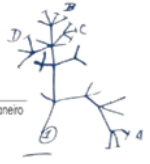




Programa de Pós-graduação em
**Biodiversidade &
Biologia Evolutiva**
Instituto de Biologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Marcelo de Assis Passos Oliveira

Estudo de genética de população de *Trinomys
dimidiatus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) no Estado do
Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

Marcelo de Assis Passos Oliveira

**Estudo de genética de população de
Trinomys dimidiatus (RODENTIA:
ECHIMYIDAE) no Estado do Rio
de Janeiro**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biologia Evolutiva,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, para obtenção do título de
Mestre em Biodiversidade e Biologia
Evolutiva.

Orientadora: Haydée de Andrade Cunha

Coorientadora: Maja Kajin

Rio de Janeiro

2017

Oliveira, Marcelo de Assis Passos.

Estudo de genética populacional de *Trinomys dimidiatus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) no Estado do Rio de Janeiro / Marcelo de Assis Passos Oliveira. - Rio de Janeiro, 2017.

103f.

Orientadora: Haydée de Andrade Cunha

Coorientadora: Maja Kajin

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2017.

1. Rato de espinho 2. Rio de Janeiro 3. Citocromo b 4. Mata Atlântica 5. Fragmentação 6. Genética da Conservação I. Cunha, Andrade Haydée. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Dissertações.

Marcelo de Assis Passos Oliveira

**Estudo de genética de população de
Trinomys dimidiatus (RODENTIA:
ECHIMYIDAE) no Estado do Rio
de Janeiro**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biologia Evolutiva,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, para obtenção do título de
Mestre em Biodiversidade e Biologia
Evolutiva.

Aprovado por:

Dra. Leila Maria Pessôa, UFRJ (Presidente)

Dr. Anderson Vilasboa Vasconcellos, UERJ

Dra. Helena de Godoy Bergallo, UERJ

Dr. Leonardo dos Santos Avilla, UFRJ (Suplente)

Dr. César Rogério Leal do Amaral, UERJ (Suplente)

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que estiveram comigo nesta caminhada, principalmente a minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Haydée Andrade Cunha, que acreditou no projeto e aceitou o convite para me orientar, me auxiliando sempre que foi preciso. Agradeço muito por ter topado esse desafio.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à professora Dra. Maja Kajin, que desempenhou brilhantemente seu papel como coorientadora, e nas horas de aperto se mostrou uma grande amiga. Sempre muito atenciosa, carinhosa, e é claro rigorosa quando necessário. Agradeço por acreditar no meu potencial quando eu mesmo duvidava. Serei eternamente grato, e espero que nossa amizade e parceria dure por longos e longos anos.

Também devo a todos os meus colegas do Laboratório de Mamíferos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, especialmente a Verônica Parente, Chaenny da Silva, Yan Gabriel Ramos e Ana Carolina Lacerda. Sem eles esse projeto jamais teria ocorrido. Agradeço a todos os momentos em campo e a todas as discussões, nem sempre animadores que tivemos.

Agradeço a todos do Laboratório de Diagnóstico por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, especialmente a professora Dra. Dayse Silva. Sem sua parceria jamais teria sido possível o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço ao Laboratório de Vertebrados da universidade Federal do Rio de Janeiro por ceder boa parte das amostras utilizadas neste trabalho, especialmente a Dra. Ana Cláudia Delciellos e ao professor Dr, Rui Cerqueira.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e aos Programas de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva (UFRJ) e de Ecologia e Evolução (UERJ) pelas disciplinas oferecidas.

Agradeço a todos os meus colegas de mestrado, que puderam proporcionar discussões enriquecedoras e trocas de conhecimento em todas as disciplinas.

Agradeço também à minha família, especialmente aos meus pais Denize e Paulo, à minha vó Elza, irmã Milena e noiva Renata, por conviverem comigo diariamente, dando todo o suporte necessário, me enchendo de carinho e amor, e por toda paciência nas crises diárias. Agradeço também por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial. Agradeço ao meu cunhado Leonardo, por sempre me ajudar com a edição de mapas e figuras. E aos meus tios Paulo, Vânia, Denise e Walner por todo apoio e orgulho. Por fim, agradeço à pessoinha que me faz sempre ter forças para caminhar todos os dias, minha filha Maria Eduarda. Sempre me proporcionando momentos de muito amor e descontração, principalmente nas horas mais difíceis. Papai te ama!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa de remanescentes da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica, 2017) contendo as localidades utilizadas no presente estudo espécie. **Pág. 34**
- Figura 2:** Rede de haplótipos com as linhagens identificadas. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os números em vermelho mostram o número de passos mutacionais entre dois haplótipos. **Pág. 43**
- Figura 3:** Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas (Teste de Mantel). **Pág. 46**
- Figura 4:** Distribuição *mismatch* do gene citocromo b para *Trinomys dimidiatus* nas quatro populações encontradas. As linhas cheias indicam o comportamento esperado sob um cenário de expansão e as linhas pontilhadas o comportamento observado. Figura 4a: Análise da distribuição das diferenças sob o cenário de expansão demográfica; figura 4b: Análise da distribuição das diferenças sob o cenário de expansão geográfica. **Pág. 49**

Figura 5: Bayesian Skyline Plot das quatro populações de *T. dimidiatus* definidas, mostrando a flutuação do tamanho efetivo nestas ao longo do tempo. (A) Bocaina (B) PCHB (C) Garrafão e (D) Rancho Frio.

Pág. 51

Figura 6: Figura 6A: *Trinomys dimidiatus*. Figura 6B: *Trinomys iheringi*. Fotos cedidas por Yan Gabriel Ramos e Ana Carolina Lacerda, respectivamente.

Pág. 81

Figura 7: Mapa altimétrico da Ilha Grande evidenciando a localização da Ilha Grande e os dois módulos do RAPELD; Figura 7B: Módulo Leste do RAPELD implementado na Ilha Grande contendo os respectivos pontos de coleta do presente estudo. Mapas retirados e modificados do site: <http://www.rapeld-igrande.uerj>

Pág. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localidades do presente estudo com seus respectivos tamanhos amostrais. **Pág. 33**

Tabela 2: Sequências de citocromo b de espécimes de *T. dimidiatus* obtidas no GenBank, com seus respectivos números de acesso, localidade e município. **Pág. 37**

Tabela 3: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parciais do gene do Citocromo b (803pb). **Pág. 38**

Tabela 4: Número de indivíduos por haplótipo em cada localidade. Localidades: Garrafão (GAR), Rancho Frio (RF), Bocaina (BOCA), PCH Braço (PCHB); Pontos de coleta das sequências provenientes do GenBank: Mambucaba (MAMBU), Fazenda Inglesa (PET), Mata da Rifa (MR), Fazenda Nova Friburgo (NF). **Pág. 42**

Tabela 5: Número de espécimes (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos observados (K), diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π) e desvio padrão (SD). **Pág. 42**

Tabela 6: Valores de F_{ST} nas comparações par a par entre todas as localidades. Os valores em negrito foram significativos após correção de Bonferroni sequencial. Valores de p estão representados entre parênteses **Pág. 45**

Tabela 7: Valores de Φ_{ST} nas comparações par a par entre todas as localidades. Os valores em negrito foram significativos após correção de Bonferroni sequencial. Valores de p estão representados entre parênteses **Pág. 45**

Tabela 8: Análise Molecular de Variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos a priori. As populações com a mesma cor pertencem a um mesmo agrupamento testado em cenário com duas e três populações (k=2 e 3, respectivamente). **Pág. 47**

Tabela 9: Testes de neutralidade com 10000 réplicas para as quatro populações encontradas. Valores de P não significativos: D de Tajima ($p > 0,05$); F_s de F_u ($p > 0,02$). **Pág. 47**

Tabela 10: Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com Intervalo de confiança de 95% para um dado parâmetro; t= tempo em gerações desde o evento de expansão; SSD =soma dos quadrados dos desvios e PSSD = valor de p associado; r= índice "raggedness" e Pr = valor de p associado; τ = valor de tau; μ = taxa de substituição/sítio/ano; pb=pares de base. **Pág. 48**

Tabela 11: Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão geográfica com Intervalo de confiança de 95% para um dado parâmetro; t = tempo em gerações desde o evento de expansão; SSD =soma dos quadrados dos desvios e PSSD = valor de p associado; r = índice "raggedness" e Pr = valor de p associado; τ = valor de tau; μ = taxa de substituição/sítio/ano; pb =pares de base.

Pág. 48

Tabela 12: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parciais dos genes do cit b (803pb) e vWF (493pb). R = purina (A/G) e Y= pirimidina (C/T).

Pág. 87

Tabela 13: Sequências de citocromo b e vWF de espécimes de *T. dimidiatus* e *T. iheringi* obtidas no GenBank, com seus respectivos números de acesso.

Pág. 90

Tabela 14: Sítios diagnósticos do marcador nuclear vWF, analisados para identificação das espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi*

Pág. 90

Tabela 15: Sítios diagnósticos do marcador mitocondrial cit b, analisados para identificação das espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi*

Pág. 91

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Estrutura populacional e Filogeografia de <i>Trinomys dimidiatus</i> (Günther, 1876) ECHIMYIDAE.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1) INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Efeitos da fragmentação de <i>habitat</i> e sua relação com populações de pequenos mamíferos.....	18
1.2. A fragmentação da Mata Atlântica.....	20
1.3. O ADN mitocondrial como marcador molecular.....	22
1.4. Genética de populações e filogeografia.....	24
1.5. Análises em genética de populações e filogeografia.....	27
1.6. Genética da Conservação.....	30
1.7. O rato de espinho <i>Trinomys dimidiatus</i>.....	31
2) OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivos gerais.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Pontos de coleta.....	33
3.2. Obtenção de amostras.....	36
3.3. Extração de ADN, amplificação e sequenciamento.....	37
3.4. Alinhamento das sequências.....	39
3.5. Análises populacionais e de demografia histórica.....	39
4) RESULTADOS.....	41
4.1. Diversidade molecular.....	41
4.2. Estruturação populacional.....	44
4.3. Demografia histórica.....	47
5) DISCUSSÃO.....	52
5.1. Estruturação populacional de <i>Trinomys dimidiatus</i>.....	52
5.2. Filogeografia.....	55
5.3. Relevância para conservação.....	57
6) CONCLUSÕES.....	59
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

CAPÍTULO 2 – <i>Trinomys dimidiatus</i> ou <i>Trinomys iheringi</i>? Identificação molecular e investigação da existência de híbridos entre os espécimes de <i>Trinomys</i> Thomas, 1921 na Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.....	lxxvi
RESUMO.....	lxxvii
ABSTRACT.....	lxxviii
1) INTRODUÇÃO.....	79
1.1. O gênero <i>Trinomys</i>.....	79
1.2. <i>Trinomys dimidiatus</i> x <i>Trinomys iheringi</i>.....	80
1.3. Identificação molecular e investigação da existência de híbridos.....	81
1.4. <i>Trinomys</i> e sua relação com a Ilha Grande.....	83
2) OBJETIVOS.....	84
2.1. Objetivo geral.....	84
2.2. Objetivo específico.....	85
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	85
3.1. Obtenção de amostras.....	85
3.2. Extração de ADN, amplificação e sequenciamento.....	87
3.3. Alinhamento das sequências.....	88
3.4. Identificação molecular e verificação de hibridização.....	89
3.5. Diversidade Molecular.....	92
4) RESULTADOS.....	92
4.1. Identificação molecular e verificação de hibridização.....	92
4.2. Diversidade Molecular.....	92
4.2.1. Citocromo b.....	92
4.2.2. vWF.....	93
5) DISCUSSÃO.....	93
6) CONCLUSÕES.....	95
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8) ANEXOS.....	103

Estrutura populacional e Filogeografia de *Trinomys dimidiatus* (Günther, 1876)

ECHIMYIDAE

RESUMO

O rato de espinho (*Trinomys dimidiatus*) é uma espécie de roedor endêmica da Mata Atlântica, com distribuição do Estado do Rio de Janeiro até a costa norte de São Paulo. A Mata Atlântica já perdeu mais de 80% de sua distribuição original e o que resta desse bioma, hoje, é caracterizado pelo alto grau de fragmentação, onde grande parte dos remanescentes é formada por fragmentos pequenos e isolados. Sendo assim, tornou-se extremamente necessário entender a distribuição e estruturação das espécies a fim de compreender o possível agravante que a fragmentação pode acarretar na persistência das espécies remanescentes no bioma. Os objetivos deste trabalho foram investigar a estrutura populacional de *T. dimidiatus* em escala macro-geográfica, no Estado do Rio de Janeiro, bem como inferir a filogeografia da espécie. Para isso, foram utilizadas sequências do marcador mitocondrial citocromo b de quatro localidades do Estado do Rio de Janeiro (Garrafão, Rancho Frio, PCHB e Bocaina), pertencentes a quatro municípios (Guapimirim, Teresópolis, Rio Claro e Paraty). Estas localidades constituem uma parte representativa da distribuição da espécie. Foram analisadas 73 amostras das quatro localidades cobrindo 803 pares de bases do gene citocromo b. Os dados moleculares foram analisados com diferentes abordagens, tais como índices de estruturação F_{ST} e Φ_{ST} , Análise Molecular de Variância (AMOVA) e *Bayesian Skyline Plot* (BSP). Os resultados apontaram para uma alta diferenciação genética, indicando a existência de quatro populações distintas (Garrafão, Rancho Frio, PCHB e Bocaina). Os valores de F_{ST} e Φ_{ST} foram significativos entre todas as localidades e variaram de 0,148 a 0,595, e de 0,162 a 0,928, respectivamente. Foi observada uma alta correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, o que contribui para a estruturação genética da espécie. Na AMOVA, de todos os agrupamentos testados, o que melhor explicou os resultados foi a separação das localidades em três populações (Rancho Frio + Garrafão; PCHB e Bocaina). Os resultados indicam que mesmo entre localidades mais próximas (p. ex. Garrafão e Rancho Frio, onde a distância é de apenas 3,7 km), já existe uma estruturação populacional considerável. Os resultados das análises de demografia histórica mostraram que na maioria das localidades não se pode descartar eventos de expansão populacional e/ ou geográfica. Assim, o atual cenário de fragmentação da Mata Atlântica pode ter consequências graves na persistência desta espécie, que apresenta alta estruturação mesmo em floresta contínua.

Palavras-chave: rato de espinho, Rio de Janeiro, citocromo b, Mata Atlântica, fragmentação, genética da conservação.

ABSTRACT

The spiny rat (*Trinomys dimidiatus*) is a rodent species from the Atlantic Forest, with distribution from the State of Rio de Janeiro to the north coast of São Paulo. The Atlantic Forest has lost more than 80% of its original distribution and what remains of this biome today is characterized by a high degree of fragmentation, where most of the remnants are formed by small and isolated fragments. Thus, it has become extremely necessary to understand species distribution and genetic structuring to understand the consequences that fragmentation can have on their persistence in the biome. The objectives of this work were to investigate the population structure of *T. dimidiatus* on a macro-geographic scale, in the State of Rio de Janeiro, and investigate the phylogeography of the species. For this, sequences of the mitochondrial marker cytochrome b from four localities of Rio de Janeiro (Garrafão, Rancho Frio, PCHB e Bocaina), corresponding to four counties, were used. These localities cover most of the species distribution. We analyzed 73 cytochrome b sequences (803 bp). Molecular data were analyzed using different approaches, such as the fixation indices F_{ST} and Φ_{ST} , Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and *Bayesian Skyline Plot* (BSP). The results showed a high genetic differentiation, indicating the existence of four distinct populations (Garrafão, Rancho Frio, PCHB and Bocaina). The values of F_{ST} and Φ_{ST} were significant and ranged from 0.148 to 0.595, and from 0.162 to 0.928, respectively. A high correlation between genetic and geographic distances was observed, which probably contributes to the genetic structuring of the species. In AMOVA, the group that best explained the results was the separation of localities in three populations (Rancho Frio + Garrafão, PCHB and Bocaina). The results indicate that there is population structure even among the closest localities (Garrafão and Rancho Frio, where the distance is only 3.7 km). The results concerning demographic history have shown that in most places population and / or geographical expansion events cannot be ruled. Thus, the current scenario of fragmentation of the Atlantic Forest may have serious consequences on the persistence of this species, which presents high structure even in continuous forest.

Keywords: spiny rat, Rio de Janeiro, cytochrome b, Atlantic forest, fragmentation, conservation genetics.

1) INTRODUÇÃO

1.1.Efeitos da fragmentação de *habitat* e sua relação com populações de pequenos mamíferos

Atualmente uma grande parte das espécies silvestres está sujeita a dois processos consequentes das intensas ações antrópicas: a fragmentação e destruição de habitat natural (Tilman *et al.*, 1994). Tais processos alteram a qualidade e a conectividade dos habitats (Wilson *et al.*, 2016), podendo gerar consequências persistentes, prejudiciais e imprevisíveis para algumas espécies. A fragmentação e a destruição de *habitats* têm sido consideradas como as principais causas da perda da biodiversidade (Pereira *et al.*, 2010; Rands *et al.*, 2010; Wu, 2013; Haddad *et al.*, 2015), convertendo áreas de habitat contínuas em manchas menores e mais isoladas - ilhas de *habitat* (Fahring, 2003), separadas por uma matriz modificada pela ação antrópica (Haddad *et al.*, 2015).

Três mecanismos relacionados à fragmentação de *habitat* ocasionam consequências ecológicas relevantes ao ambiente fragmentado, são eles: os atribuídos à perda direta do *habitat*; os relacionados às mudanças na configuração espacial da paisagem (p.ex. a redução do tamanho da mancha de habitat, o aumento do isolamento das manchas e área de borda aumentada); e por fim os efeitos indiretos relacionados à mudança na configuração espacial e os efeitos da interação entre os fragmentos e a matriz (Wilson *et al.*, 2016). Dentro dos mecanismos citados anteriormente, os efeitos de borda e os efeitos de área são os fatores mais importantes para acarretar em mudanças nas comunidades presentes em áreas fragmentadas (Nascimento; Laurance, 2006). Os efeitos de área consistem nas mudanças ecológicas recorrentes da fragmentação de *habitat*, mais precisamente o isolamento das manchas, sendo seu efeito proporcional ao tamanho dos fragmentos. O efeito de borda decorre das mudanças abióticas e bióticas que ocorrem próximo das bordas florestais, quando comparadas às condições encontradas no interior da mancha (Ries *et al.*, 2004; Nascimento; Laurance, 2006; Laurance *et al.*, 2011). As bordas promovem mudanças nas condições ambientais (Turner, 1996), na abundância e distribuição das espécies (Chiarello, 1999; Haddad *et al.*, 2015), e ainda mudanças nas interações ecológicas entre as espécies (Laurance, 1990; Patton, 1994). Ambos os fatores operam em conjunto, já que quanto menor o fragmento maior é a razão do tamanho da borda em relação à área (Zuidema *et al.*, 1996). Essas modificações nas condições podem acarretar, por exemplo, em uma impermeabilidade aos movimentos migratórios, principalmente às espécies especialistas (Brodie *et al.*, 2015). Somado a estes fatores, algumas

espécies evitam se estabelecer em áreas próximas às bordas, o que reduz drasticamente a disponibilidade de *habitat* (Zurita *et al.*, 2012).

A diminuição da área, o isolamento entre os fragmentos e o aumento da proporção de borda possuem efeitos diretamente proporcionais na abundância das espécies, e na diminuição dos movimentos migratórios, que tendem a acontecer (Haddad *et al.*, 2015). Tais consequências aqui expressas (redução na abundância e nos movimentos migratórios) podem estar relacionadas à capacidade inferior de persistência das espécies em ambientes menores e mais isolados, que têm os efeitos causados pela fragmentação intensificados (Haddad *et al.*, 2015).

As consequências resultantes do processo de fragmentação causam efeitos a longo prazo, que podem ser generalizáveis desde populações à ecossistemas (Haddad *et al.*, 2015). A fragmentação atinge consistentemente os ecossistemas; diminuindo a riqueza de espécies, reduzindo sua persistência no ambiente natural, ocasionando problemas na retenção de nutrientes, na dinâmica trófica e no fluxo migratório em fragmentos isolados (Haddad *et al.*, 2015). Além disso, a fragmentação pode causar efeitos indiretos, como por exemplo alteração no microclima da região (Laurance *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2016).

