha*, *Callicebus torquatus*, *Chiropotes chiropotes*, *Pithecia pithecia*) e táxons restritos à margem direita (*Mico acariensis*, *M. emiliae*, *M. intermedius*, *M. manicoirensis*, *M. mauesi*, *M. nigripes*, *Saguinus imperador*, *S. melanoleucus*, *Saimiri boliviensis*, *Saimiri ustus*, *Alouatta nigerrima*, *Ateles marginatus*, *Logothrix cana*, *Callicebus moloch*, *Chiropotes albinasus*, *Pithecia irrorata*) (GREGORIN *et al.*, 2010).

O marcador mitocondrial mostrou estruturação no clado II da região Tapajós-Araguaia, separando os haplótipos do lado leste do médio e baixo rio Araguaia dos haplótipos do oeste desse rio, enquanto o *e28-vWF* não mostrou essa estruturação. Uma possível explicação seria a origem recente desse rio, no Holoceno (LANTRUBESS *et al.*, 2005), posterior à diferenciação da linhagem de *M. (Marmosa) murina*, e muito recente para possibilitar diferenciação no marcador nuclear *e28-vWF*, que tem taxas de mutação mais lentas que o marcador mitocondrial (BROWN *et al.*, 1979). O médio/baixo rio Araguaia atua

como barreira para os roedores *Rhipidomys macconnelli* na margem esquerda e *R. macrurus* na margem direita (BONVICINO *et al.*, 2008), e para espécies de primatas, com *Callithrix penicillata* e *Chiropotes utahickae*, restritos à margem direita do rio, e *Cebus cay*, restrito à margem esquerda no médio rio Araguaia (GREGORIN *et al.*, 2010).

A análise de rede com o *mt-Cytb* recuperou a topologia das análises de máxima verossimilhança e Bayesiana, com três cladogramas para *M. (Marmosa) murina*, e vários vetores médios ligando esses cladogramas e os haplótipos em cada um deles, que podem ser interpretados como haplótipos não amostrados ou extintos (BANDELT *et al.*, 1999). Esses cladogramas apresentaram maior número de mutações entre eles do que dentro de cada um. Apesar dessa estruturação, as estimativas de distância genética inter cladogramas foram menores que as estimativas de distância entre as espécies de *Marmosa* (Tabela 3), sugerindo que os cladogramas pertencem a uma única espécie. Os valores de variância baixos, e as curvas multimodais observados na análise par-a-par das populações de *M. (Marmosa) murina* indicam que essa espécie está em expansão (SLATKIN e HUDSON, 1991; ROGERS e HARPENDING, 1992). A idade estimada para o surgimento de *M. (Marmosa) murina* foi de aproximadamente 1,55 Ma, durante a metade inicial do Pleistoceno. Neste período o rio Amazonas já estava formado (10,5 Ma, Mioceno; LOURENS *et al.*, 2004; RAFFI *et al.*, 2006), com grande volume de água e com o mesmo curso atual (LATRUBESSE *et al.*, 2005). A colonização de *M. (Marmosa) murina* de uma margem para a outra do rio deve ter sido possibilitada pelas alternâncias glaciares ao longo do Pleistoceno (POSADAS e ORTIZ-JAUREGUIZAR, 2010), que produziram expansões e contrações de ambientes áridos e úmidos levando a mudanças no volume de água do rio Amazonas. Durante o Holoceno o rio Amazonas se tornou uma barreira ainda mais efetiva devido às mudanças do volume de água em sua bacia (LATRUBESSE *et al.*, 2005), que levaram a transformação de rio com alta taxa de acréscimo vertical para rio de maior atividade lateral. Nossas análises mostram que as populações de *M. (Marmosa) murina* de margens diferentes do rio Amazonas estão isoladas uma das outras, e são monofiléticas com relação às populações da margem oposta, preenchendo os requisitos necessários para considerar o rio Amazonas como barreira geográfica (PATTON e DA SILVA, 1998; BONVICINO e WEKSLER, 2012). O mesmo se aplica às populações de lados opostos do rio Araguaia, apesar da idade do rio Araguaia ser mais recente, datada para o Holoceno (BAYER, 2002; LATRUBESSE e STEVAUX, 2002).

Assim, pode-se concluir que a estruturação atual de *M. (Marmosa) murina* resulta de um extenso e dinâmico processo histórico, marcado por mudanças nas condições climáticas e ambientais durante o Quaternário, que possibilitaram longos períodos de isolamento entre populações, resultando nas atuais condições biogeográficas evidenciadas por *M. (Marmosa) murina*, onde os rios tem um papel importante na estruturação populacional.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Heitor Herrera (Fazenda Alegria), Conservation Internacional (Fazenda Rio Negro), Ana Flávia B. de Andrade (Fazenda Cadoz), Scott M. Lindbergh (Fazenda Vão dos Bois) e Theodoro de Hungria Machado (Fazenda São Francisco da Trijunção) pela permissão para realizar coletas de amostras para este estudo. Agradecemos também aos colaboradores da equipe de campo do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios Silvestres, IOC, FIOCRUZ. O SISBIO concedeu as licenças de coleta. Somos gratos a Dra. F. Caramaschi pelas sugestões de uma versão anterior deste manuscrito, e ao Dr. H. Seuánez pela correção do abstract. Marcelo Weksler gentilmente revisou a última versão do manuscrito. Apoio financeiro foi recebido do CNPq e FAPERJ para CRB, e CNPq para JAO e MBF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANISIMOVA, M. e GASCUEL, O. 2006 - Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55: 539-552.
- BAYER, M. 2002 - **Diagnóstico dos processos de erosão/assoreamento na planície aluvial do rio Araguaia: entre Barra do Garças e Cocalinho**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás: UFG-IESA. 138 p.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P. e ROHL, A. 1999 - Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- BOHONAK, A. J. 2002 - IBD (Isolation by Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal Heredity* 93: 153-154.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A. e D'ANDREA, P. S. 2008 - **Guia dos Roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS, Rio de Janeiro.
- BONVICINO, C. R. e WEKSLER, M. 2012 - Speciation in Amazonia: Patterns and Predictions of a Network of Hypotheses; pp 283-306. In: Patterson B. D. e Costa, E. P. (eds.). **Bones Clones and Biomes**. University of Chicago Press, Chicago.
- BRAUN, J.K.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; MORTON, P. K. e MARES, M. A. 2005 - Phylogenetic and Biogeographic Relationships of Mouse Opossums *Thylamys* (Didelphimorphia: Didelphidae) in Southern South America. *Journal of Mammalogy* 86: 157-159.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M. J. R. e WILSON, A. C. 1979 - Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1967-1971.

- CARAMASCHI, F.P.; NASCIMENTO, F. F.; CERQUEIRA, R. e BONVICINO, C. R. 2011 - Genetic diversity of wild populations of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia: Didelphidae), in Brazilian landscapes. *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 251–263.
- CARVALHO, C. J. B. e DE ALMEIDA, E. A. B. 2011 - **Biogeografia da América do Sul: padrões & processos**. Editora Roca, São Paulo.
- COSTA, L. P. 2003 - The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71-86.
- DRUMMOND, A. J. e RAMBAUT, A. 2007 - BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 1-214.
- DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y.; PHILLIPS, M. J. e RAMBAUT, A. 2006 - Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology* 4: 1-88.
- EXCOFFIER, L. 2004 - Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island models. *Molecular Ecology* 13: 853-864.
- FELSENSTEIN, J. 1981 - “Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach”. *Journal of molecular evolution* 17: 368–376.
- GARDNER, A. L. e CREIGHTON, G.K. 2008 - **Mammals of South American. Marsupials, xenarthrans, shrews and bats. Vol.1**. Chicago University Press, Chicago.
- GREGORIN, R.; SIMÕES, S. A. M.; LIMA, I. J. e SILVA JÚNIOR, J. S. 2010 - Ordem Primates. 101-211. In: **Mamíferos do Brasil: Guia de Identificação**. Technical Books, Rio de Janeiro.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M. e HORDIJK, W. 2010 - New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.
- GUINDON, S. e GASCUEL O. 2003 - A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- GUTIÉRREZ, E. E.; JANSÁ, S. A. e VOSS, R. S. 2010 - Molecular systematics of mouse opossums (Didelphidae: *Marmosa*): assessing species limits using mitochondrial DNA Sequences, with comments on phylogenetic relationships and biogeography. *American Museum Novitates* 3692: 1–22.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H. e YANO, T. A. 1985 - Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- HUELSENBECK, J. P. e RONQUEST, F. 2001 - MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- JENSEN, J. L.; BOHONAK, A. J. e KELLEY, S. T. 2005 - Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13 p.