Decorrente destes processos e em parte por processos naturais, a maioria dos organismos silvestres encontra-se subdividida em diferentes graus de isolamento, desde populações contínuas, metapopulações ou demes completamente isolados (Wright, 1984). A maioria das espécies não se encontra em panmixia (onde não há restrições ao fluxo gênico e todos os indivíduos podem, teoricamente, se encontrar para acasalar), estando isoladas em diferentes graus (Wright, 1977). Organismos existentes em pequenas manchas de *habitat* isoladas podem ter seu tamanho populacional reduzido, estando sujeitos a uma redução, ou até mesmo uma interrupção de fluxo gênico. Essa redução pode levar a endogamia e conseqüentemente a uma redução da diversidade genética, podendo sujeitar esses organismos a extinções estocásticas (Gaines *et al.*, 1997; Dreshsler e Wissel, 1998). Ecólogos ainda defendem que as extinções também podem ser decorrentes do efeito Allee, onde as populações cujas densidades são muito baixas não conseguem persistir no ambiente por razões ecológicas (Gaines *et al.*, 1997).

A partir do conhecimento gerado com a teoria da biogeografia de ilhas (MacArthur; Wilson, 1967) houve maior atenção à importância do tamanho e isolamento dos fragmentos. Diversos estudos foram empregados posteriormente, transpassando o modelo de equilíbrio insular proposto para ilhas terrestres, ou seja, manchas de *habitat* isoladas, cercadas por uma

matriz modificada pelo homem (Brown; Hutchings, 1997). Por apresentar capacidade de dispersão menor do que organismos voadores, tais como aves e quirópteros, os efeitos causados pela fragmentação, incluindo o efeito de borda e o tamanho dos fragmentos; assim como o isolamento, tornam-se preocupantes para pequenos mamíferos não-voadores (Laurence, 1990). Diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar os efeitos da fragmentação em populações de pequenos mamíferos. Laurance (1991), em um estudo realizado em florestas tropicais na Austrália, verificou um efeito negativo na diversidade de pequenos mamíferos em fragmentos menores e mais isolados. Estudos evidenciaram o aumento da competição e predação de mamíferos, decorrentes dos efeitos da fragmentação (Laurance, 1990). Sendo assim, entender melhor as causas e consequências da fragmentação torna-se cada vez mais necessário para preservação da biodiversidade.

1.2.A fragmentação da Mata Atlântica

As florestas tropicais têm uma grande importância para conservação, principalmente por abrigar quase a metade da biodiversidade encontrada em todo o mundo (Olson; Dinerstein, 2002). O desmatamento nos trópicos aumentou significativamente nos últimos cinquenta anos, fazendo com que o percentual do desmatamento global ultrapassasse um terço de toda a cobertura florestal do planeta (Hansen *et al.*, 2013). Atualmente a área de floresta nativa intacta vem diminuindo em uma velocidade duas vezes maior do que a área total de floresta no planeta (Riitters *et al.*, 2015). Além dos números registrados sobre o desmatamento, grande parte das florestas remanescentes, cerca de 20%, está dentro de 100 metros de uma borda em proximidade com ambientes altamente antropizados (Haddad *et al.*, 2015). Além disso, mais de 70% das florestas encontram-se a 1km de distância de uma borda, fazendo com que a maioria dessas florestas estejam sujeitas a variações ambientais causadas pelas ações humanas (Haddad *et al.*, 2015). As áreas remanescentes que possuem maior extensão encontram-se na Amazônia e nas Bacias do Rio Congo (Haddad *et al.*, 2015).

Dentre as florestas presentes nos trópicos, a Mata Atlântica é importante, pelo seu alto grau de endemismo e alto nível de ameaça (Brown; Brown, 1992; Ribeiro *et al.*, 2010). Sua alta diversidade inclui mais de 20 mil espécies de plantas, mais de 260 espécies de mamíferos, mais de 680 espécies de aves, mais de 200 espécies de répteis e mais de 280 espécies de anfíbios (Silva; Castelani, 2003; Ribeiro *et al.*, 2009). Estima-se que a Mata Atlântica possui de 1 a 8% de toda a biodiversidade do mundo (Silva; Castelani, 2003).

Em contrapartida, a Mata Atlântica possui um cenário de intensa fragmentação (Ribeiro *et al.*, 2010). Grande parte de sua área foi e vem sendo desmatada, principalmente por atividades agrícolas e madeireiras (Williams, 2003). Com cerca de 50% da população brasileira vivendo na região originariamente ocupada pela Mata Atlântica (Bergallo, 1994), que antes possuía uma cobertura vegetal de aproximadamente 150 milhões de hectares (Ribeiro *et al.*, 2009), o bioma hoje é formado predominantemente por pequenos fragmentos (245.173 no total), geralmente menores do que 1000ha, resultantes do intenso desmatamento (Ribeiro *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2015). Os números são piores quando se observa que mais de 80% dos fragmentos de Mata Atlântica são menores do que 50ha (Ribeiro *et al.*, 2009). Além disso, estes fragmentos encontram-se muito próximos a borda, com distâncias menores que 1 km (Haddad *et al.*, 2015). Os números são ainda mais impressionantes quando se compara o percentual de floresta com mais de 1km de distância da borda, que existe atualmente, com o percentual no passado, diminuindo de 90% para apenas 9% de sua totalidade (Haddad *et al.*, 2015). Cerca de 73% da área florestal restante está localizado a menos de 250 m de qualquer área não-florestal (Ribeiro *et al.*, 2009).

Hoje, estima-se que o percentual de remanescentes florestais de Mata Atlântica seja de apenas cerca de 11%, totalizando 15.719.337 ha (Ribeiro *et al.*, 2009). Segundo dados da Fundação SOS Mata Atlântica (2017), no período correspondente aos anos de 2015-2016, houve um aumento do desmatamento de 57,7% em relação ao período anterior (2014-2015). No Rio de Janeiro os números também são preocupantes, com um aumento de 37% do desflorestamento no período de 2015-2016 em relação ao período anterior (2014-2015). Hoje, o Estado possui cerca 20% de remanescente de Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica, 2017). A área total protegida dentro do bioma é de aproximadamente 2,2 milhões de ha o que corresponde a aproximadamente 1,6% do total, sendo que 63% dessas áreas corresponde a região da Serra do Mar (Ribeiro *et al.*, 2009).

Por apresentar elevada biodiversidade, principalmente quando comparada a outros ecossistemas, a biota das florestas tropicais, incluindo a Mata Atlântica, é bastante vulnerável aos efeitos ocasionados pela fragmentação de *habitat* (Myers, 1984). Além disso, seu alto grau de endemismo faz com que diversas espécies raras estejam restritas a pequenas manchas de *habitat*, sendo representadas por pequenas populações, e conseqüentemente mais sujeitas a extinções estocásticas (Diamond, 1980; Andersen *et al.*, 1997). A imigração também possui papel fundamental para a persistência dessas espécies (Laurance, 1991), e a fragmentação de

habitat, por grande parte das vezes, ocasiona o isolamento dessas populações, impedindo a troca de fluxo gênico entre os fragmentos (Haddad *et al.*, 2015).

Portanto, fatores que limitam o fluxo gênico e deixam populações remanescentes cada vez mais isoladas têm se intensificado, tornando mais difícil a persistência de populações silvestres (Haddad *et al.*, 2015). No entanto, há poucos estudos sobre a estrutura populacional dos organismos deste bioma, particularmente sobre populações de mamíferos, tornando-os extremamente relevantes para compreensão dos efeitos da fragmentação sobre as populações de organismos da Mata Atlântica.

1.3.O ADN mitocondrial como marcador molecular

Nas últimas décadas, foi empregada uma variedade de técnicas utilizando marcadores moleculares a fim de detectar variação genética (Schlötterer, 2004). Por serem menos influenciados pelo ambiente e por apresentarem uma infinidade de caracteres informativos dentro de cada espécime, esses marcadores possuem diversas vantagens quando comparados aos marcadores morfológicos, fisiológicos e fenotípicos (Avice, 1994). Constituídos por Ácido Desoxirribonucleico (ADN) ou proteínas, esses marcadores apresentam a característica de herdabilidade, que auxilia no reconhecimento das homologias. Os primeiros marcadores moleculares a serem amplamente utilizados a fim de detectar variação genética foram as alozimas (Harris, 1966; Lewontin; Hubby, 1966; Prakash *et al.*, 1969). Esse marcador possibilita que as variantes proteicas de uma enzima possam ser diferenciadas por eletroforese em gel. Essa diferenciação torna-se possível pois os aminoácidos diferentes que constituem as variantes proteicas atribuem cargas diferentes, e pesos moleculares diferentes (Prakash *et al.*, 1969). Embora tenham sido amplamente utilizadas nos anos 60, as alozimas tiveram seu uso reduzido após a descoberta de outros marcadores, estes agora baseados em ADN, como por exemplo RFLPs (Schlötterer, 2004).

Com a possibilidade de sequenciamento direto dos fragmentos de ADN nuclear e mitocondrial (Sanger *et al.*, 1977), e com a invenção da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*; Mullis; Faloona, 1987), análises da distribuição da variabilidade genética intraespecífica ganharam maior atenção (Schlötterer, 2004; Allendorf, 2017). O sequenciamento de ADN possui uma série de características que explicam a utilização em grande escala em estudos populacionais, como por exemplo, fornece informações completas da região gênica analisada, possui um vasto número de ferramentas analíticas para os dados gerados, e um imenso banco de dados que permite comparar os mais variados resultados (Kreitman, 2000; Schlötterer, 2004).

Os primeiros estudos realizados com ADN mitocondrial a fim de descrever a estruturação genética de mamíferos foram realizados no final da década de 70, antes mesmo da invenção da técnica de PCR, e utilizaram enzimas de restrição para descrever as variações nas sequências (Avice, *et al.*, 1979a, 1979b). O ADN mitocondrial (ADNmt) apresenta vantagens que o tornaram uma ferramenta importante nos estudos de genética de populações e evolução e é amplamente utilizado em estudos de ecologia molecular, filogeografia e genética de populações (Ballard; Whitlock, 2003; Allendorf, 2017). Por possuir transmissão exclusivamente materna na maioria das espécies, o ADNmt tem tamanho populacional efetivo de $\frac{1}{4}$ em relação ao de marcadores nucleares o que, somado à ausência de recombinação e à alta taxa mutacional, o tornam adequado para inferências sobre estruturação populacional e demografia molecular (Avice, 2004). Além disso, o ADNmt apresenta seu conteúdo e arranjo gênico conservados para diversos táxons, o que possibilita o uso de iniciadores universais (Kocher *et al.*, 1989). Assim como no desenvolvimento de estudos de genética de população, as análises de dados provenientes de sequências mitocondriais foram de suma importância para o desenvolvimento empírico da filogeografia (Hickerson *et al.*, 2010). Diversas características deste marcador fizeram com que ele fosse amplamente aplicado em estudos filogeográficos. Como mencionado anteriormente, a falta de recombinação, menor tamanho efetivo populacional, que leva diretamente a um menor tempo para que populações atinjam o monofiletismo, são algumas das principais vantagens da utilização deste marcador para inferir a estrutura populacional e a demografia populacional de diversas espécies (Hickerson *et al.*, 2010).

O gene mitocondrial citocromo b (cit b), contendo 1.140 pares de bases (pb), é amplamente utilizado em análises populacionais e filogeográficas. É empregado com frequência em estudos filogeográficos e filogenéticos realizados com a ordem Rodentia, inclusive com a família Echimyidae, família na qual o gênero *Trinomys*, objeto do presente estudo, está inserido (Lara *et al.*, 1996; Lara; Patton, 2000; Leite; Patton, 2002; Galewski *et al.*, 2005; Loss; Leite, 2011; Agrizzi, 2013; Loss, 2014).

1.4. Genética de populações e filogeografia

A genética de populações, originária dos estudos pioneiros de Wright (1951, 1965) tem como fundamento investigar a variação genética das populações e correlacioná-las a uma possível estruturação espacial. Wright propôs a utilização das estatísticas F , a fim de avaliar a variação genética de maneira hierarquizada. Dentre estas estatísticas, está um dos índices mais utilizados e difundidos em estudos populacionais, o índice de fixação F_{ST} . Além de amplamente utilizado em estudos populacionais, o F_{ST} é de extrema importância em biologia da conservação, biologia evolutiva e genética de populações (Weir; Cockerham, 1984; Meirmans; Hedrick, 2011). É definido, dentre outras formas, como a proporção da variância genética contida nas subpopulações em relação à variância genética total da espécie. Os valores podem variar de 0 a 1. Altos valores de F_{ST} implicam em um considerável grau de diferenciação entre as subpopulações (Wright, 1978). Com os avanços tecnológicos e consequentemente com a possibilidade de utilização de diversos marcadores moleculares, várias estatísticas análogas ao F_{ST} foram desenvolvidas, principalmente para atender as particularidades de cada marcador (Meirmans; Hedrick, 2011). Por exemplo, visando otimizar a utilização de dados oriundos de sequências nucleotídicas, para estudos de genética de populações, Excoffier e colaboradores, em 1992, propõem o uso do índice Φ_{ST} a fim de identificar estruturação populacional. As estatísticas Φ são análogas às estatísticas F de Wright, sendo utilizadas especificamente para dados de sequências.

Embora amplamente utilizados, os modelos de migração, estrutura populacional e demografia baseados no F_{ST} , possuem diversos pressupostos que podem não ocorrer na natureza, tornando algumas análises derivadas de seus resultados pouco realistas (Whitlock; McCauley, 1999; Pearse; Crandall, 2004). Quando comparada a outros métodos, a abordagem baseada no F_{ST} possui uma série de desvantagens, resultantes das premissas irreais na natureza, principalmente considerando estudos de genética da conservação, onde frequentemente, as espécies estudadas estão suscetíveis a efeitos da fragmentação ou ainda ameaçadas de extinção (Kinnison *et al.*, 2002; Pearse e Crandall, 2004). A primeira é que por ser baseada no modelo de Wright-Fisher, a abordagem baseada nas estatísticas F , e suas derivadas, assumem a existência de populações de igual tamanho, com taxas de migração simétricas e constantes, ocorrendo totalmente ao acaso, e com ausência de duas forças extremamente atuantes na natureza, seleção e mutação (Pearse; Crandall, 2004). A segunda desvantagem é que o modelo assume que todas as populações estariam no equilíbrio migração-deriva (Whitlock; McCauley, 1999; Kinnison *et al.*, 2002; Pearse; Crandall, 2004).

E por fim, é impossível diferenciar populações que divergiram há pouco tempo e mantêm um alto fluxo gênico das que divergiram há muito tempo possuindo alta taxa de migração, gerando algumas limitações referentes às interpretações dos resultados (Pearse; Crandall, 2004).

Mesmo com todas as limitações impostas por seus pressupostos, muitas vezes pouco realistas, as análises baseadas no F_{ST} continuaram sendo empregadas frequentemente tanto para descrever a variação genética de (sub) populações, como para estimar de forma indireta o fluxo gênico e a taxa de migração entre elas (Slatkin, 1987; Neigel, 2002; Weir; Hill, 2002). O frequente uso das abordagens baseadas no F_{ST} pode ser explicado pela facilidade de seu uso, sua fácil compreensão, e pela utilização como descritor inicial de variação genética, a fim de comparar com metodologias mais recentes (Courtois *et al.*, 2003; Pearse; Crandall, 2004). Além disso, quando se utiliza um número pequeno de marcadores, a abordagem baseada no F_{ST} possui ótima robustez estatística (Neigel, 2002).

Visando maior entendimento sobre a relação entre a distribuição das espécies e suas relações filogenéticas (inter/intraespecíficas), o biólogo marinho John Avise junto de seus colaboradores desenvolveu a ideia de unir conceitos oriundos da genética de populações e da filogenética em uma única área, cunhando o termo filogeografia (Avise *et al.*, 1987). Definida de forma literal como a análise filogenética de dados dos organismos no contexto de sua distribuição geográfica (Hickerson *et al.*, 2010), a filogeografia tinha a difícil tarefa de conseguir relacionar macro e microevolução. O relacionamento entre essas escalas evolutivas fora pautado com ideia de que processos microevolutivos operando de forma intra-específica podem ser generalizados com a finalidade de explicar diferenças macroevolutivas (Avise *et al.*, 1987). A filogeografia consiste então, em análises filogenéticas/genealógicas contextualizadas geograficamente a fim de testar hipóteses que correlacionem a distribuição das espécies e os fenômenos geológicos que possam ter causado a estruturação populacional e/ou a especiação (Hickerson *et al.*, 2010). Um dos grandes avanços relacionados ao estudo filogeográfico foi a ideia de utilizar o conceito de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs – do inglês Operational Taxonomic Units) para sequências de nucleotídeos (inicialmente sequências mitocondriais). Tratar cada sequência, e conseqüentemente o indivíduo, como OTU permitiu que a filogeografia explorasse a história das linhagens definidas pelos clados dentro das espécies, clados estes que definiriam os limites do que seria uma população (Avise *et al.*, 1987; Hickerson *et al.*, 2010). Outro grande avanço foi representar as relações entre os organismos em rede de haplótipos, e não em uma árvore

filogenética. A rede de haplótipos é uma representação muito mais coerente para tratar evolução em um nível intra-específico, pois consegue retratar melhor o relacionamento filogenético entre os haplótipos, já que não pressupõe que as divergências sejam sempre dicotômicas (Avice *et al.*, 1987; Posada e Crandall 2001)

Os primeiros métodos empregados em filogeografia consistiam em sobrepor dados filogenéticos a mapas contendo informações geográficas procurando por padrões (Avice *et al.*, 1987). Estimativas de fluxo gênico, tempos de divergência ou os padrões geográficos eram obtidos principalmente a partir das estatísticas F (Hickerson *et al.*, 2010). Avice e colaboradores (1987) dividem os padrões filogeográficos em cinco categorias, de acordo com a profundidade das separações genéticas e geográficas. Na categoria I, há um monofiletismo total entre as populações, não havendo fluxo gênico e conseqüentemente não há compartilhamento de haplótipos entre as linhagens das diferentes localidades geográficas. Na categoria II, embora haja grande diferenciação genética, não há uma estruturação geográfica clara. Na categoria III, a diversidade genética é pequena, ou seja, poucas mutações diferenciam as linhagens, porém há uma coerência geográfica da distribuição das mesmas. Tanto na categoria IV, quanto na categoria V, há baixa divergência genética e baixa estruturação geográfica, sendo a última categoria correspondente à panmixia (Avice *et al.*, 1987).

Mesmo com a capacidade de fazer inferências filogeográficas a partir de análises filogenéticas, a filogeografia apresentava algumas limitações. Os métodos filogenéticos são pouco eficazes quando se tem um padrão pertencente às categorias III, IV e V. Isso ocorre pois ao contrário dos padrões encontrados nas duas primeiras categorias, há grande indício de que tenha ocorrido separação recente entre as populações. Sendo assim, as árvores filogenéticas não seriam iguais às árvores de gene, causando graves problemas de interpretação (Edwards; Beerli, 2000). Essas limitações são oriundas, majoritariamente, da origem dos métodos filogenéticos, que foram desenvolvidos a fim de avaliar as relações evolutivas ao nível inter-específico, apresentando dificuldade quando utilizados em uma mesma espécie (Cunha; Solé-Cava, 2012). Além disso, o modelo de evolução adotado pelas análises filogenéticas prevê que a evolução de uma espécie se dá de maneira dicotômica, isto é, uma espécie ancestral origina duas novas espécies no processo evolutivo, o que não retrata a realidade quando se trata de populações, já que um mesmo haplótipo pode dar origem a diversos outros haplótipos por meio de mutações em suas bases (Avice, 2000).