- KEANE, T. M.; CREEVERY, C. J.; PENTONY, M. M.; NAUGHTON, T. J. e MCLNERNEY, J. O. 2006 - Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology* 6: 1-29.
- KIMURA, M. 1980 - A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* 16: 111–120.
- KIRSCH, J. A. W. e PALMA, R. E. 1995 - DNA/DNA hybridization studies of carnivorous marsupials. V. A further estimate of relationships among opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Mammalia* 59: 403–425.
- LATRUBESSE, E.M; STEUVAX, J.C. e SINHA, R. 2005 - Grandes Sistemas Fluviais Tropicais: Uma Visão Geral. *Revista Brasileira de Geomorfologia* Ano 6 (1): 1-18.
- LATRUBESSE, E. e STEVAUX, J. C. 2002 - Geomorphology and environmental aspects of Araguaia fluvial basin, Brazil. *Geomorphologie* 129: 109-127.
- LIBRADO, P. e ROZAS, J. 2009 - DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- LOURENS, L.; HILGEN, F.; SHACKLETON, N. V. J.; LASKAR, J. e WILSON, D. 2004 - The Neogene Period. pp 409–440. In: GRADSTEIN, F. M.; OGG, J. G. e SMITH, A. G. (eds.). **A Geologic Time Scale**. Cambridge University Press, Cambridge..
- MCCARTHY, C. 1998 - **Chromas 1.45**. School of Health Science, Griffith University, Southport.
- MARSHALL, L. G. 1976 - New didelphine marsupials from the La-Venta fauna Miocene of Colombia South America. *Journal of Paleontology* 50: 402–418.
- MUSTRANGI, M. A. e PATTON, J. L. 1997 - Phylogeography and systematics of the slender mouse opossum Marmosops (Marsupialia, Didelphidae). *University of California Publications in Zoology* 130: 1–86.
- PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SALVATORE, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A. e PATTON, J. L. 2012 - **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição / 2nd Edition**. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, 76p.
- PALMA, R. E. 1995 - Range expansion of two South American mouse opossums (Thylamys, Didelphidae) and their biogeographic implications. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 515–522.
- PALMA, R. E.; RIVERA-MILLA, E.; YATES, T. L.; MARQUET, P. A. e MEYNARD, A. P. 2002 - Phylogenetic and biogeographic relationships of the mouse opossum Thylamys (Didelphimorphia, Didelphidae) in Southern South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 245–253
- PATTON, J. L. e COSTA, L. P. 2003 - Molecular Phylogeography and Species

- Limits in Rainforest Didelphid Marsupials of South America. pp. 63-81 In: JONES, M. D. C. e ARCHER, M. (eds.). **Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials**. Csiro Publishing, Collingwood, .
- PATTON, J. L. e DA SILVA, M. F. 1998 - Rivers, refuges, and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. pp. 202–213 In: HOWARD, D. e BERLOCHER, S. (eds.). **Endless forms: modes and mechanisms of speciation**. Oxford University Press, Oxford.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. 2001 - Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50 (4): 580-601.
- POSADAS, P. e ORTIZ-JAUREGUIZAR, E. 2011 - Evolução da Região Andina da América do Sul pp 175-188 In: CARVALHO, C. J. B. e DE ALMEIDA, E. A. B. (orgs.). **Biogeografia da América do Sul: padrões & processos**. Editora Roca, São Paulo.
- RAFFI, I.; BACKMAN, J.; FORNACIARI, E.; PALIKE; DOMENICO, R. H.; LOURENS, L. e HILGEN, F. 2006 - A review of calcareous nannofossil astrochronology encompassing the past 25 million years: *Quaternary Science Reviews* 25: 3113–3137.
- RAMBAUT, A. e DRUMMOND, A. J. 2007 - Tracer v. 1.5. Available from: Computer program and documentation distributed by the authors at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- ROGERS, A. R. e HARPENDING, H. C. 1992 - Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution* 9: 552-569.
- RONQUIST, F. e HUELSENBECK, J. P. 2003 - MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; CARMIGNOTTO, A. P. e MIRANDA, C. L. 2010 - Ordem Didelphimorphia.19-74. pp In: **Mamíferos do Brasil: Guia de Identificação**. Technical Books, Rio de Janeiro.
- SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. W. 2001 - **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHNEIDER, S. e EXCOFFIER, L. 1999 - Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079–1089.
- SLATKIN, M. e HUDSON, R. R. 1991 - Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- SOLARI S. 2010 - A molecular perspective on the diversification of short-tailed opossums (Monodelphis: Didelphidae). *Mastozoología Neotropical* 17: 317-333.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. e KUMAR, S. 2007 - MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- TAMURA, K. e KUMAR, S. 2002 - Evolutionary distance estimation under

- heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular Biology Evolution* 19: 1727–1736.
- TATE, G. H. H. 1933 - A systematic revision of the marsupial genus *Marmosa*, with a discussion of the adaptative radiation of the murine opossums (*Marmosa*). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 66: 1-250.
- VOSS, R. S. e JANSA, S. A. 2009 - Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322: 1-177.
- XIA, X.; XIE, Z.; SALEMI, M.; CHEN, L. e WANG, Y. 2003 - An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1-7.
- XIA, X. e LEMEY, P. 2009 - Assessing substitution saturation with DAMBE. pp 615-630 In: LEMEY, P.; SALEMI, M. e VANDAMME, A. M. (eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. 2nd edition Cambridge University Press. Cambridge.
- WILSON, D. E. e REEDER, D. M. 2005 - **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference** vol. 2. (3rd ed). Johns Hopkins University Press, Baltimore. 2142 p.