Tendo em vista todos os problemas referentes às primeiras análises filogeográficas, houve então uma necessidade de desenvolvimento de análises mais robustas, que empregassem análises estatísticas, e não fossem apenas sobreposição de árvores e mapas, com hipóteses levantadas *a posteriori*. A teoria da coalescência possibilitou a implementação destas análises, já que possibilita a inferência de eventos passados à uma amostra atual. A teoria permite partir de “n” sequências recentes em direção ao passado, até seu ancestral comum mais recente, e a partir da reconstrução da história genealógica dos indivíduos, gerar e testar hipóteses sobre os eventos evolutivos que ocorreram, assim como eventos biogeográficos e demográficos no passado (Fu; Li, 1999; Pearse; Crandall, 2004). Estes métodos baseados na teoria da coalescência constituem o que se conhece por filogeografia estatística (Cunha; Solé-Cava, 2012).

A filogeografia estatística divide-se em dois grupos: um formado pelas Análises de Clados Hierarquizados (NCA, *Nested Clade Analysis*) que é um tipo de análise exploratória, sendo suas inferências testadas *a posteriori* (Templeton *et al.*, 1995); e outro formado por métodos baseados na teoria da coalescência, que utilizam estratégias bayesianas ou de máxima-verossimilhança, a fim de testar hipóteses evolutivas e demográficas levantadas *a priori* (Knowles; Maddison, 2002; Fagundes *et al.*, 2007). Atualmente a filogeografia tem se tornado cada vez mais integrativa (Avice, 2009). Este campo vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e tem contribuído para uma maior compreensão da biodiversidade, além de fornecer subsídios necessários para sua conservação (Avice *et al.*, 2016).

1.5. Análises em genética de populações e filogeografia

Os avanços tecnológicos, unidos a avanços na geração de dados e nas análises estatísticas proporcionaram uma melhora significativa na utilização dos dados, permitindo inferir muito mais sobre a demografia histórica recente das populações (Beerli; Felsenstein, 1999; Arbogast *et al.*, 2002; Pearse; Crandall, 2004). Um dos temas de grande importância no âmbito da evolução é o estudo da estrutura genética das espécies, e de seus padrões de conectividade e demografia (Waples; Gaggiotti, 2006). Diversas análises foram desenvolvidas a fim de avaliar a estrutura populacional de diversas espécies. Dentre elas, a mais utilizada para dados de haplótipos é a Análise Molecular de Variância (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), que estima os componentes de variância de forma análoga às estatísticas F, utilizando as estatísticas Φ . A AMOVA correlaciona a diversidade haplotípica

de forma hierárquica, particionando a variância molecular em variância intrapopulacional e variância interpopulacional de acordo com a estruturação populacional definida *a priori*. A variância total da análise é subdividida em componentes de covariância que correspondem às diferenças entre os haplótipos de uma mesma população (Φ_{SC}), entre os haplótipos de diferentes regiões (Φ_{CT}) e as diferenças encontradas entre todas as populações (Φ_{ST}) (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier *et al.*, 2005). A AMOVA possui maior poder de detectar diferenciações populacionais recentes quando comparada ao método tradicional baseado no F_{ST} (Pearse; Crandall, 2004).

Existem diversas análises que podem ser utilizadas para investigar eventos demográficos passados. Os testes de neutralidade, como por exemplo o D de Tajima (Tajima, 1989) e o F_s de Fu (Fu, 1997), embora tenham sido criados originalmente para testar se um marcador molecular está evoluindo de forma neutra, isto é, se não está sofrendo seleção, apresentam ótima resposta na detecção de eventos de expansão demográfica. O teste F_s de Fu, baseado na distribuição haplotípica, gera uma estimativa da probabilidade de que se tenha uma dada população com o número de haplótipos igual ou inferior ao observado nos dados, assumindo que todos os haplótipos evoluem de forma neutra. Valores menores que zero sugerem um excesso de haplótipos e conseqüentemente sugerem que a população passou por expansão, ou que o gene “pegou uma carona” genética (*hitchhiking*); já para valores superiores a zero, a sugestão é de que haja uma deficiência de alelos e conseqüentemente a população deve ter sofrido um efeito de retração populacional. Já o teste D de Tajima é calculado como a diferença entre duas medidas de diversidade genética: a média do número de diferenças par a par entre os haplótipos (π) e o número de sítios segregantes (S), onde espera-se que tais medidas de diversidade genética sejam iguais em populações que evoluem de forma neutra e possuem tamanho constante, isto é, a população se encontra em equilíbrio mutação-deriva, consistindo em um valor de D igual a zero. Valores positivos indicam que o número médio de diferenças par a par é maior que o número de sítios segregantes, significando que há poucos haplótipos, porém estes são extremamente diferentes entre si. Tal valor de D sugere que a população tenha sofrido uma contração populacional, como um evento de gargalo (*bottleneck*), ou seleção balanceadora. Quando os valores de D são negativos, os valores de diferenças par a par dos haplótipos são menores que o número de sítios segregantes. Tal interpretação resulta na existência de muitos haplótipos considerados raros, isto é, em baixa frequência, onde estes diferem pouco uns dos outros (por algumas bases apenas). Os haplótipos raros tendem a desaparecer da população por deriva, já que se

encontram em baixa frequência, porém quando a população está em expansão, estes se mantêm (Harpending, 1994). Assim como a possibilidade de expansão, mencionada anteriormente, outras possibilidades podem ser cogitadas com a interpretação de valores de D menores que zero, tais como varredura seletiva (Nielsen, 2005) ou ainda a ocorrência de seleção.

Outra forma de investigar a demografia molecular de uma população é a análise da distribuição das diferenças entre pares de haplótipos (em inglês *Mismatch Distribution Analysis*) (Rogers; Harpending, 1992). A análise da distribuição das diferenças prediz que quando populações possuem tamanho estável, a distribuição das diferenças apresentaria comportamento multimodal, ou seja, com várias modas. Já quando as populações se encontram em um cenário de expansão recente, a distribuição é unimodal (Rogers; Harpending, 1992). Nesta análise é testada a diferença entre a distribuição das diferenças observadas nos dados e aquela esperada sob a hipótese nula de expansão. Se rejeitarmos a hipótese nula de expansão, mas os resultados dos testes de neutralidade F_s de F_u e D de Tajima forem significativos para a hipótese de expansão, tal significância pode ser atribuída a um possível efeito de seleção no gene ou região gênica em estudo.

Além disso, é possível testar a correlação das distâncias genética e geográfica através de um teste de Mantel (Mantel, 1967). O teste verifica a hipótese de isolamento por distância, onde o fluxo gênico entre as populações diminui à medida que estas tornam-se mais distantes umas das outras. Verifica-se a correlação entre duas matrizes, uma de distância genética (valores de F_{ST}), e outra de distância geográfica (distância linear entre os pontos amostrados). As matrizes são aleatorizadas, sendo calculada a correlação entre elas a cada aleatorização. A correlação das duas matrizes é estatisticamente comprovada quando o valor de $p < 0,05$.

Outros métodos estatísticos baseiam-se na modelagem de diversos cenários populacionais através da teoria da coalescência. A maioria destes métodos utiliza abordagens de Máxima-verossimilhança ou Bayesiana. Dentro dos métodos que utilizam abordagem Bayesiana, existem os que inferem a demografia passada de uma espécie. O *Bayesian Skyline Plot* (BSP) utiliza Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar as probabilidades posteriores dos tamanhos populacionais efetivos ao longo do tempo a partir de sequências gênicas utilizando um modelo de substituição especificado *a priori* (Drummond *et al.*, 2005).

1.6. Genética da Conservação

A atividade antrópica é hoje a principal causa das modificações ambientais (Wilson *et al.*, 2016). Essas modificações estão envolvidas diretamente com os eventos de extinção e de redução populacional de determinadas espécies, podendo acarretar em extinções futuras (Frankham *et al.*, 2002). Como tentativa de mitigar os efeitos decorrentes das ações antrópicas diversos estudos foram realizados, dentro da área intitulada como Biologia da Conservação. É uma ciência interdisciplinar que une conceitos de ecologia, biologia de populações e genética, gerando subsídios para conservação e manejo adequado (Primack; Rodrigues, 2006). Como ramificação da Biologia da Conservação, a Genética da Conservação tem se mostrado uma ferramenta indispensável para estudos que visam a manutenção de espécies a longo prazo (Perez-Sweeney *et al.*, 2003)

A genética da conservação tem como principal objetivo entender a importância da variabilidade genética na manutenção a longo prazo das populações naturais (Awise, 2009). Torna-se extremamente importante avaliar não somente a diversidade genética de determinada espécie, mas verificar como esta diversidade está distribuída geograficamente. Tais informações podem auxiliar na conservação das espécies, e em políticas para determinar de qual forma e onde devem ser instaladas áreas para conservação e manejo de determinado táxon (Moritz; Faith, 1998; Laikre, 2010).

A diversidade genética pode ser definida como qualquer magnitude de variabilidade genética a nível populacional (Hughes *et al.*, 2008). Ela é a base de toda a diversidade biológica, e a persistência de uma determinada espécie depende da diversidade genética existente dentro e entre suas populações (Laikre *et al.*, 2010). A variabilidade genética é importante pois permite que as populações se adaptem a um ambiente mutante, ou seja, em constante transformação, atribuindo valor adaptativo/evolutivo a espécie (Frankham, 2005). A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN – *International Union for Conservation of Nature*) reconhece a diversidade genética como um dos três níveis de biodiversidade que requerem conservação (McNeely *et al.*, 1999).

Quando a variabilidade genética é reduzida e o meio ambiente sofre alterações, as espécies apresentam maior vulnerabilidade a eventos de extinção (Frankel, 1970, 1974; Primack; Rodrigues, 2006). Populações locais de pequeno tamanho populacional possuem alto risco de extinção, pois apresentam alta propensão a endogamia e a perda da diversidade genética por eventos estocásticos (deriva gênica). O mesmo acontece para populações isoladas, que tendem a apresentar baixa variabilidade genética (erodida pela forte deriva

gênica, já que seus tamanhos populacionais são pequenos), e a persistência a longo-prazo dessas populações depende da manutenção da sua variabilidade, promovida pelo fluxo gênico (Awise, 2004).

Apesar do aumento do número de trabalhos de Genética da Conservação nos últimos anos, ainda há grande negligência de sua aplicação direta em políticas internacionais voltadas para conservação (Laikre, 2010). Torna-se necessário que se intensifique o uso de dados genéticos a fim de servir como subsídio para implementação de melhores estratégias para conservação e manejo, assim como entender os efeitos da perda de variabilidade genética para sobrevivência de organismos a longo prazo (Frankham, 2005; Vernesi et al., 2008).

1.7.O rato de espinho *Trinomys dimidiatus*

A família Echimyidae, constituída pelos roedores de espinho neotropicais, é a família mais diversa morfologicamente entre os roedores atuais (Leite e Patton, 2002). Nesta família, o gênero *Trinomys* é um dos grupos de histicognatos mais diversificados e complexos do leste do Brasil, e contém 10 espécies reconhecidas até o presente momento (Pessoa *et al.*, 2015). Diversos trabalhos utilizando dados moleculares têm sido publicados. Voloch e colaboradores (2013) estudaram as relações filogenéticas dos histicognatos. Outros estudos verificaram as relações evolutivas dentro da família Echimyidae (Lara *et al.*, 1996; Leite e Patton, 2002; Galewski *et al.*, 2005); e dentro do gênero *Trinomys* (Lara e Patton, 2000; Tavares *et al.*, 2016). Lara e Patton (2000) utilizaram o marcador mitocondrial do gene de citocromo b a fim de avaliar a diversidade genética intra e interespecífica dentro do gênero *Trinomys*, e para entender como os clados recuperados pelas análises filogenéticas estavam distribuídos geograficamente. Além de estudos voltados para identificar as relações evolutivas, existem aqueles que visam descrever os cariótipos e suas variações. Os estudos citogenéticos têm sido realizados tanto dentro da família (Gardner; Emmons 1984; Leal-Mesquita *et al.* 1992) como com espécies congêneres, como por exemplo, *Trinomys moojeni* e *Trinomys setosus elegans* (Corrêa *et al.*, 2005) e *Trinomys paratus* (Lazar *et al.*, 2017). Entretanto, pouquíssimos estudos vêm sendo realizados visando entender aspectos da distribuição geográfica e/ou da estruturação populacional de cada uma das espécies do gênero, como por exemplo o estudo realizado por Agrizzi (2013). O estudo identificou e comparou a estruturação geográfica de acordo com a diversidade genética encontrada nas populações de três espécies do gênero *Trinomys* na região Central da Mata Atlântica – *T. paratus*, *T. panama* e *T. setosus*.

Trinomys dimidiatus (Günther, 1876) é uma espécie de roedor pertencente à família Echimyidae, cuja localidade tipo considerada inicialmente era sudoeste do Rio de Janeiro (Moojen, 1948). Porém, os espécimes de *T. dimidiatus* que justificavam a atribuição da localidade tipo – provenientes da localidade de Itatiaia e classificados por Thomas (1921) como *T. dimidiatus* - posteriormente foram identificados como pertencentes às espécies *T. panema* e *T. graciosus* (Iack-Ximenes, 2005). Em consequência, Pêsoa e colaboradores (2015) fixaram a localidade tipo da espécie para o Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, por estar na região central de distribuição da espécie, e por ser a única espécie representativa do gênero presente nesta localidade. A espécie apresenta hábitos noturnos, usando troncos caídos e ocos e buracos no chão como abrigos durante o dia. Eles são animais solitários, terrestres, com uma dieta baseada em sementes, frutos, fungos, algumas folhas e insetos (Emmons; Fer, 1997). A espécie ocorre na Mata Atlântica e sua distribuição vai desde o Estado do Rio de Janeiro até a costa norte de São Paulo (Attias *et al.*, 2009). Com distribuição restrita a Mata Atlântica, a espécie está totalmente suscetível a áreas fragmentadas, já que o bioma é caracterizado por existir como pequenos fragmentos (Ribeiro *et al.*, 2009).

Os pequenos mamíferos, em geral, possuem papel fundamental para o ecossistema. Têm grande importância nas cadeias tróficas, apresentando dieta muito diversificada, podendo se alimentar desde sementes a pequenos vertebrados (Cáceres; Monteiro-Filho, 2001; Vieira *et al.*, 2006; Pinotti *et al.*, 2011). Também atuam como agentes dispersores de diversas espécies (Vieira *et al.*, 2006; Cáceres; Monteiro-Filho, 2007; Horn *et al.*, 2008). Portanto, entender a estruturação populacional de roedores silvestres, decisivos para o funcionamento de um ecossistema, torna-se uma informação vital nesse cenário (Gaines *et al.*, 1997). Neste contexto, o presente projeto busca investigar a estruturação populacional de *T. dimidiatus* entre localidades de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Investigar a estruturação populacional e a filogeografia de *Trinomys dimidiatus* utilizando sequências mitocondriais de indivíduos coletados em diversas áreas fragmentadas de Mata Atlântica, no Estado do Rio de Janeiro.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a existência de diferenciação populacional entre os diferentes pontos de coleta amostrados no Rio de Janeiro.
- Identificar as possíveis barreiras ao fluxo gênico na espécie.
- Testar a possível correlação entre as distâncias genéticas e geográficas.
- Detectar sinais de expansão repentina e tendência demográfica histórica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pontos de coleta

Foram coletados para o presente trabalho indivíduos de *T. dimidiatus* provenientes de quatro localidades na região de Mata Atlântica, em quatro municípios do Estado do Rio de Janeiro: Guapimirim (N=21), Teresópolis (21), Paraty (20) e Rio Claro (11) (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1: Localidades do presente estudo com seus respectivos tamanhos amostrais.

Pontos de coleta	Município	N
Parque Nacional Serra dos Órgãos, Garrafão (GARRAFÃO)	Guapimirim	21
Parque Nacional Serra dos Órgãos, Rancho Frio (RANCHO FRIO)	Teresópolis	21
Pequena Central Hidroelétrica (PCH) Rio do Braço, Lídice (PCHB)	Rio Claro	11
Parque Nacional Serra da Bocaina (BOCAINA)	Paraty	20
TOTAL		73

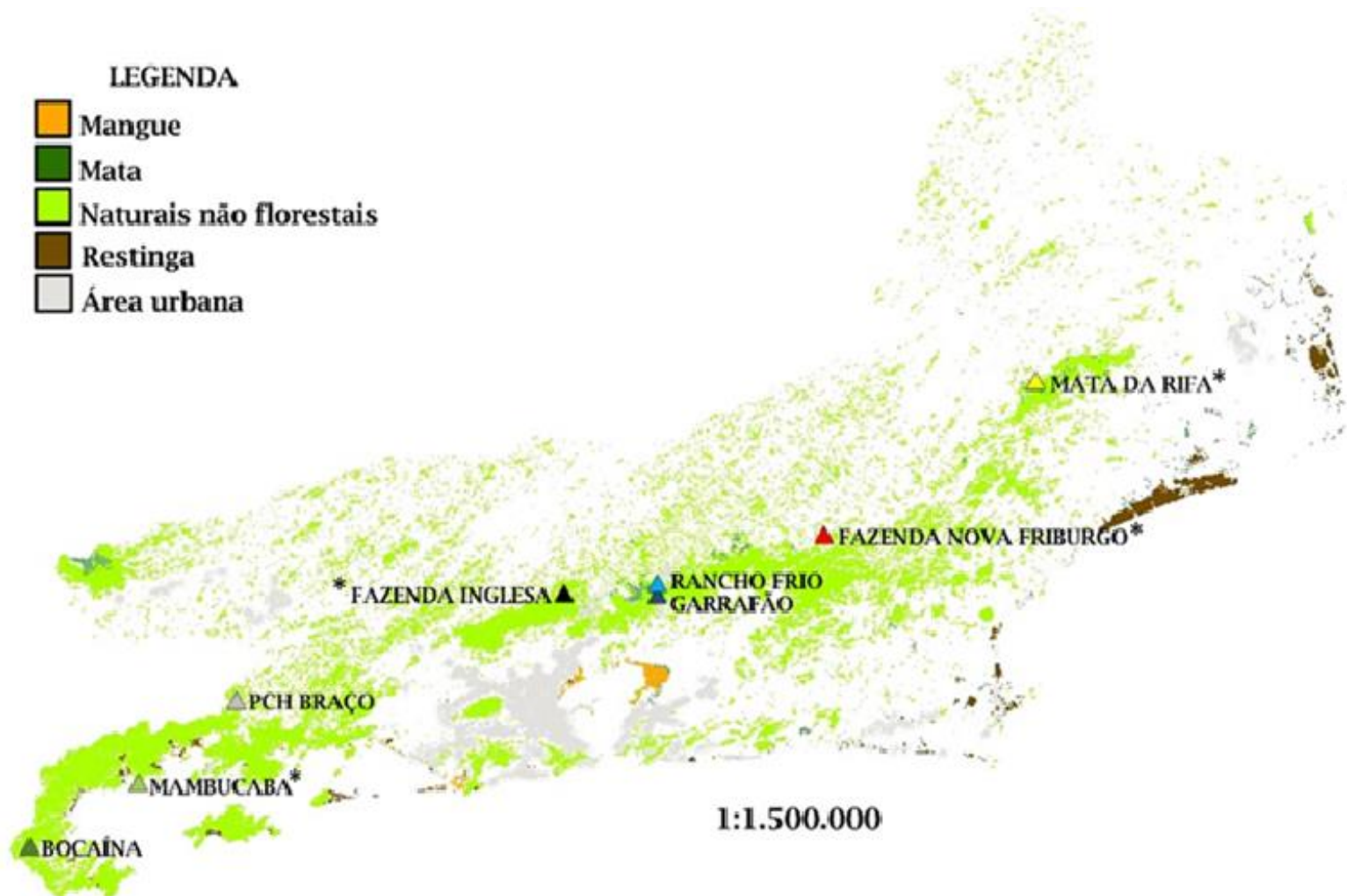


Figura 1: Mapa de remanescentes da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica, 2017) contendo as localidades utilizadas no presente estudo.
 * Localidades contendo espécimes de *T. dimidiatus* provenientes do Genbank.

Os dois pontos de coleta localizados nos municípios de Guapimirim e Teresópolis (Garrafão e Rancho Frio respectivamente) pertencem ao Parque Nacional Serra dos Órgãos (PARNASO; 22° 23' S e 43° 10' W). O Parque abrange os municípios de Guapimirim, Teresópolis, Petrópolis e Magé, com altitudes que variam de 300 a 2260 metros (Castro, 2008). A localidade Garrafão (22° 28' S, 42° 59' W), fica próxima ao km 94 da BR 116 (Rio-Teresópolis), situada nos arredores do Rio Iconha. Corresponde à formação da Floresta Pluvial Atlântica de Altitude (Rizzini, 1979). Apesar de ser uma área preservada, a floresta é caracterizada como mata perturbada, sendo recortada por estradas de terra, casas de veraneio e cercada pela encosta dos morros. A fisionomia da vegetação é caracterizada por apresentar estágio sucessional secundário e maduro (Macedo *et al.*, 2007). Apresenta cobertura vegetal fechada, com um dossel de aproximadamente 10 metros de altura, com presença de sub-bosques. A topografia é extremamente irregular, com inclinação variando de suave a íngreme. O solo pé argiloso, apresentando muita matéria orgânica e afloramentos rochosos. O clima é caracterizado como mesodérmico-úmido-temperado (Nimer, 1989). A temperatura média é de 17,8°C, sendo as mínimas e máximas absolutas de -0,8°C e 34°C respectivamente (Gentile, 2000), e sua altitude nos pontos de coleta varia de 522 a 748 metros.

A outra localidade pertencente ao parque Nacional da Serra dos Órgãos, o Rancho Frio (22°27'S, 43°00' W), pertencente ao município de Teresópolis, com altitudes que variam de 1000 a 1200m é caracterizada por vegetação ombrófila densa montana. Esta área está situada entre os rios Rancho Frio e Paquequer, abrigando uma floresta secundária em estágio avançado de sucessão, sendo mais preservada quando comparada à localidade do Garrafão (Finotti *et al.*, 2012).

O Parque Nacional da Serra da Bocaina abrange os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Considerada uma das grandes áreas remanescentes da Mata Atlântica primária (Delciellos *et al.*, 2012) apresenta um tamanho de aproximadamente 104.00 ha (IBAMA, 2001), e está conectada a outras áreas de proteção do bioma, como por exemplo o Parque Estadual da Serra do Mar, a Estação Ecológica de Tamoios, a Baía de Paraty, o Paraty-Mirim e as Áreas de Proteção Ambiental do Saco do Mamanguá, a Reserva Ecológica de Juatinga e a Área de Proteção Ambiental de Cairuçu. (Lino; Albuquerque 2007). O clima é caracterizado como temperado super-úmido e apresenta uma alta variação altitudinal (do nível do mar a 2088 metros). O parque é cortado pela rodovia estadual RJ-165, ligando os municípios de Paraty-RJ a Cunha-SP. O local de amostragem no Rio de Janeiro (23°11' S, 44°50' W), é

localizado ao longo da rodovia, no município de Paraty, e é caracterizado por uma floresta perene, com altitudes variando de 731 a 1193 metros (Delciellos *et al.*, 2012).

A Pequena Central Hidroelétrica do Rio do Braço (PCHB), está situada entre os municípios de Bananal e Rio Claro. É uma área considerada de preservação permanente. Apresenta aproximadamente 108ha com dominância de Mata Atlântica de encosta, apresentando ainda três outras fitofisionomias (mata ciliar, matas em estado secundário – capoeira - e pasto) com diferentes graus de preservação. O remanescente (44°14'22"W, 22°47'30"S) encontra-se isolado, com média de 1km de distância para outros remanescentes mais próximos. A região apresenta elevadas temperaturas e alta umidade, o que assegura chuva durante o ano todo. O clima é caracterizado por verões quentes, com uma estação seca bem definida no inverno. A temperatura média anual varia de 19,5° a 21,8°C, com temperaturas mínimas de 18°C e máximas que ultrapassam os 22°C, para os meses mais frio e mais quente respectivamente (HABTEC, 2004).

3.2.Obtenção de amostras

As amostras biológicas das localidades pertencentes ao Parque Nacional Serra dos Órgãos (localidades de Garrafão e Rancho Frio) foram coletadas a partir de biopsia de orelha dos animais durante procedimento de captura-marcação-recaptura. Nestas duas localidades existe monitoramento de longo prazo de populações de pequenos mamíferos, desde 1997 no Garrafão, e desde 2012 no Rancho Frio. Nas localidades presentes nos municípios de Paraty e Rio Claro (Bocaina e PCH Braço, respectivamente), as amostras foram obtidas por coleta de fígado durante necropsia, uma vez que os animais capturados foram eutanaziados como parte dos objetivos de projetos realizados nestas localidades. As coletas foram realizadas de junho de 2013 a novembro de 2015 na localidade da Bocaina, e de maio de 2009 a dezembro de 2015 em PCH Braço. Após a coleta de material biológico, o mesmo foi preservado em álcool absoluto. A fim de minimizar o viés temporal, só foram utilizadas amostras coletadas entre 2009 e 2016.

Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas pela equipe do Laboratório de Vertebrados/UFRJ, que providenciou as alíquotas. Além disso, sequências extraídas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), provenientes de quatro localidades, foram utilizadas para a construção da rede de haplótipos (Tabela 2) e para realizar as análises de diversidade molecular das sequências.

Tabela 2: Sequências de citocromo b de espécimes de *T. dimidiatus* obtidas no GenBank, com seus respectivos números de acesso, localidade e município

Acesso GenBank	Localidade	Município
U35170	Fazenda Nova Friburgo	Nova Friburgo
U35168	Mata da Rifa, Parque Estadual do Desengano (PED)	Santa Maria Madalena
U35169	Mambucaba	Angra dos Reis
U35170	Fazenda Inglesa	Petrópolis

3.3.Extração de ADN, amplificação e sequenciamento

A extração de ADN dos tecidos dos 80 espécimes obtidos no presente trabalho foi realizada seguindo protocolo de extração salina (Aljanabi; Martinez, 1997), adaptado. O tecido fresco contendo aproximadamente 20 mg foi macerado em 290 μ L de tampão de lise (30 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; SDS 1%) com 10 μ L de proteinase K e incubado a 55°C em banho-maria com agitação, em um período de 16 horas (*overnight*) para a digestão completa do tecido.

Após o período estabelecido para digestão, foram adicionados 100 μ L de uma solução de NaCl a 5M e inverteu-se o tubo de microcentrífuga vagarosamente a fim de misturar o material. Após, o extrato foi centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos à temperatura ambiente, e 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Adicionou-se ao sobrenadante 600 μ L de etanol absoluto gelado e o extrato foi armazenado no congelador a uma temperatura de -20°C por 1 hora para acentuar a precipitação de ADN.

Após o período no congelador, o extrato foi centrifugado a 14.000 RPM por cinco minutos para completa precipitação do ADN. Depois, para efetuar a lavagem do material a fim de retirar o excesso de sal presente no extrato, o sobrenadante foi descartado e ao “*pellet*” foram adicionados 200 μ L de etanol 70%, e o material foi centrifugado a 13.000 RPM por cinco minutos. Posteriormente, o álcool foi retirado e o ADN foi ressuspense em 50 μ L de água ultrapura.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, corado com o corante Safer (Kasvi) e visualizado sob luz azul, a fim de confirmar o sucesso da extração, e para quantificar a concentração de ADN, utilizando o marcador de peso molecular

Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Fermentas Life Sciences). Posteriormente à quantificação, todas as amostras foram normalizadas para uma concentração de 20ng/ µL. As alíquotas de ADN foram armazenadas em congelador a uma temperatura de -20°C

Os fragmentos alvo deste trabalho foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction – PCR*). A amplificação do gene cit b foi realizada para os 80 espécimes do presente estudo, utilizando um par de iniciadores universais das regiões flanqueadoras MVZ05 e MVZ16 (Tabela 3), cuja temperatura de anelamento é de 48°C (Agrizzi, 2013). Esses iniciadores possibilitam a amplificação parcial do gene, totalizando 803 pb.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parciais do gene do Citocromo b (803pb).

Nome	Sequência	Biblioteca de referência
MVZ05	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	da Silva e Patton, 1993
MVZ16	5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'	da Silva e Patton, 1993

R = purina (A/G)

Y= pirimidina (C/T)

Para cada reação de PCR com volume final de 20 µL foram adicionados: tampão 10X; MgCl₂ (2mM); solução de dNTP (1mM por nucleotídeo); primers forward e reverso (0,5µM cada); 2,5 U de Taq Platinum (Invitrogen Corporation); e 20ng/ µL de DNA. As reações foram efetuadas em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems), seguindo as seguintes condições: um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos; seguido de 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45 segundos na temperatura de anelamento específica para o gene cit b (48°C), 72°C por 1 minuto e 15 segundos; e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Em todos os lotes de amostras amplificadas foram incluídos controles negativos

Os produtos de PCR foram visualizados através de uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 1X, corado com o corante Safer® (Kasvi) e visualizados sob luz azul, a fim de confirmar o sucesso da amplificação, o tamanho dos fragmentos de ADN e a ausência de contaminação., utilizando o marcador de peso molecular Generuler 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Após a confirmação, as amostras foram purificadas com a enzima ExoSAP (GE Healthcare Life Sciences), incubadas a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos, esta última etapa sendo para desnaturação e consequente inativação da enzima.

As sequências foram obtidas pelo método descrito por Sanger e colaboradores (1977), onde são realizadas reações de amplificação por terminação de cadeia usando dideoxynucleotídeos. Nas reações de pré-sequenciamento foram utilizados os mesmos iniciadores das reações de PCR (MVZ05 e MVZ16). Foram efetuadas duas reações de pré-sequenciamento para cada amostra (uma para o iniciador *forward* e outra para o iniciador *reverse*), usando-se 3,2pmol/ μL de iniciador, 3,5 μL de produto de PCR purificado, 1 μL de *BigDye* e 1,5 μL de tampão do kit (*ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems), completando com água purificada pelo sistema Milli-Q (modelo Direct-Q™, Millipore) até completar 10 μL por reação. A seguinte ciclagem foi utilizada no termociclador Veriti® (Applied Biosystems): 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, repetindo-se este ciclo por 40 vezes.

Após a reação de pré-sequenciamento, os produtos foram precipitados com utilização de colunas com resina do tipo Sephadex®, pertencentes ao kit de purificação de colunas Amersham (GE Healthcare). Após uso das colunas do kit, as resinas eram descartadas, o filtro retentor lavado e reutilizado, inserindo-se nova resina na coluna, como descrito no Anexo I. Após precipitação, as amostras foram ressuspensas em 12 μL de formamida Hi-Di. As sequências foram obtidas em sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies) no Laboratório de Diagnóstico por DNA/UERJ.

3.4. Alinhamento das sequências

As sequências foram editadas manualmente com o programa Geneious 4.8.2 (Biomatters) e os *contigs* foram montados a partir da junção das duas sequências obtidas através dos diferentes iniciadores, *forward* e *reverse*. Após edição, as sequências contendo 803pb foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

3.5. Análises populacionais e de demografia histórica

A diversidade molecular das sequências, descrita como o número de sítios polimórficos (S), o número de haplótipos observados (K) e os índices de diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π) e seus respectivos desvios (SD) foi estimada no programa DnaSP 5.1 (Librado e Rosas, 2009), que também foi usado para identificar os haplótipos, definir os espécimes pertencentes a cada uma das localidades e para criar os arquivos de leitura necessários para execução dos programas Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier; Lischer, 2010) e

Network 5.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>). A divergência média total (distância p), foi estimada no programa Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

A distribuição geográfica dos haplótipos foi investigada a partir de uma rede *median-joining* (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999) construída usando o programa Network 5.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>). A partir da interpretação da rede MJ foram definidas as linhagens filogeográficas de *T. dimidiatus*.

Os valores dos índices de fixação F_{ST} e Φ_{ST} par-a-par (Wright, 1978; Excoffier *et al.*, 1992) foram estimados no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier; Lischer, 2010), tendo sua significância testada usando 10.000 permutações. Após a estimativa dos índices de fixação, os valores de significância dos mesmos foram submetidos a um ajuste sequencial de Bonferroni, a fim de determinar o nível de significância apropriado para todas essas comparações simultâneas (Rice, 1989). A existência de diferenciação entre as localidades também foi testada usando uma Análise Molecular de Variância (AMOVA – *Analysis of Molecular Variance*) no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer, 2010).

A fim de verificar a existência de correlação entre a distância genética e a distância geográfica foi empregado um teste de Mantel (Mantel, 1967), utilizando o programa Isolation By Distance Web Service 3.23 (Jensen *et al.*, 2005). O teste de Mantel foi realizado pela comparação de duas matrizes de distância: genética, adotando $F_{ST}/(1-F_{ST})$, e geográfica (distância linear em Km), tendo sua significância testada utilizando 10.000 permutações. A escolha pela utilização da matriz $F_{ST}/(1-F_{ST})$ é a mais apropriada para este tipo de correlação (Rousset, 1997), visto que os valores para distância geográfica possuem uma larga faixa de variação e os valores de F_{ST} variam de zero a um, sendo necessário este tipo de normalização para que tais valores de distância genética tendam ao infinito. As distâncias geográficas entre as localidades foram mensuradas linearmente no aplicativo Google Earth.

Os testes de neutralidade F_s de Fu (Fu, 1997) e D de Tajima (Tajima, 1989) foram realizados no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier; Lischer, 2010) baseados nas populações delimitadas pelos resultados dos índices de fixação (F_{ST} e Φ_{ST} par-a-par). Tais testes visam detectar a ocorrência de desvios em relação a hipótese nula de neutralidade das sequências, isto é, se a região alvo do genoma a ser analisada está evoluindo de forma neutra, ou se está sob efeito de seleção. Entretanto outras interpretações podem ser adotadas, como a verificação de ocorrência de expansão ou retração populacional (*bottleneck*), ou ainda se a população se encontra em equilíbrio mutação-deriva (Fu e Li, 1993; Tajima, 1996; Nielsen, 2001). No

presente estudo os testes de neutralidade foram utilizados a fim de verificar a ocorrência dos eventos demográficos citados anteriormente.

A demografia molecular de cada uma das populações foi investigada por meio de uma análise da distribuição das diferenças entre pares de haplótipos (*Mismatch Distribution Analysis*) (Rogers; Harpending, 1992). A análise da distribuição das diferenças, assim como a estimativa dos seus parâmetros sob os cenários de expansão demográfica (Schneider; Excoffier, 1999) e expansão espacial (Excoffier, 2004), foram realizadas no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier; Lischer, 2010).

A tendência demográfica histórica de cada população foi investigada a partir da construção de *Bayesian Skyline Plots* (BSP) (Drummond *et al.*, 2005) feita no programa Beast 1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) através da plataforma CIPRES (http://www.phylo.org/sub_sections/portal). As reconstruções coalescentes usaram um relógio molecular estrito com a taxa de mutação estimada para roedores murídeos de 1.7% My (Smith; Patton, 1993). Para realização desta análise, foi escolhido o modelo evolutivo mais apropriado no programa JModeltest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) estimado através do critério de Akaike (AIC). O modelo evolutivo considerado mais apropriado para o *set* de dados foi o HKY, apresentando um maior valor de AIC. O número de intervalos agrupados (m) foi definido para cinco. O BSP foi realizado para cada uma das populações encontradas utilizando 30.000.000 de passos de MCMC, excluindo 10% das rodadas iniciais (*burnin* = 3.000.000), para alcançar valores de ESS (*Effective Sampling Size*) >200 para todos os parâmetros.

4. RESULTADOS

4.1. Diversidade molecular

Foram obtidas 73 sequências provenientes de quatro localidades. Esse fragmento corresponde aos primeiros 803 nucleotídeos do gene de citocromo b completo da espécie *T. dimidiatus* (vide sequências obtidas no GenBank, constantes na Tabela 2).

A partir das 77 sequências analisadas de *T. dimidiatus* (73 do presente estudo e quatro oriundas do GenBank) foram identificados 17 haplótipos do gene do citocromo b, com 65 sítios polimórficos (de um total de 803pb), dos quais 42 sítios são informativos para parcimônia e 23 sítios são *singletons*. Todos os haplótipos, assim como o número de vezes que os mesmos foram encontrados, estão evidenciados na Tabela 4.

Tabela 4: Número de indivíduos por haplótipo em cada localidade. Localidades: Garrafão (GAR), Rancho Frio (RF), Bocaina (BOCA), PCH Braço (PCHB); Pontos de coleta das sequências provenientes do GenBank: Mambucaba (MAMBU), Fazenda Inglesa (PET), Mata da Rifa (MR), Fazenda Nova Friburgo (NF).

Haplótipos	Total	GAR	RF	BOCA	PCHB	MAMBU	PET	MR	NF
H1	1						1		
H2	16			15		1			
H3	1							1	
H4	1								1
H5	26	10	16						
H6	3		3						
H7	1		1						
H8	1		1						
H9	6				6				
H10	2				2				
H11	1				1				
H12	1				1				
H13	1				1				
H14	7	7							
H15	3	3							
H16	1	1							
H17	5			5					
TOTAL DE HAPLÓTIPOS		4	4	2	5	1	1	1	1

A diversidade nucleotídica (π) total foi de 0,00944 ($dp=0,00144$), e a haplotípica (h) foi de 0,830 ($dp=0,030$). Os resultados estão representados na Tabela 5. As quatro localidades relacionadas às sequências obtidas no GenBank (Tabela 2) não obtiveram resultados individuais sobre sua diversidade molecular, visto que tais localidades possuíam um único espécime representando-as. A diversidade média total (distância p) foi de 0,009. A rede de haplótipos dos 77 espécimes de *T. dimidiatus* está demonstrada na Figura 2.

Tabela 5: Número de espécimes (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos observados (K), diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π) e desvio padrão (SD).

Localidade	N	S	K	$h(SD)$	$\pi(SD)$
GARRAÇÃO	21	5	4	0,671 (0,066)	0,00272 (0,00032)
RANCHO FRIO	21	3	4	0,414 (0,124)	0,00113 (0,00038)
PCH BRAÇO	11	11	5	0,709 (0,137)	0,00394 (0,00105)
BOCAINA	20	1	2	0,395 (0,101)	0,00049 (0,00013)
MAMBUCABA	1	*	*	*	*
FAZENDA NOVA FRIBURGO	1	*	*	*	*
FAZENDA INGLESIA	1	*	*	*	*
MATA DA RIFA	1	*	*	*	*
Total	77	65	17	0,83 (0,030)	0,00944 (0,00144)

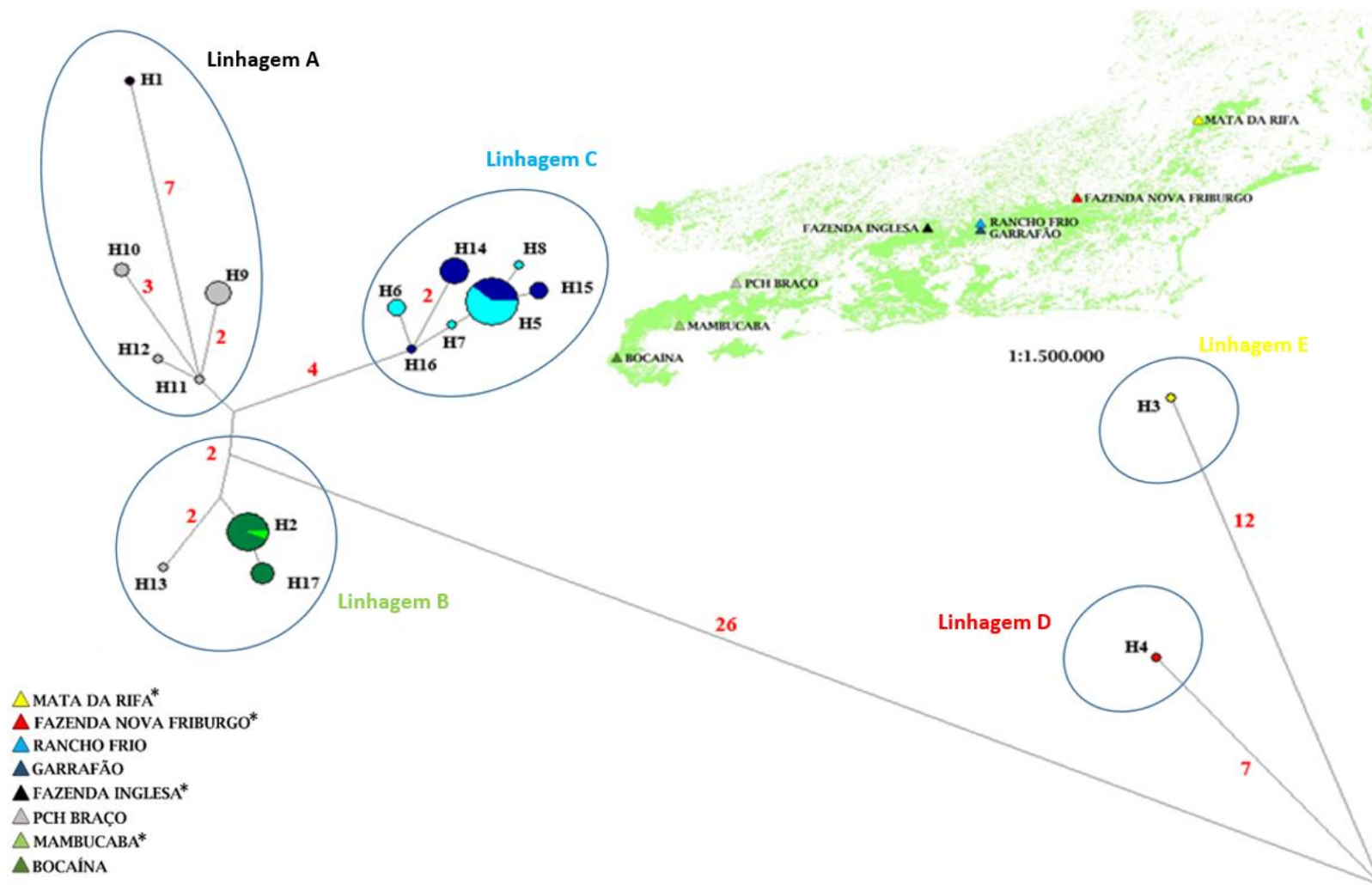


Figura 2: Rede de haplótipos com as linhagens identificadas. Cada círculo representa um haplótipo diferente. Diferentes cores representam diferentes localidades. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os números em vermelho mostram o número de passos mutacionais entre dois haplótipos.

* Localidades cujos espécimes de *T. dimidiatus* são provenientes do Genbank.

Cinco linhagens filogeográficas distintas são evidentes através da interpretação da rede, sendo representadas da seguinte maneira:

- Linhagem A: quatro haplótipos exclusivos da localidade PCHB (H9, H10, H11 e H12) e um haplótipo exclusivo da localidade Petrópolis (H1), totalizando 11 indivíduos.
- Linhagem B: um haplótipo exclusivo da localidade PCHB (H13), um haplótipos exclusivo da localidade Bocaina (H17), e um haplótipo compartilhado entre duas localidades, Bocaina e Mambucaba (H2), totalizando 22 indivíduos
- Linhagem C: três haplótipos exclusivos da localidade Rancho Frio (H6, H7 e H8), três haplótipos exclusivo da localidade Garrafão (H14, H15 e H16), e um haplótipo compartilhado entre as duas localidades (H5), Garrafão e Rancho Frio, totalizando 45 indivíduos.
- Linhagem D: um haplótipo exclusivo da localidade Nova Friburgo (H4), totalizando um indivíduo.
- Linhagem E: um haplótipos exclusivo da localidade Mata da Rifa (PED) (H3), totalizando um indivíduo.

As linhagens observadas apresentam alta concordância geográfica, assim como profundidade filogeográfica elevada, o que as classifica na categoria I (Avice, 1987). Todos os haplótipos, assim como o número de vezes que os mesmos foram encontrados, estão evidenciados nas Figura 2 e Tabela 4. Os haplótipos exclusivos das localidades Nova Friburgo e PED foram os haplótipos que apresentaram maior divergência genética quando comparados aos demais.

4.2.Estruturação populacional

Para as análises de estruturação populacional foram considerados apenas os espécimes coletados no presente estudo, excluindo as sequências provenientes do GenBank utilizadas anteriormente, totalizando, portanto, quatro localidades (Rancho Frio, Garrafão, PCHB e Bocaina)

O grau de diferenciação genética foi avaliado pelas estimativas de F_{ST} e Φ_{ST} par a par entre todas as localidades, mesmo quando distantes poucos quilômetros entre si, como é o caso das localidades de Rancho Frio e Garrafão. Os valores de F_{ST} foram significativos para todas as comparações entre as localidades, assim como os valores de Φ_{ST} (Tabelas 6 e 7 respectivamente).

Tabela 6: Valores de F_{ST} nas comparações par a par entre todas as localidades. Os valores em negrito foram significativos após correção de Bonferroni sequencial. Valores de p estão representados entre parênteses

	Rancho Frio	Garrafão	PCHB
Rancho Frio	*		
Garrafão	0,148 (0,015)	*	
PCHB	0,464 (0,001)	0,312 (0,001)	*
Bocaina	0,595 (0,001)	0,465 (0,001)	0,474 (0,001)

Tabela 7: Valores de Φ_{ST} nas comparações par a par entre todas as localidades. Os valores em negrito foram significativos após correção de Bonferroni sequencial. Valores de p estão representados entre parênteses

	Rancho Frio	Garrafão	PCHB
Rancho Frio	*		
Garrafão	0,162 (0,005)	*	
PCHB	0,805 (0,001)	0,718 (0,001)	*
Bocaina	0,927 (0,001)	0,859 (0,001)	0,755 (0,001)

Os maiores valores de F_{ST} e Φ_{ST} encontrados foram de 0,59533 ($p=0,001$) e 0,927 ($p=0,001$) respectivamente, ambos na comparação entre Rancho Frio e Bocaina. Mas, em geral, os valores de F_{ST} e Φ_{ST} encontrados foram elevados. Sendo assim, de acordo com os critérios elencados por Wright (1978) - onde os valores de divergência genética são classificados como: baixo (entre 0,00 e 0,05); moderada (entre 0,05 e 0,15); alta (entre 0,15 e 0,25); e muito alta (maior que 0,25) - a maioria dos valores encontrados sugerem uma estruturação muito alta entre as localidades do presente estudo, exceto nas comparações entre as localidades Rancho Frio e Garrafão, que apresentaram valores de estruturação considerados moderado e alto para F_{ST} e Φ_{ST} respectivamente.

Os resultados apresentados indicam uma alta estruturação na espécie, com quatro populações geneticamente diferenciadas. Observa-se também um aumento gradativo das distâncias genéticas à medida em que se aumenta a distância geográfica entre as localidades, exceto entre as localidades Bocaina e PCHB. Tal relação poderia ser explicada por um cenário de isolamento por distância, cuja hipótese foi testada através de um teste de Mantel (Mantel,

1967). O teste de Mantel apresentou resultado significativo para hipótese de correlação entre as distâncias genética e geográfica, com valor de $r=0,9090$ ($p=0,0423$) (Figura 3).

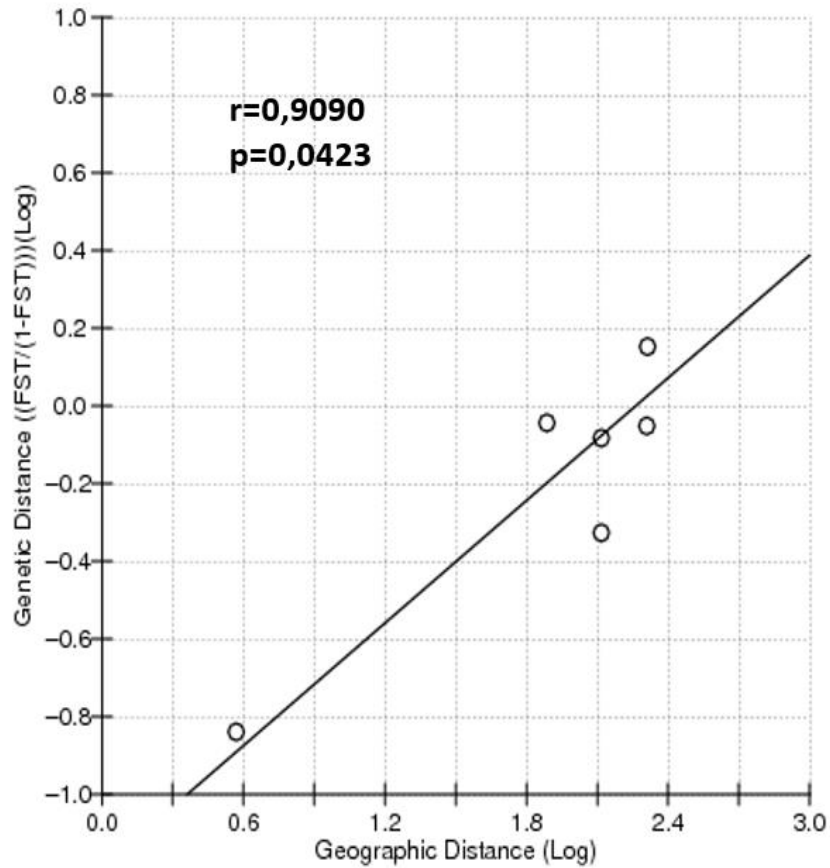


Figura 3: Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas (Teste de Mantel).

A fim de testar o número de populações usando agrupamentos geograficamente condizentes foi realizada uma análise molecular de variância (AMOVA) com grupos definidos *a priori* (Tabela 8).

Tabela 8: Análise Molecular de Variância (AMOVA) testando alguns cenários de estruturação definidos *a priori*. As populações com a mesma cor pertencem a um mesmo agrupamento testado em cenário com duas e três populações (k=2 e 3, respectivamente).

				%	Φ_{CT}	p	%	Φ_{SC}	p	%	Φ_{ST}	p	
k=2	Garrafão	Rancho Frio	BOCA	PCHB	63,08	0,63081	0,0001	20,66	0,5596	0,0001	16,26	0,83741	0,33
k=3	Garrafão	Rancho Frio	BOCA	PCHB	22,64	0,22643	0,0001	57,24	0,7399	0,0001	20,12	0,7988	0,33
k=3	Garrafão	Rancho Frio	BOCA	PCHB	79,54	0,79538	0,0001	3,51	0,17137	0,012	16,96	0,83045	0,0001

Essas análises revelaram que o agrupamento com maior valor de Φ_{CT} significativo (e valor de Φ_{SC} não negativo) foi obtido quando particionamos as amostras em três grupos: PCHB, Bocaina e por fim, Rancho Frio e Garrafão (Tabela 7). Os grupos que obtiveram valores de Φ_{SC} menores que zero foram desconsiderados, por apresentarem valores de Φ_{CT} artificialmente inflados (Dupanloup *et al.*, 2002).

4.3. Demografia histórica

Os testes de neutralidade e expansão populacional calculados com base nas quatro populações encontradas pelos resultados de estruturação populacional não apresentaram resultado significativo ($p > 0,05$ e $p > 0,02$ para D de Tajima e F_s de Fu respectivamente), impossibilitando a interpretação dos dados a fim de evidenciar eventos demográficos existentes. Os resultados estão representados na Tabela 9.

Tabela 9: Testes de neutralidade com 10000 réplicas para as quatro populações encontradas. Valores de P não significativos: D de Tajima ($p > 0,05$); F_s de Fu ($p > 0,02$).

Linhagens	D de Tajima	p	F_s de Fu	p
Rancho Frio	0,22337	0,6485	-0,18747	0,4045
PCHB	-0,67823	0,2722	0,68924	0,6498
Garrafão	1,71595	0,9618	2,14349	0,8688
BOCA	0,72261	0,8490	0,97606	0,5496

As populações foram submetidas a análises de distribuição das diferenças nos cenários de expansão geográfica e expansão demográfica. Em ambos os cenários, a maioria das populações apresentou sinal de expansão populacional e apenas duas mostraram sinal de estabilidade populacional, sob os cenários de expansão demográfica (Rancho Frio) e geográfica (Bocaina) (Figuras 4a e 4b) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10: Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão demográfica com Intervalo de confiança de 95% para um dado parâmetro; t= tempo em gerações desde o evento de expansão; SSD =soma dos quadrados dos desvios e PSSD = valor de p associado; r= índice "raggedness" e Pr = valor de p associado; τ = valor de tau; μ = taxa de substituição/sítio/ano; pb=pares de base.

Populações	SSD	P _{SSD}	r	P _r	τ	t	μ	Taxa (anos)	pb
Rancho Frio	0,0569	0,0139	0,2923	0,8811	0	0	0.00001362	0.000000017	803
PCHB	0,0625	0,3011	0,1983	0,2006	6,2030	227766	0.00001362	0.000000017	803
Garrafão	0,0817	0,0910	0,2090	0,1701	5,2170	191562	0.00001362	0.000000017	803
BOCA	0,0068	0,9499	0,2001	0,9555	0,5	18359	0.00001362	0.000000017	803

Tabela 11: Parâmetros estimados para a análise da distribuição das diferenças sob um cenário de expansão geográfica com Intervalo de confiança de 95% para um dado parâmetro; t= tempo em gerações desde o evento de expansão; SSD =soma dos quadrados dos desvios e PSSD = valor de p associado; r= índice "raggedness" e Pr = valor de p associado; τ = valor de tau; μ = taxa de substituição/sítio/ano; pb=pares de base.

Populações	SSD	P _{SSD}	r	P _r	τ	t	μ	Taxa (anos)	pb
Rancho Frio	0,0251	0,3468	0,2923	0,7793	2,7770	101714	0.00001362	0.000000017	803
PCHB	0,0324	0,7450	0,1983	0,6530	4,6080	168778	0.00001362	0.000000017	803
Garrafão	0,0587	0,2112	0,2090	0,5510	3,8300	140282	0.00001362	0.000000017	803
BOCA	0,0067	0,0007	0,2001	0,4725	0,5450	19961	0.00001362	0.000000017	803

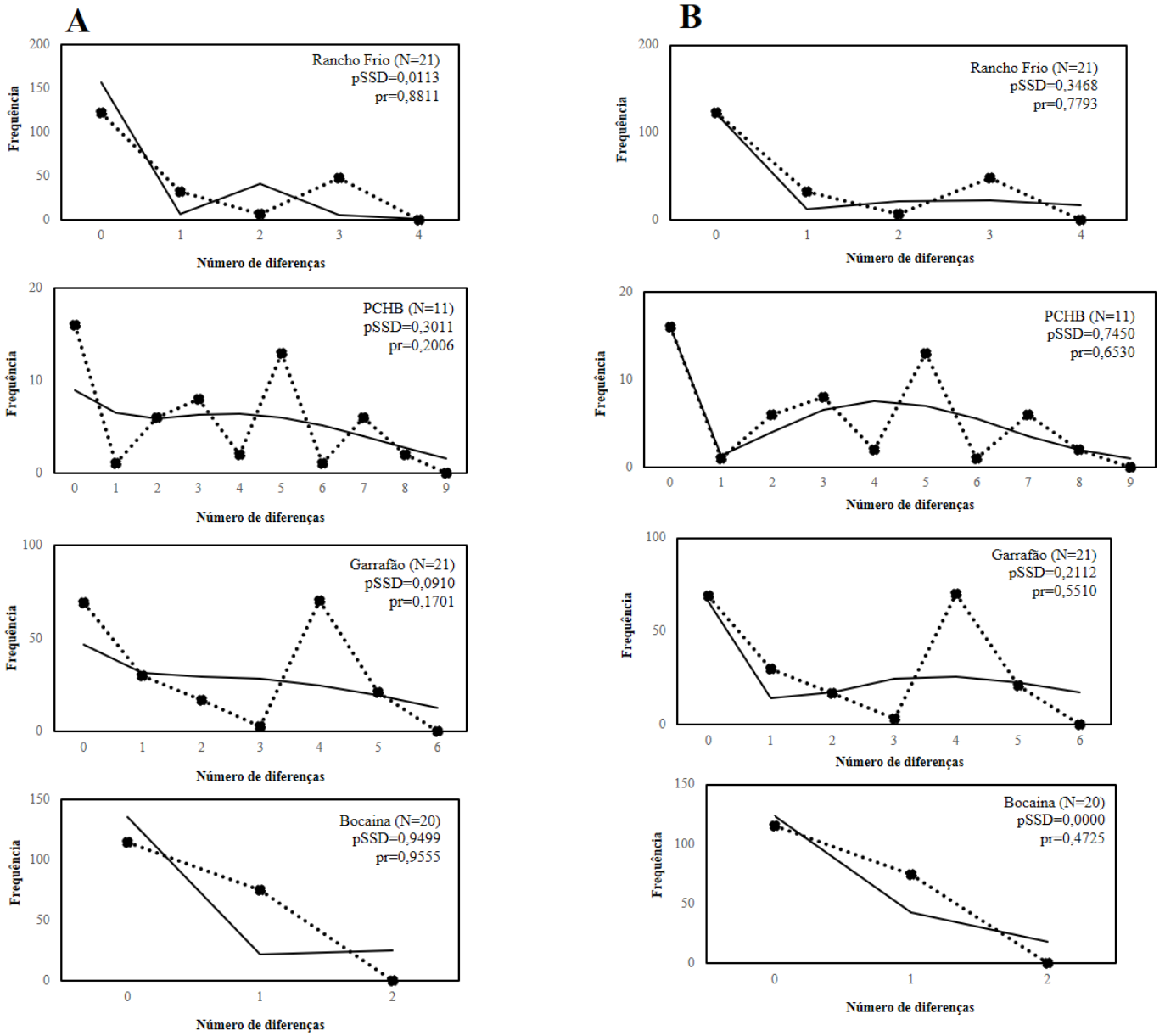


Figura 4: Distribuição *mismatch* do gene citocromo b para *Trinomys dimidiatus* nas quatro populações encontradas. As linhas cheias indicam o comportamento esperado sob um cenário de expansão e as linhas pontilhadas o comportamento observado. Figura 4a: Análise da distribuição das diferenças sob o cenário de expansão demográfica; figura 4b: Análise da distribuição das diferenças sob o cenário de expansão geográfica.

No cenário de expansão demográfica, (Figura 4a) a soma dos quadrados dos desvios (SSD), foi estatisticamente diferente do esperado sob a hipótese nula de expansão apenas na população do Rancho Frio ($p < 0,05$). Tais resultados corroboram a ideia de população estável na localidade de Rancho Frio e uma possível expansão nas demais localidades (Garrafão, Bocaina e PCHB). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

No cenário de expansão geográfica, (Figura 4b) a única localidade a apresentar o valor de SSD estatisticamente significativo foi a localidade da Bocaina ($p < 0,05$). Os resultados (Tabela 10) mostram que em todas as populações, não se pode descartar um possível evento de expansão populacional, sendo refutado estatisticamente apenas na localidade Bocaina.

A análise de *Bayesian Skyline plot* sugere que as populações da Bocaina, Garrafão e Rancho Frio mantiveram um declínio pouco acentuado ao longo do tempo. Porém a população do Rancho Frio também parece ter voltado a crescer e recuperar seu tamanho entre 20.000 e 5.000 anos atrás. Já a população de PCHB manteve sua população constante ao longo do tempo, não havendo nenhum evento demográfico acentuado, sejam eventos de expansão ou de retração populacional (Figura 5). Ressalta-se que há um aumento dos valores dos desvios à medida que as curvas se aproximam do eixo y, isto é, nos menores intervalos de tempo (tempo mais recente) em todas as populações, o que não permite conclusões sobre expansão ou declínios recentes.

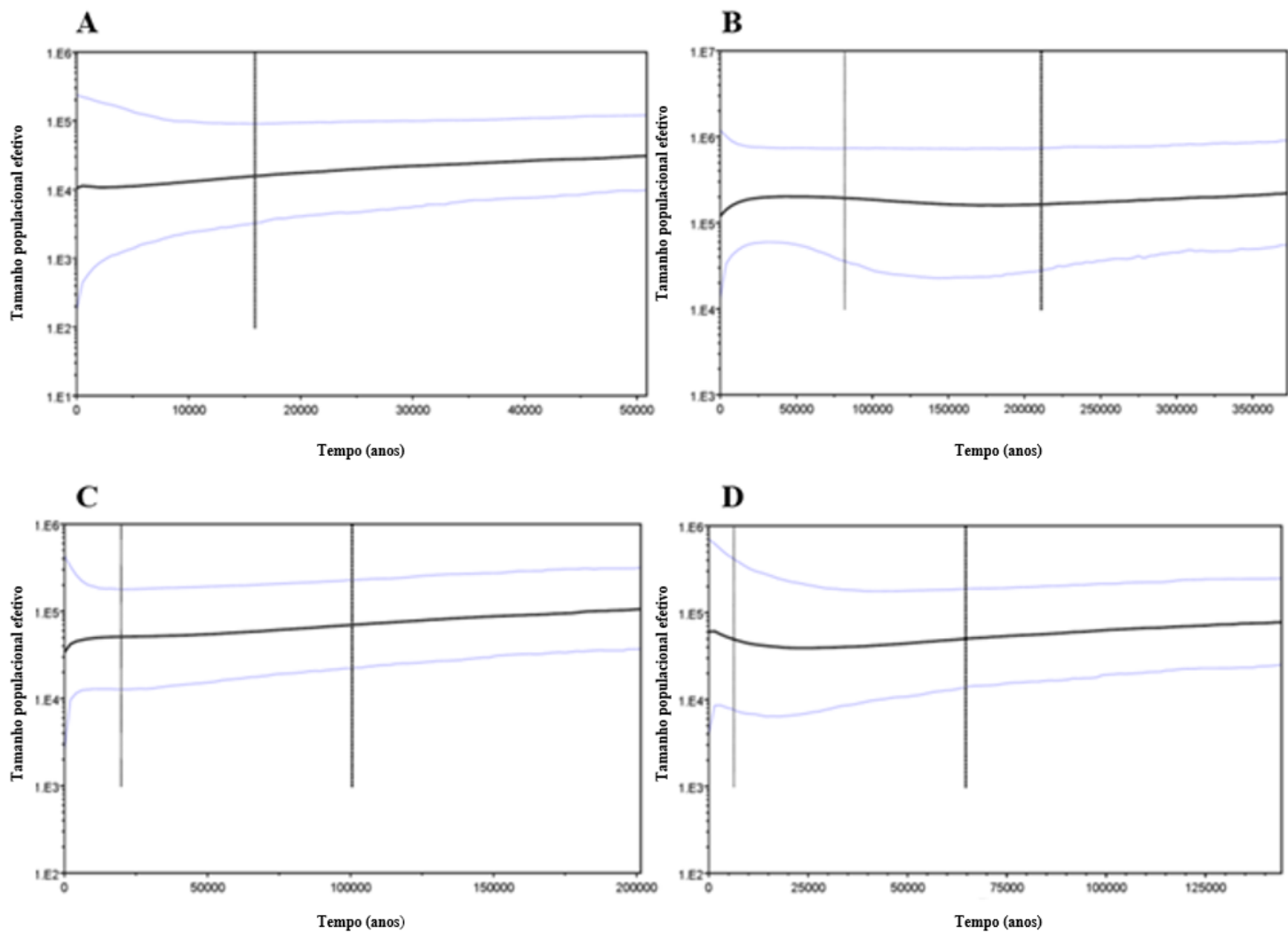


Figura 5: *Bayesian Skyline Plot* das quatro populações de *T. dimidiatus* definidas, mostrando a flutuação do tamanho efetivo nestas ao longo do tempo. (A) Bocaina (B) PCHB (C) Garrafão e (D) Rancho Frio.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estruturação populacional de *Trinomys dimidiatus*

Lara e Patton (2000) já haviam levantado a hipótese de uma possível diferenciação genética entre populações de *T. dimidiatus*. Em um estudo sobre a diversificação de espécies do gênero *Trinomys*, revelaram níveis baixos, porém existentes, de divergência genética em *T. dimidiatus*, ao analisarem 14 espécimes provenientes de cinco localidades - Mata da Rifa, Parque Estadual do Desengano (N=2); Nova Friburgo (N=3); Garrafão, (N=5); Fazenda Inglesa, Petrópolis, (N=1); Mambucaba, Angra dos Reis, (N=3). No presente estudo, de forma geral, foi evidenciada uma alta estruturação genética entre as localidades analisadas, indicada por altos valores de F_{ST} e Φ_{ST} significativos. Os valores de F_{ST} e Φ_{ST} obtidos sugerem um grau elevado de divergência genética, exceto entre as localidades de Rancho Frio e Garrafão, que obtiveram valores significativos de estruturação genética que indicam graus de divergência moderada e alta, para F_{ST} e Φ_{ST} , respectivamente.

Os padrões gerais de estruturação encontrados a partir do marcador citocromo b sugerem a ocorrência de quatro populações: Rancho Frio, Garrafão, PCHB e Bocaina. Os níveis baixos de divergência encontrados no estudo de Lara e Patton (2000), mesmo entre localidades distantes, como por exemplo as localidades de Garrafão e Mambucaba (distantes aproximadamente 180km) diferem do padrão encontrado no presente estudo, onde localidades muito mais próximas, como por exemplo Garrafão e Rancho Frio (distantes aproximadamente 3,7 km), apresentam graus de divergência de moderado a alto. Essa discrepância pode ser consequência do tamanho reduzido das sequências daquele estudo (apenas 393pb), que tem forte influência sobre o grau da variabilidade genética, visto que fragmentos de menor tamanho tendem a sinonimizar diversos haplótipos, ou seja, ocasionam uma redução da variabilidade genética encontrada.

Os resultados da AMOVA indicaram estruturação em três populações (Garrafão + Rancho Frio, Bocaina e PCHB), apoiados por um alto valor de Φ_{CT} significativo (79,54%) e baixo valor de Φ_{SC} (3,51%), também significativo. Embora os valores significativos de Φ_{CT} apoiem amplamente a distribuição nos três agrupamentos sugeridos, por um motivo de limitação do esquema de permutação empregado na técnica (é impossível testar a existência de quatro populações tendo um total de quatro localidades; o número de agrupamentos possíveis é sempre N-1, onde N é o número de localidades) optou-se por usar o cenário

recuperado pelos resultados do F_{ST} e Φ_{ST} par a par, indicando a existência de quatro populações (Garrafão, Rancho Frio, Bocaina e PCHB).

Embora muito próximas entre si, e dentro de um contínuo de *habitat*, as localidades pertencentes ao PARNASO, Rancho Frio e Garrafão, como mencionado anteriormente, apresentam diferenciação genética, indicando estruturação. Diversas hipóteses podem ser levantadas a fim de explicar tal estruturação. Uma hipótese é a do isolamento ocasionado pela baixa capacidade de dispersão. A distância entre as duas localidades é superior à capacidade de dispersão de pequenos roedores. O ambiente irregular na localidade Garrafão também pode ser um fator importante para a dispersão da espécie entre ambas as localidades, podendo dificultar essa movimentação. Além disso, observa-se em campo que a espécie não ocorre em populações numerosas (o sucesso de captura é inferior quando comparado a outros mamíferos de pequeno porte), o que é diretamente proporcional à dispersão, que tende a aumentar com o aumento da densidade populacional. Populações menos densas tendem a dispersar menos, aumentando a preferência de permanência no *habitat* (Matthysen, 2005).

Outra hipótese levantada para explicar a estruturação encontrada entre Garrafão e Rancho Frio é a de adaptação local. Embora ainda não tenha sido verificada ao nível intraespecífico, as diferentes espécies do gênero *Trinomys* apresentam uma estruturação relacionada ao *habitat*, onde diferentes clados dentro da filogenia do gênero estão relacionados a tipos diferentes de *habitat* (Lara *et al.*, 2005). Como há uma diferença na vegetação e na topografia presente nas duas localidades (Garrafão e Rancho Frio), talvez a estruturação possa estar relacionada a fidelidade das populações aos diferentes ambientes. Tal hipótese pode ser reforçada porque *T. dimidiatus* apresenta uma das menores distribuições dentro do gênero, podendo estar relacionada à adaptação local (Attias *et al.*, 2009). Além disso, *T. dimidiatus* não costuma ficar próximo de bordas (Vieira *et al.*, 2009), e o fato da localidade do Garrafão ser cortada por estradas de terra pode influenciar negativamente na dispersão da espécie para o Rancho Frio. A escolha de ambientes próximos a fontes de água (Pessoa *et al.*, 2015) também pode ser outro fator que influencia a estruturação das populações entre as localidades Rancho Frio e Garrafão, já que em ambas as localidades há presença de rios próximos. Como provavelmente não há um contínuo de fontes de água entre as localidades, a água pode restringir a distribuição da espécie, reforçando a ideia de permanência de *habitat* para a espécie. Além disso, entre os dois ambientes existem vales, que podem funcionar como barreiras para a espécie. Por fim a diferença entre as altitudes nas duas áreas (Rancho Frio varia de 1000 a 1200 metros; e no Garrafão de 522 a 748 metros) pode

acarretar diferenças no microclima, e conseqüentemente minimizar a dispersão entre as localidades.

A existência de um cenário de isolamento por distância em *T. dimidiatus*, apoiada pelo teste de Mantel, corrobora a estruturação genética encontrada. Entretanto, contrapõe o esperado para espécie. Lara e Patton (2000), ao analisar a diferença genética entre cinco localidades de *T. dimidiatus*, não encontraram correlação entre distância genética e distância geográfica, verificando que localidades relativamente próximas apresentavam alto grau de estruturação, e o mesmo não acontecia para localidades cuja distância era maior. Vale ressaltar novamente a utilização de sequências com apenas 393bp naquele estudo, o que pode ter mascarado a diversidade genética, somada a um número pequeno de espécimes analisados. Além disso, por mais que seja uma espécie generalista em termos de hábitos e alimentação, *T. dimidiatus* dificilmente ocorre em regiões próximas à borda (Vieira *et al.*, 2009), e a capacidade de atravessar as matrizes torna-se menor.

Estudos utilizando o mesmo marcador genético (citocromo b) em outras espécies congêneres apontam diferentes respostas em relação ao isolamento por distância. Agrizzi (2013) encontrou correlação entre distância genética e distância geográfica em *T. setosus*. Agrizzi incluiu mais espécimes nas análises quando comparadas ao estudo realizado por Lara e Patton em 2000 (15 contra 7), e utilizou além do gene mitocondrial (801pb), o exon 28 do gene nuclear que codifica o fator von Willebrand (vWF – 491pb). Entretanto, Agrizzi (2013) separa a espécie em dois filogrupos filogeneticamente distintos, “*T. setosus* Valença” (N=1; espécime proveniente da Bahia) e “*T. setosus* outros” (N=14; espécimes provenientes de Minas Gerais e Espírito Santo), apresentando relação entre a distância filogenética e a distribuição dos filogrupos. Embora tenha apresentado valores menores de correlação quando comparado à análise que engloba ambos filogrupos, e apenas para um dos marcadores (citocromo b), o filogrupo “*T. setosus* outros” apresentou correlação entre distância genética e geográfica.

Outra espécie de *Trinomys* apresentou resultados que também indicam isolamento por distância. Ao analisar 28 espécimes de *T. panema*, Agrizzi (2013) verificou correlação entre distâncias genética e geográfica apenas em um dos filogrupos encontrados para espécie (“*T. panema* outros”), diferindo de *T. setosus*, que mesmo ao analisar os filogrupos em conjunto obteve resultados que suportam o isolamento por distância. A diferenciação entre os filogrupos de *T. panema* não parece estar associada à distância geográfica entre eles, como ocorre em *T. setosus*. Ainda no estudo de Agrizzi (2013) a espécie *T. paratus* não apresentou

nenhuma correlação entre a distância genética e geográfica. Sendo assim, a diferença da correlação entre distância genética e geográfica nas diferentes espécies de *Trinomys* demonstra a importância da realização de estudos a fim de verificar quais fatores são decisivos para estruturação de populações de pequenos mamíferos, e quais são os efeitos que a fragmentação de *habitat* pode acarretar a elas.

5.2. Filogeografia

De forma geral, a rede de haplótipos também indicou uma alta estruturação geográfica para espécie, com muitos haplótipos exclusivos, presentes na maioria das localidades. As únicas populações que compartilharam haplótipos foram as populações de Rancho Frio e Garrafão; e Mambucaba e Bocaina, o que novamente corrobora os resultados de isolamento por distância, visto que estas são as localidades mais próximas entre si. Um único haplótipo (H1) não foi condizente com o padrão de distribuição da espécie, que possui uma alta correlação entre distância genética e geográfica, podendo ser um efeito estocástico, visto que a localidade a qual o mesmo pertence (Petrópolis) apresenta um único espécime, e a inclusão de mais indivíduos desta localidade pode revelar padrões diferentes do observado. Padrões parecidos ao observado na rede de haplótipos de citocromo b para *T. dimidiatus* foram encontrados em duas espécies de *Trinomys* utilizando o mesmo marcador (Agrizzi, 2013). As espécies *T. setosus* e *T. panema* não apresentaram compartilhamento de haplótipos entre diferentes localidades, assim como a maioria das localidades do presente estudo. Tal padrão reforça a ideia das três espécies de *Trinomys* aqui citadas apresentarem correlação entre estruturação genética e geográfica.

O compartilhamento de haplótipos entre regiões mais próximas, como Garrafão e Rancho Frio, pode ser decorrente de um fluxo gênico baixo, ou ainda de algum resquício histórico. Como levantado anteriormente, a espécie está distribuída em um amplo gradiente altitudinal, e pode, no passado, ter sido uma única população com distribuição nas duas localidades mencionadas. Porém, pode ter sofrido separação e agora as duas populações estão isoladas nas duas localidades, sem tempo para que fossem fixados haplótipos diferentes. Essa ideia de que Rancho Frio e Garrafão formavam uma única população no passado pode ser reforçada pelo fato do haplótipo mais frequente em ambas as localidades (H5) ser compartilhado entre ambas.

O número de mutações entre os haplótipos variou de 1 a 7, exceto entre as linhagens correspondentes às localidades Fazenda Nova Friburgo e Mata da Rifa. O alto número de mutações entre as localidades Fazenda Nova Friburgo e Mata da Rifa (26-38), em relação às demais localidades indica que essas duas localidades representem no mínimo duas populações distintas, porém é mais provável que os espécimes provenientes dessas duas localidades pertençam a unidades taxonômicas diferentes. Agrizzi (2013) verificou este mesmo padrão na espécie *T. setosus*, onde a localidade mais distante apresentou um grande número de passos mutacionais (48) das demais localidades, sugerindo a existência de dois filogrupos distintos (“*T. setosus* Valença” e “*T. setosus* outros”). Esses resultados apontam que a taxonomia da espécie *T. dimidiatus*, assim como de outras espécies do gênero, precisa ser investigada de forma integrativa, utilizando dados morfológicos e de sequências, a fim de esclarecer melhor as dúvidas que pairam sobre a classificação dessas espécies. É possível que esses espécimes classificados hoje como *T. dimidiatus* constituam um complexo de espécies crípticas ou subespécies.

A localidade que apresentou maior número de haplótipos foi PCHB, mesmo com número inferior de espécimes analisados. Tal resultado sugere que a população da localidade é a mais antiga dentre as localidades analisadas, sendo corroborado pelos resultados do *Bayesian skyline plot*. A diferenciação entre *Trinomys dimidiatus* e sua espécie irmã *T. iheringi* ocorreu no Mioceno tardio/Plioceno inicial (cerca de 5-8 milhões de anos atrás; Tavares *et al.*, 2015, 2016). A distribuição de *T. iheringi* corresponde a localidades costeiras e do planalto do estado de São Paulo, ocorrendo no Rio de Janeiro somente na Ilha Grande (Jack-Ximenes, 2005; Attias *et al.*, 2009). Como PCHB é uma localidade próxima da faixa de distribuição da sua espécie irmã (que tem como localidade tipo a Ilha de São Sebastião-SP) é provável que populações de *T. dimidiatus* tenham ocorrido primeiramente em localidades próximas a PCHB e depois tenham dispersado, conquistando novos ambientes. Entretanto, Bocaina, outra localidade próxima à faixa de distribuição atual de *T. iheringi*, apresentou o menor número de haplótipos dentre as quatro localidades com mais de um espécime analisado (PCHB, Bocaina, Rancho Frio e Garrafão). Este resultado não era esperado, visto que a localidade também se encontra próxima aos limites de distribuição da espécie irmã de *T. dimidiatus*. Porém os resultados do *Bayesian skyline plot* sugerem que a população sofreu um declínio populacional pouco acentuado ao longo do tempo, o que pode ter provocado a perda de haplótipos raros por efeito da deriva genética, fazendo com que a população atual fosse formada por pouca variedade de haplótipos, que ocorrem em maior número.

Alternativamente, a baixa diversidade pode significar que Bocaina é a população mais jovem, e que no passado, provavelmente compartilhou haplótipos com a localidade PCHB, já que há um haplótipo de PCHB (H13) na mesma linhagem filogeográfica de Bocaina. Portanto é possível que essa população tenha sido fundada mais recentemente, a partir de PCHB ou de outra localidade próxima, onde a espécie existiria há mais tempo.

Estima-se que as diferenças populacionais dentro de algumas espécies de *Trinomys*, incluindo *T. dimidiatus*, possam ter ocorrido no período pleistocênico (Tavares *et al.*, 2015). As últimas glaciações máximas, seguidas de períodos interglaciais no Pleistoceno, têm sido frequentemente utilizadas para explicar a grande diversidade de espécies da Mata Atlântica através da teoria dos refúgios. Muito embora diversos estudos com dados moleculares demonstrem que eventos de especiação possam ter ocorrido antes do período pleistocênico (Patton *et al.*, 1996; Lara; Patton, 2000; Patton; Costa, 2003), ou ainda dentro do período, mas explicada pela Teoria Atlântida (Leite *et al.*, 2016). Como grande parte dos processos de especiação dentro do gênero ocorreu em períodos anteriores ao Pleistoceno, como Mioceno e Plioceno (Lara; Patton, 2000, Tavares *et al.*, 2015, 2016), torna-se possível que as variações do período pleistocênico possam ter auxiliado de alguma forma na estruturação populacional da espécie *T. dimidiatus* e ainda na formação de unidades taxonômicas distintas. De acordo com o *Bayesian skyline plot*, a expansão das populações parece ter ocorrido no Pleistoceno, corroborando a hipótese levantada por Tavares e colaboradores (2015).

5.3.Relevância para conservação

Os estudos de genética de população de diferentes organismos têm se mostrado de extrema importância para um maior entendimento dos efeitos da fragmentação de *habitat* sobre as espécies. A comparação entre espécies de hábitos de vida distintos pode propiciar respostas importantes sobre como os organismos se comportam com a constante modificação ambiental, proporcionando subsídios necessários para a manutenção das espécies em seus ambientes.

Diversos estudos mostram que a divergência genética e a estruturação populacional podem ocorrer desde espécies generalistas a especialistas, dos mais variados táxons. Kajin (2008) e Gentile (2000), por exemplo, verificaram estruturação mesmo que pequena para a espécie de gambá *Didelphis aurita*. Os gambás possuem alta capacidade de dispersão e de atravessar matrizes altamente antropizadas (Prevedello; Vieira, 2010) e ainda assim apresentam níveis de estrutura populacional significativos em distâncias relativamente

pequenas nestes estudos. Se mesmo com essas características, que aumentam a capacidade de espécies de manter fluxo gênico entre fragmentos isolados por uma matriz, há estruturação, outras espécies como *T. dimidiatus* tenderiam a sofrer mais com os efeitos causados pela fragmentação. O isolamento de fragmentos para espécies que possuem menor capacidade de dispersão ou apresentam fidelidade de *habitat*, por exemplo, pode ser um fator de suma importância para determinar sua permanência na natureza, já que pode acarretar em uma drástica redução da variabilidade genética. Neste aspecto, as alterações que as populações podem sofrer ocasionadas pela fragmentação de *habitat* podem ser totalmente imprevisíveis. Torna-se necessária a busca por padrões de resposta de diversas espécies aos efeitos da fragmentação, principalmente quando estes são negativos, podendo fomentar a discussão sobre a importância da conservação da variabilidade genética nas espécies. Esses padrões podem ser generalizáveis para todas as espécies a fim de assegurar a permanência da variabilidade genética nas populações, e conseqüentemente da permanência das espécies. Neste caso, o princípio da precaução deverá ser adotado, já que é extremamente utópico estudar de forma aprofundada todas as espécies. Mesmo que este fosse o foco dos pesquisadores, muitas espécies seriam extintas antes mesmo de serem estudadas.

As quatro populações altamente estruturadas de *T. dimidiatus* demonstram que mesmo dentro de um mesmo fragmento (Rancho Frio e Garrafão – Parque Nacional da Serra dos Órgãos) há diferenciação populacional. Adotando o princípio da precaução, os resultados aqui obtidos devem ser extrapolados para todas as espécies cuja capacidade de dispersão e/ou ecologia se assemelhem a *T. dimidiatus*. Um ponto importante para discussão dos resultados aqui obtidos, é que todas as localidades analisadas pertencem a Unidades de Conservação. Neste aspecto torna-se mais fácil a permanência dessas populações, e conseqüentemente a manutenção da variabilidade genética, já que os efeitos causados por impactos antrópicos tendem a ser reduzidos. Entretanto, com distribuição potencial para todo o Rio de Janeiro (Attias, 2009), é provável que *T. dimidiatus* ocorra fora de áreas de proteção, o que pode ser um grande problema para a conservação da variabilidade genética, já que estas populações estarão suscetíveis às atividades antrópicas. A espécie, assim como diversas outras endêmicas da Mata Atlântica, precisa de atenção redobrada, a fim de se evitar extinções locais e da espécie como um todo. Todas as populações de qualquer espécie devem ser preservadas, pois só desta forma proporcionamos a manutenção da variabilidade genética (potencial evolutivo) que é fundamental para a persistência da espécie no espaço ao longo do tempo.

6. CONCLUSÕES

1. *Trinomys dimidiatus* apresentou alta estruturação genética ao longo da sua distribuição, tendo sido identificadas ao menos quatro populações (Rancho Frio, Garrafão, PCHB e Bocaina);

2. Foi observado forte isolamento por distância, que corrobora e pode explicar a estruturação populacional observada na espécie;

3. Mesmo em distâncias muito próximas (Garrafão e Rancho Frio) houve estruturação populacional, podendo gerar consequências graves para a persistência da espécie, considerando o cenário de intensa fragmentação da Mata Atlântica;

4. Na maioria das localidades não foi possível refutar a hipótese de expansão populacional e geográfica;

5. A alta divergência genética dos haplótipos observados em Fazenda Inglesa e Mata da Rifa, em relação às demais localidades, indicam que a taxonomia da espécie precisa ser investigada de forma integrativa, a fim de esclarecer dúvidas sobre a existência de espécies crípticas ou subespécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBOGAST, B. S.; EDWARDS, S. V.; WAKELEY, J.; BEERLI, P.; SLOWINSKI, J. B. (2002). Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual review of Ecology and Systematics*, 33(1), 707-740.
- ADLER, G.H. (2011). Spacing patterns and social mating systems of echimyid rodents. *Journal of Mammalogy*, 92, 31-38.
- AGRIZZI, J. (2013). Filogeografia comparada de espécies de *Trinomys* (Rodentia:Echimyidae) na região central da Mata Atlântica. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2013.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693.
- ALLENDORF, F. W. (2017). Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular ecology*, 26(2), 420-430.
- ANDERSEN, M.; THORNHILL, A.; KOOPOWITZ, H. (1997). Tropical forest disruption and stochastic biodiversity losses. In: W.F. Laurance, & R.O. Bierregaard, Jr., (eds.). *Tropical forest remnants: ecological, management, and conservation of fragmented*
- ATTIAS, N.; RAÍCES, D. S.; PESSOA, F. S.; ALBUQUERQUE, H.; JORDÃO-NOGUEIRA, T.; MODESTO, T. C.; BERGALLO, H. D. G. (2009). Potential distribution and new records of *Trinomys* species (Rodentia: Echimyidae) in the state of Rio de Janeiro. *Zoologia (Curitiba)*, 26(2), 305-315.
- AVISE, J. C. (1994). Conservation genetics. In *Molecular Markers, Natural History and Evolution* (pp. 361-398). Springer US.
- AVISE, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVISE, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. 2a ed. Sinauer Press. 541 p.

AVISE, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18(1), 489-522.

AVISE, J. C.; BOWEN, B. W.; AYALA, F. J. (2016) In the light of evolution X: comparative phylogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 7957–7961.

AVISE, J. C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM, J.; PATTON, J. C.; LANSMAN, R. A. (1979a) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 6694–6698.

AVISE, J. C.; LANSMAN, R. A.; SHADE, R. O. (1979b) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92, 279–295.

BALLARD, J. W. O.; KREITMAN, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology & Evolution*, 10(12), 485-488.

BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.

BANDEL, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 16: 37–48.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. (1999). Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152(2), 763-773.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 4563 – 4568.

BERGALLO, H. G. (1994). Ecology of a small mammal communities in an Atlantic forest area in Southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 4: 197-217.

BRODIE, J. F.; GIORDANO, A. J.; AMBU, L. (2015). Differential responses of large mammals to logging and edge effects. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 80(1), 7-13.

BROWN, K. S.; BROWN, G. G. (1992). Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: T.C. Whitmore & G.T. Prance (eds.). *Tropical deforestation and species extinction*.

BROWN, K. S.; HUTCHINGS, R. W. (1997). Disturbance, fragmentation, and the dynamics of diversity in Amazonian forest butterflies. In: W.F. Laurance, & R.O. Bierregaard, (eds.). *Tropical forest remnants: Ecology, management, and conservation of fragmented communities*. The University of Chicago Press, Chicago.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. (2001). Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36(2), 85-92.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. D. A. (2007). Germination in seed species ingested by opossums: implications for seed dispersal and forest conservation. *Brazilian Archives of Biology and technology*, 50(6), 921-928.

CASTRO, E. B. V. (2008). *Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos*, ICMBIO, Teresópolis.

CHIARELLO, A. G. (1999). Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, 89(1), 71-82.

CORRÊA, M. M. D. O.; LOPES, M. O. G.; CÂMARA, E. V. (2005). The karyotypes of *Trinomys moojeni* (Pessôa, Oliveira & Reis, 1992) and *Trinomys setosus elegans* (Lund, 1841) (Rodentia, Echimyidae) from Minas Gerais, eastern Brazil. *Arquivos do Museu Nacional*, 63(1), 169-174.

- COURTOIS, R.; BERNATCHEZ, L.; OUELLET, J. P.; BRETON, L. (2003). Significance of caribou (*Rangifer tarandus*) ecotypes from a molecular genetics viewpoint. *Conservation Genetics.*, 4, 393–404.
- CUNHA, H. A.; SOLÉ-CAVA, A. (2012). Análise filogeográfica. *Matioli et al. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos*, 197-215.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- DELICIELLOS, A. C.; NOVAES, R. L. M.; LOGUERCIO, M. F. C.; GEISE, L.; SANTORI, R. T.; SOUZA, R. F.; PAPI, B. S.; RAÍCES, D.; VIEIRA, N. R.; FELIX, S.; DETOGNE, N.; DA SILVA, C. C. S.; BERGALLO, H. G.; ROCHA-BARBOSA, O. (2012). Mammals of Serra da Bocaina National Park, state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Check List*, 8(4), 675-692.
- DIAMOND, J. M. (1980). Patchy distributions of Tropical birds. In: M.E. Soulé and B.A. Wilcox (eds.) *Conservation biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- DRECHSLER, M.; WISSEL, C. (1998). Trade-offs between local and regional scale management of metapopulations. *Biological Conservation*, 83(1), 31-41.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O.G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology Evolution*, 22: 1185–119
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology Evolution*, 8: 1969–1973.
- DUPANLOUP I.; SCHNEIDER S.; EXCOFFIER L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- EDWARDS, S. V.; BEERLI, P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54, 1839–1854.
- EMMONS, L.H.; FEER, F. (1997). *Neotropical Rainforest mammals: a field guide*. Chicago, University of Chicago Press, 2nd ed., XIII+281p.

- EXCOFFIER L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13, 853-864.
- EXCOFFIER L., LAVAL G., SCHNEIDER S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E; QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491.
- FAGUNDES, N. J. R.; RAY, N.; BEAUMONT, M.; NEUENSCHWANDER, S.; SALZANO, F. M.; BONATTO, S. L.; EXCOFFIER, L. (2007). Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 104, 17614-17619.
- FAHRIG, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487-515.
- FINOTTI, R.; HOTTZ, D.; SÁNCHEZ-TAPIA, A.; RAMOS, E.; RODRIGUES P. J. F. P. (2012). Resultados preliminares sobre a estrutura e composição da comunidade arbórea do Rancho Frio – PARNASO - RJ. *Anais do 10º Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos*.
- FRANKEL, O.H. (1970). Variation, the essence of life. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 95, 158-169.
- FRANKEL, O.H. (1974). Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics*, 78, 53-65.
- FRANKHAM, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126(2), 131-140.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.

- FRANKHAM, R.; KINGSLOVER, J. G. (2004). Response to environmental change: Adaptation or extinction. In: Ferrier, R., Dieckman, U., Couvet, D. (Eds.), *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85–100.
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147:915–925.
- FU Y. X., LI W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- FU, Y. X.; LI, W. H. (1999). Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical population biology*, 56(1), 1-10.
- GAINES, M. S.; DIFFENDORFER, J. E.; TAMARIN, R. H.; WHITTAM, T. S. (1997). The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity*, 88(4), 294-304.
- GALEWSKI, T.; MAUFFREY, J.F.; LEITE Y.L.R; PATTON J.L.; DOUZERY, E.J.P. (2005). Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 601–615.
- GARDNER, A. L.; EMMONS, L. H. (1984). Species groups in *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) as indicated by karyology and bullar morphology. *Journal of Mammalogy*, 65(1), 10-25.
- HABTEC. (2004). Estudo de Impacto Ambiental e Relatório de Impacto Ambiental da Pequena Central Hidrelétrica Braço. Seção Meio Biótico. 168p.
- HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L.A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D.; LOVEJOY, T. E.; SEXTON, J. O.; AUSTIN, M. P.; COLLINS, C. D.; COOK, W. M.; DAMSCHEN, E. I.; EWERS, R. M.; FOSTER, B. L.; JENKINS, C. N.; KING, A. J.; LAURANCE, W. F.; LEVEY, D. J.; MARGULES, C. R.; MELBOURNE, B. A.; NICHOLLS, A. O.; ORROCK, J. L.; SONG, D. X.; TOWNSHEND, J. R. (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. *Science Advances*, 1(2), e1500052.

HANSEN, M. C.; POTAPOV, P. V.; MOORE, R.; HANCHER, M.; TURUBANOVA, S.; TYUKAVINA, A.; THAU, D.; STEHMAN, S. V.; GOETZ, S. J.; LOVELAND, T. R.; KOMMAREDDY, A.; EGOROV, A.; CHINI, L.; JUSTICA, C. O.; TOWNSHEND, J. R. G. (2013). High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*, 342(6160), 850-853.

HANSKI, I; GAGGIOTTI, O. E. (2004). Metapopulation biology: Past, present, and future. *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations*, 3–22.

HARPENDING H. C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591-600.

HARRIS, H. (1966) Enzyme polymorphism in man. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 164, 298–310.

HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 291-301.

HOLSINGER, K.E.; WEIR, B.S. (2009) Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics*, 10, 639- 649.

HORN, G. B.; KINDEL, A.; HARTZ, S. M. (2008). *Akodon montensis* (Thomas, 1913) (Muridae) as a disperser of endozoochoric seeds in a coastal swamp forest of southern Brazil. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 73(4), 325-329.

HUGHES, A. R.; INOUYE, B. D.; JOHNSON, M. T.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-623.

IACK-XIMENES, G. E. (2005). Revisão de *Trinomys* Thomas, 1921 (Rodentia: Echimyidae). Universidade de São Paulo, São Paulo.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS. (2001). Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra da Bocaina. Available at <http://www.paraty.com.br/bocaina/index.htm>. IBAMA/PRÓ- BOCAINA. 6v.

JENSEN, J.L., BOHONAK, A.J., AND KELLEY, S.T. (2005). Isolation by distance, web service. BMC Genetics, 6: 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>

KINNISON, M. T.; BENTZEN, P.; UNWIN, M. J.; QUINN, T. P. (2002). Reconstructing recent divergence: evaluating non equilibrium population structure in New Zealand chinook salmon. Molecular Ecology, 11(4), 739-754.

KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. (2002). Statistical phylogeography. Molecular Ecology, 11, 2623–2635.

KOCHER, T.D.; W.K. THOMAS; A. MEYER; S.V. EDWARDS; S. PÄÄBO E F.X. VILLABLANCA. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16), 6196-6200.

KREITMAN, M. (2000). Methods to detect selection in populations with applications to the human. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 1, 539–559.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33:1870-1874.

LACY, R.C. (1997). Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. Journal of Mammalogy, 78 (2):320-335.

LAIKRE, L. (2010). Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. Conservation Genetics, 11(2), 349-354.

LAIKRE, L.; ALLENDORF, F. W.; ARONER, L. C.; BAKER, C. S.; GREGOVICH, D. P.; HANSEN, M. M.; JACKSON, J.A.; KENDAL, K. C. L; MCKELVEY, K.; NEEL, M. C.; OLIVIERI, I.; RYMAN, N.; SCHWARTZ, M. K.; BULL, R. S.; STETZ, J. B.; TALLMON, D. A.; TAYLOR, B. L.; VOJTA, C. D.; WALLER, D. M; WAPLE, R. S. (2010). Neglect of genetic diversity in implementation of the convention of biological diversity. Conservation Biology, 24(1), 86-88.

LARA, M.C.; PATTON, J.L. (2000). Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys* Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 130, 661-686.

LARA, M.C.; PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F. (1996). The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 403-413.

LAURANCE, W.F. (1990). Comparative responses of five arboreal marsupials to tropical forest fragmentation. *Journal of Mammalogy* 71, 64-653.

LAURANCE, W. F. (1991). Ecological correlates of extinction proneness in Australian tropical rain forest mammals. *Conservation Biology*, 5(1), 79-89.

LAURANCE, W. F.; CAMARGO, J. L.; LUIZÃO, R. C.; LAURANCE, S. G.; PIMM, S. L.; BRUNA, E. M STOUFFER PC, WILLIAMSON, G. B.; BENITEZ- MALVIDO, J.; VASCONCELOS, H. L.; VAN HOUTAN, K. S.; ZARTMAN, C. E.; BOYLE, S. A.; DIDHAM, R. K.; ANDRADE, A.; LOVEJOY, T. E. (2011). The fate of Amazonian forest fragments: a 32-year investigation. *Biological Conservation*, 144(1), 56-67.

LAURANCE, W. L.; YENSEN, E. (1991). Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biology Conservation*, 55: 77-92.

LAZAR, A.; NACIF, C.; WEKSLER, M.; BONVICINO, C. R. (2017). The karyotype of *Trinomys paratus* (Rodentia: Echimyidae) with comments about its phylogenetic relationship. *Mammalia*.

LEAL-MESQUITA, E. R.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; CHU, T. H.; DA ROCHA, P. L. B. (1992). Chromosomal characterization and comparative cytogenetic analysis of two species of *Proechimys* (Echimyidae, Rodentia) from the Caatinga domain of the State of Bahia, Brazil. *Caryologia*, 45(2), 197-212.

LEITE, Y. L.; COSTA, L. P.; LOSS, A. C.; ROCHA, R. G.; BATALHA-FILHO, H.; BASTOS, A. C.; QUARESMA, V. S.; FAGUNDES, V.; PARESQUE, R.; PASSAMANI, R.; PARDINI, R. (2016). Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(4), 1008-1013.

LEITE, Y.L.R.; PATTON, J.L. (2002). Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 455-464.

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 2. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54, 595–609.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.

LINO, C.F.; ALBURQUERQUE, J.L. (2007). Mosaicos de Unidades de Conservação no Corredor da Serra do Mar. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica.

LOSS, A.C. Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica. 2014. 139f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2014.

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

MACEDO, J.; LORETTO, D.; MELLO, M. C. S.; FREITAS, S. R.; VIEIRA, M. V. & CERQUEIRA, R. (2007). História Natural dos mamíferos de uma área perturbada do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil. In: Cronemberger, c. & de castro e.b.v. (orgs). *Ciência e conservação da serra dos órgãos*. Brasília: IBAMA. 165-182 p.

MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.

MATTHYSEN, E. (2005). Density-dependent dispersal in birds and mammals. *Ecography*, 28(3), 403-416. MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton.

MCNEELY, J. A.; MILLER, K. R.; REID, W. V.; MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T. B. (1990). *Conserving the world's biological diversity*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

- MEIRMANS P. G., HEDRICK P. W. (2011) Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 5-18.
- MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 10(6), 1509-1518.
- MOOJEN, J. (1948). Speciation in the Brazilian spiny rats (genus *Proechimys*, family Echimyidae). University of Kansas Publications, 1: 301-406.
- MORITZ, C.; FAITH, D. P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7(4), 419-429.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350.
- MYERS, N. (1984). *The primary source: Tropical forests and our future*. W.W. Norton, New York.
- NASCIMENTO, H. E.; LAURANCE, W. F. (2006). Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. *Acta Amazonica*, 36(2), 183-192.
- NEIGEL, J. E. (2002). Is F_{ST} Obsolete? *Conservation Genetics*, 3(2), 167-173.
- NIELSEN R. (2001). Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity* 86:641-47
- NIELSEN, R. (2005). Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 39, 197-218.
- NIMER, E. (1989). *Climatologia do Brasil*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, Brasil.
- OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E. (2002). The Global 200: Priority ecoregions for global conservation. *Annals of the Missouri Botanical garden*, 199-224.
- PATTON, P.W. C. (1994). The effects of edge on avian nest success: How strong is the evidence? *Conservation Biology*, 8: 17-26.

PATTON, J. L.; COSTA, L. P. (2003). Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. *Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials*, 63-81.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. (2004) Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetic*, 5 (5): 585-602

PESSÔA, L.M.; TAVARES, W.C.; OLIVEIRA; J.A.; PATTON, J.L. (2015). Genus *Trinomys* Thomas, 1921. *Mammals of South America. Vol. 2. Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.

PEREIRA, H. M.; LEADLEY, P. W.; PROENCA, V.; ALKEMADE, R.; SCHARLEMANN, J. P. W.; FERNANDEZ-MANJARRES, J. F.; ARAUJO, M. B.; BALVANERA, P.; BIGGS, R.; CHEUNG, W. W. L.; CHINI, L.; COOPER, H. D.; GILMAN, E. L.; GUENETTE, S.; HURTT, G. C.; HUNTINGTON, H. P.; MACE G. M.; OBERDORFF T.; REVENGA C.; RODRIGUES P.; SCHOLLES, R. J.; SUMAILA, U. R.; WALPOLE M. (2010). Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science*, 330, 1496–1501

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. (2003). Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. *Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brasil, 343-380.

PINOTTI, B. T.; NAXARA, L.; PARDINI, R. (2011). Diet and food selection by small mammals in an old-growth Atlantic forest of south-eastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 46(1), 1-9.

PRAKASH, S.; LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. (1969). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61(4), 841.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. (2006). Biologia da conservação. In *Biologia da conservação*.

RANDS, M. R.; ADAMS, W. M.; BENNUN, L.; BUTCHART, S. H.; CLEMENTS, A.; COOMES, D.; ENTWISTLE, A.; HODGE, I.; KAPOS, V.; SCHARLEMANN, J. P. W.; SUTHERLAND, W. J.; VIRA, B. (2010). Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science*, 329(5997), 1298-1303.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142(6), 1141-1153.

RIBEIRO, D. B.; PRADO, P. I.; BROWN JR, K. S.; FREITAS, A. V. (2010). Temporal Diversity Patterns and Phenology in Fruit-feeding Butterflies in the Atlantic Forest. *Biotropica*, 42(6), 710-716.

RICE, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223-225.

RIES, L.; FLETCHER JR, R. J.; BATTIN, J.; SISK, T. D. (2004). Ecological responses to habitat edges: mechanisms, models, and variability explained. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 491-522.

RIITERS, K.; WICKHAM, J.; COSTANZA, J. K.; VOGT, P. (2015). A global evaluation of forest interior area dynamics using tree cover data from 2000 to 2012. *Landscape Ecology*, 31, 137–148.

RIZZINI, C. T. (1979). *Tratado de fitogeografia do Brasil*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 374p.

ROGERS A. R., HARPENDING H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552-569.

ROUSSET F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219-1228.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5463-5467.

SCHLÖTTERER, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature reviews genetics*, 5(1), 63-69.

- SCHMIDT, M.; JOCHHEIM, H.; KERSEBAUM, K. C.; LISCHIED, G.; NENDEL, C. (2017). Gradients of microclimate, carbon and nitrogen in transition zones of fragmented landscapes—a review. *Agricultural and Forest Meteorology*, 232, 659-671.
- SCHNEIDER, S.; 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(3), 1079-1089.
- SHAFFER, M. L. (1981). Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, 31: 131-134.
- SMITH, M. F.; PATTON, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149-177.
- DA SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. (2003). Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. CABS and Island Press, Washington, 43-59.
- SLATKIN, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science (Washington)*, 236(4803), 787-792.
- TAJIMA F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- TAJIMA F. (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143, 1457-1465.
- TAVARES, W. C.; PESSÔA, L. M.; SEUÁNEZ, H. N. (2015). Plio-Pleistocene history of the endangered spiny rat *Trinomys eliasi* (Echimyidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Mammalogy*, 96(1), 94-106.
- TAVARES, W. C.; PESSÔA, L. M.; SEUÁNEZ, H. N. (2016). Stability and acceleration of phenotypic evolution in spiny rats (*Trinomys*, Echimyidae) across different environments. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(1), 149-162.
- THOMAS, O. (1921) XIII. —On spiny rats of the *Proechimys* group from South-eastern Brazil. *Journal of Natural History*, 8 (43), 140–143.

- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673- 4680.
- TILMAN, D.; MAY, R. M.; LEHMAN, C. L.; NOWAK, M. A. (1994). Habitat destruction and the extinction debt. *Nature*, 371(6492), 65-66.
- TURNER, I. M. (1996). Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of applied Ecology*, 200-209.
- VERNESI, C.; BRUFORD, M. W.; BERTORELLE, G.; PECCHIOLI, E.; RIZZOLI, A.; HAUFFE, H. C. (2008). Where's the conservation in conservation genetics? *Conservation Biology*, 22(3), 802-804.
- VIEIRA, E. M.; PAISE, G.; MACHADO, P. H. (2006). Feeding of small rodents on seeds and fruits: a comparative analysis of three species of rodents of the Araucaria forest, southern Brazil. *Acta theriologica*, 51(3), 311-318.
- VILAS, C.; SAN MIGUEL, E.; AMARO, R.; GARCIA, C. (2006). Relative contribution of inbreeding depression and eroded adaptive diversity to extinction risk in small populations of shore campion. *Conservation Biology*, 20(1), 229-238.
- VOLOCH, C. M.; VILELA, J. F.; LOSS-OLIVEIRA, L.; SCHRAGO, C. G. (2013). Phylogeny and chronology of the major lineages of New World hystricognath rodents: insights on the biogeography of the Eocene/Oligocene arrival of mammals in South America. *BMC Research Notes*, 6(1), 160
- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. (2006). Invited review: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology*, 15(6), 1419-1439.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 38(6), 1358-1370.
- WEIR, B. S.; HILL, W. G. (2002). Estimating F-statistics. *Annual review of genetics*, 36(1), 721-750.

- WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. (1999). Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1 / (4Nm + 1)$. *Heredity*, 82(2), 117-125.
- WILLIAMS, M. (2003). *Deforesting the Earth: From Prehistory to Global Crisis*. University of Chicago Press, Chicago.
- WILSON, M. C.; CHEN, X. Y.; CORLETT, R. T.; DIDHAM, R. K.; DING, P.; HOLT, R. D.; HOLYOAK, M.; HU, G.; HUGHES, A. C.; JIANG, L.; LAURANCE, W. F.; LIU, J.; PIMM, S. L.; ROBINSON, S. K.; RUSSO, S. E.; SI, X.; WILCOVE, D. S.; WU, J.; LAURANCE, W. F. (2016). Habitat fragmentation and biodiversity conservation: key findings and future challenges. *Landscape Ecology*, 31: 219–227.
- WRIGHT S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- WRIGHT, S. (1977). *Evolution and the genetics of populations: Genetics and biometric foundations. Volume 3 - Experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- WRIGHT, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4*. University of Chicago Press, Chicago.
- WRIGHT, S. (1984). *Evolution and the genetics of populations: Genetics and biometric foundations. Volume 4 - Variability within and among natural populations. New Edition*. University of Chicago Press, Chicago.
- WU, J. G. (2013). Key concepts and research topics in landscape ecology revisited: 30 years after the Allerton Park workshop. *Landscape Ecology*, 28:1–11
- ZUIDEMA, P. A.; SAYER, J. A.; DIJKMAN, W. (1996). Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. *Environmental conservation*, 23(4), 290-297.
- ZURITA, G.; PE'ER, G.; BELLOCQ, M. I.; HANSBAUER, M. M. (2012) Edge effects and their influence on habitat suitability calculation: a continuous approach applied to birds of the Atlantic forest. *Journal of Applied Ecology*, 49:503-512.

CAPÍTULO 2

***Trinomys dimidiatus* ou *Trinomys iheringi*? Identificação molecular e investigação da existência de híbridos entre os espécimes de *Trinomys* Thomas, 1921 na Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.**

RESUMO

Trinomys (Thomas, 1921) é um gênero de roedor da família Echimyidae endêmico do Brasil. Ocorre na Mata Atlântica e Caatinga, abrangendo desde habitats úmidos até áreas semiáridas. Atualmente possui dez espécies reconhecidas. *Trinomys dimidiatus* ocorre em todo o Rio de Janeiro e em parte do litoral de São Paulo e sua espécie irmã *Trinomys iheringi* tem distribuição restrita à Ilha Grande e a São Paulo. Há dúvidas sobre a real distribuição de *T. iheringi* e *T. dimidiatus*, e sobre qual delas, ou se ambas estão presentes na Ilha Grande, visto que essa é uma Ilha continental, localizada entre a distribuição das duas espécies e isolada recentemente do continente. As duas espécies divergiram recentemente e são morfologicamente semelhantes, porém distintas em seus cariótipos e em alguns caracteres morfológicos de difícil visualização em campo. Os objetivos deste trabalho foram identificar através de marcadores moleculares qual a espécie de *Trinomys* está presente na localidade de Ilha Grande, e investigar se existe hibridação entre as espécies *T. dimidiatus* e *T. iheringi*. Para isso, foram utilizadas sequências do marcador mitocondrial citocromo b (cit b) e do éxon 28 do gene nuclear que codifica o fator von Willebrand (vWF). Foram analisadas 20 amostras da localidade Ilha Grande, cobrindo 803 e 493 pares de bases dos genes cit b e vWF respectivamente. Ambos os marcadores se mostraram extremamente eficientes na identificação de ambas as espécies. Os dados moleculares mostraram que dos 20 espécimes analisados, todos correspondem à espécie *T. dimidiatus*, não havendo nenhum indício de híbridos entre *T. iheringi* e *T. dimidiatus* na localidade. Os resultados apontaram inconsistências na classificação, principalmente em estudos de Ecologia realizados na área, que têm identificado a espécie de *Trinomys* da Ilha como *T. dimidiatus*.

Palavras-chave: *Trinomys dimidiatus*, *Trinomys iheringi*, Ilha Grande, identificação molecular, hibridação, citocromo b, vWF.

ABSTRACT

Trinomys (Thomas, 1921) is a genus of rodent from the Echimyidae family endemic to Brazil. It occurs in the Atlantic Forest and Caatinga, ranging from humid habitats to semi-arid areas. Presently, it has ten recognized species. *Trinomys dimidiatus* occurs throughout the State of Rio de Janeiro and part of the coast of the State of São Paulo, and *Trinomys iheringi* has its distribution restricted to Ilha Grande and São Paulo. There are doubts about the actual distribution of *T. iheringi* and *T. dimidiatus*, and which species (or both) are present on Ilha Grande, since this is a continental island, located between the distributions of the two species and isolated recently from the continent. The two species have recently diverged and are morphologically similar, but distinct in their karyotypes and some morphological characters difficult to see in the field. The objectives of this work were to identify, through molecular markers, the *Trinomys* species on Ilha Grande, and to investigate whether there is hybridization between *T. dimidiatus* and *T. iheringi*. For this, sequences of the mitochondrial marker cytochrome b (cit b) and nuclear marker exon 28 of the von Willebrand factor gene (vWF) were analyzed. Twenty samples from the Ilha Grande locality were analyzed, covering 803 and 493 base pairs of the cit b and vWF genes respectively. Both markers were extremely efficient at identifying both species. The molecular data showed that of the 20 specimens analyzed, all belong to the species *T. dimidiatus*, with no evidence of hybrids between *T. iheringi* and *T. dimidiatus* in the locality. The results point to inconsistencies in classification, especially in ecologic studies conducted in the area, which considered the *Trinomys* on Ilha Grande as *T. dimidiatus*.

Keywords: *Trinomys dimidiatus*, *Trinomys iheringi*, Ilha Grande, molecular identification, hybridization, cytochrome b, vWF.

1) INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Trinomys*

O gênero *Trinomys* é constituído de espécies de roedores terrestres, de hábito cursorial e que apresentam morfologia muito semelhante ao gênero *Proechimys*, ambos pertencentes à família Echymidae. Tal semelhança explica o fato de ambos os gêneros, conhecidos como ratos de espinho, terem sido classificados, no passado, como *Proechimys*, divididos em dois subgêneros – *Proechimys sensu stricto* e *Trinomys* – por conta da diferença entre o número de contraplacas nos dentes molariformes, quatro e três respectivamente (Thomas, 1921 *apud* Iack-Ximenes, 2005). Embora parecidos morfologicamente, os dois gêneros, *Trinomys* e *Proechimys* não eram apoiados como grupos irmãos em nenhum dos estudos filogenéticos realizados (Lara *et al.*, 1996; Leite; Patton 2002; Galewski *et al.*, 2005; Upham; Patterson 2012). Sendo assim, a divisão de *Proechimys* em dois gêneros passou a ser corroborada, indicando que o gênero *Trinomys* é uma unidade taxonômica válida. Hoje, o gênero é um dos grupos de roedores histricognatos mais diversificado. Dez espécies do gênero *Trinomys* são atualmente reconhecidas, estando distribuídas amplamente pelo bioma de Mata Atlântica e ao leste e sul do Brasil, no bioma de Caatinga (Lara *et al.*, 1996; Lara; Patton, 2000; Attias *et al.*, 2009; Pêssoa *et al.*, 2015). Embora dez espécies sejam seguramente reconhecidas, diversos estudos indicam a existência de outras (sub) espécies (Iack-Ximenes, 2005; Woods; Kilpatrick, 2005), mas é necessário que estudos taxonômicos sejam realizados de forma integrativa, a fim de sanar os problemas relacionados à classificação dos táxons pertencentes ao gênero *Trinomys*.

O registro fóssil mais antigo para o gênero data do Pleistoceno (McKenna; Bell 1997), porém diversos estudos utilizando datações através de relógio molecular atribuem o início da diversificação do gênero para o período correspondente ao Mioceno tardio (Leite; Patton, 2002; Galewski, 2005). O gênero *Trinomys* é composto por três clados distintos que apresentam divergência maior ou igual a outros gêneros pertencentes à família Echimyidae (Lara *et al.*, 1996). Por ser um gênero extremamente diverso, inclusive no nível populacional, a taxonomia do gênero se tornou extremamente confusa (Lara; Patton, 2000). O clado 1 é formado por espécies cujas populações estão distribuídas ao longo das margens costeiras da região Sudeste do Brasil (*Trinomys iheringi*, *T. dimidiatus*, *T. mirapitanga*, *T. graciosus graciosus* e *T. g. bonafidei*; Lara; Patton, 2000). Dentre as espécies constituintes do clado 1, estão as espécies irmãs *Trinomys iheringi* (Thomas, 1911) e *Trinomys dimidiatus* (Günther,

1876), que apresentam aspectos morfológicos muito semelhantes e difíceis de distinguir (Moojen, 1948).

1.2. *Trinomys dimidiatus* x *Trinomys iheringi*

Trinomys dimidiatus (Günther, 1876) (Figura 6A) e *T. iheringi* (Thomas, 1911) (Figura 6B) são espécies irmãs que divergiram há cerca de pouco mais de 6 milhões de anos (Lara; Patton, 2000; Tavares *et al.*, 2016). Possuem morfologia extremamente semelhante, principalmente a morfologia craniana e bacular (Iack-Ximenes, 2005). Ambas as espécies se caracterizam por apresentar eixo do báculo reto, forma da porção proximal do báculo ovalado/arredondado e pela forma do forâmen incisivo ovalado (Iack- Ximenes, 2005). *T. iheringi* pode ser diferenciado de *T. dimidiatus* por apresentar a pelagem mais escura e espinhosa, rostro mais alongado e delgado, pelo seu processo orbital que nunca se projeta tão anteriormente, e pela dobra formada entre o ectotimpânico e o mastoide (Iack-Ximenes, 2005). Além disso, apresentam cariótipos que diferenciam bem ambas as espécies (Pêssoa *et al.*, 2015) - *T. dimidiatus* apresenta $2n= 60$ e $FN= 116$ (Pêssoa *et al.*, 2005); e *T. iheringi* $2n=61-65$ e $FN= 116$ (Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1985; Fagundes *et al.*, 2004). As semelhanças morfológicas tornam extremamente difícil distinguir esses dois táxons (Moojen, 1948; Iack-Ximenes, 2005), principalmente em estudos de Ecologia, quando a identificação ocorre em campo, com os espécimes vivos. A cor e o aspecto da pelagem são as características mais fáceis de se utilizar a fim de identificar ambas as espécies em campo, mas possuem problemas quando espécimes jovens são capturados.

Trinomys dimidiatus é uma espécie monotípica, com localidade tipo fixada no Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, e sua distribuição compreende o Estado do Rio de Janeiro indo até a costa norte do Estado de São Paulo (Attias *et al.*, 2009; Pêssoa *et al.*, 2015). Sua espécie irmã *Trinomys iheringi*, também é uma espécie monotípica, cuja localidade tipo está fixada na Ilha de São Sebastião, no Estado de São Paulo. A distribuição da espécie se restringe à região costeira, se estendendo do Rio de Janeiro (Ilha Grande) a São Paulo (Attias *et al.*, 2009; Pêssoa *et al.*, 2015). As duas espécies apresentam sobreposição em sua distribuição, ambas com ocorrência na faixa costeira correspondente à região da Serra do Mar, ocorrendo de maneira simpátrica na fronteira entre os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Attias *et al.*, 2009; Pêssoa *et al.*, 2015).

A



B



Figura 6A: *Trinomys dimidiatus*. Figura 6B: *Trinomys iheringi*. Fotos cedidas por Yan Gabriel Ramos e Ana Carolina Lacerda, respectivamente.

1.3. Identificação molecular e investigação da existência de híbridos

Uma identificação correta das espécies é indispensável para elaborar estudos de forma consistente, e exige conhecimento amplo sobre aspectos morfológicos. Entretanto, muitas vezes a identificação das espécies é feita de maneira equivocada, ora por falta de conhecimento, ora pela impossibilidade de aprofundar-se nos estudos dos caracteres diagnósticos devido aos métodos utilizados em determinados estudos (p. ex. estudos de captura-marcação-recaptura). Arelado a isso, têm-se a dificuldade em diferenciar espécies cuja morfologia é muito semelhante, especialmente em estágios iniciais de vida (Harvey *et al.*, 2003), ou ainda a diferenciação entre espécies crípticas (Archana *et al.*, 2016; Madeira *et al.*, 2016).

Neste aspecto, torna-se necessária a utilização de métodos precisos e eficazes no processo de identificação. Análises a partir de sequências de ADN têm sido empregadas com o objetivo de identificar perfis genéticos nos mais variados táxons (Kanthaswamy, 2015), sendo comumente utilizadas para identificação de espécies de diversos grupos taxonômicos (Desmyter; Gosselin, 2009). A utilização da identificação molecular é especialmente relevante neste aspecto, já que as técnicas de identificação por ADN são de fácil interpretação (Wells; Stevens, 2008; Oliveira *et al.*, 2016). Em espécies de mamíferos, marcadores mitocondriais, tais como citocromo b (cit b) e citocromo C oxidase I (COI) têm sido amplamente empregados para identificar e catalogar espécies, mostrando-se muito eficientes (Hajibabaei *et al.*, 2007). Porém, marcadores mitocondriais têm eficiência limitada quando há

hibridação, pois, o ADN mitocondrial é herdado de forma matrilinear e, portanto, incapaz de detectar indivíduos híbridos.

A hibridação ocorre geralmente em regiões estreitas, onde populações de espécies distintas cruzam gerando descendentes híbridos (Avice, 2004). O fenômeno torna-se mais recorrente em localidades onde as densidades populacionais são baixas e não há pressão seletiva contra as variantes híbridas (Harrison, 1993; Futuyma; Shapiro, 1995; Randler, 2002). Essas regiões denominam-se zonas de hibridação (Harrison, 1993; Futuyma; Shapiro, 1995).

Os híbridos têm ganhado bastante atenção, pois podem ser considerados como potencial biológico criativo, gerando novas variáveis, ou ainda serem considerados um fator importante para a perda da variabilidade genética (Harrison, 1993; Allendorf *et al.*, 2001; Avice, 2004). O processo também é de suma importância para elucidar questões taxonômicas, além de levar a grandes prejuízos para espécies raras e ameaçadas, principalmente quando estas entram em contato com espécies exóticas invasoras, tendo grandes implicações para a conservação (Avice, 2004; Parham *et al.*, 2013).

O processo de hibridação de espécies é conhecido para diversos gêneros de roedores, como por exemplo para *Ctenomys* (Gava; Freitas, 2003), *Akodon* (Roldán *et al.*, 1984) e *Rhipidomys* (Carvalho *et al.*, 2009). Diversos marcadores têm sido empregados para estudos de hibridação, principalmente marcadores nucleares, por serem de herança biparental, tornando a identificação de híbridos mais fácil, principalmente considerando zonas de hibridação atuais (Beaumont *et al.*, 2001).

A existência de híbridos tende a ser um fator complicador no processo de identificação, visto que algumas espécies tendem a apresentar características inerentes de ambas as espécies que lhe deram origem (Campton, 1987; Harrison, 1993), ou ainda serem morfologicamente crípticos (Allendorf, *et al.*, 2001). Torna-se importante identificar a presença de híbridos a fim de assegurar que a classificação taxonômica seja empregada de forma adequada. Outro aspecto fundamental é a identificação de possíveis sinais de introgressão genética. Este fenômeno que consiste na passagem de genes de uma determinada espécie para outra espécie através do cruzamento de uma variável híbrida e de sua espécie parietal, pode ocasionar, ao longo de algumas gerações a presença de populações formadas exclusivamente por variáveis de híbridos, podendo acarretar na extinção das espécies parietais, podendo ocasionar desequilíbrio ao meio ambiente (Harrison 1993; Allendorf, *et al.*, 2001).

1.4. *Trinomys* e sua relação com a Ilha Grande

A distribuição real das espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi* é incerta (Nacif *et al.*, 2015). Além disso, há dúvida sobre qual dessas espécies, ou ainda se ambas, estão presentes na localidade de Ilha Grande, Angra dos Reis – Rio de Janeiro. Outro questionamento é se a localidade pode ser uma possível zona de hibridação para as duas espécies.

A Ilha Grande, pertencente ao município de Angra dos Reis, é uma ilha continental associada à Serra do Mar no Estado do Rio de Janeiro (Gama *et al.*, 2009), cuja separação do continente ocorreu recentemente, há cerca de 5100 anos (Mahiques, 1987). A ilha possui uma extensão de 19300 ha e é pertencente ao município de Angra dos Reis (Alves, 2017). É caracterizada pela temperatura média anual de 22,5°C (Bittencourt; Rocha, 2002) e uma média anual de precipitação de 2200 mm (Rocha-Pessôa; Rocha, 2008). Sua vegetação é formada por área de Floresta Ombrófila densa, restinga e manguezais (Alho *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2008). A região engloba o Parque Nacional da Ilha Grande, criado em 1971 (Decreto Estadual nº 15.273 / 1971), porém foi muito afetada por atividades agrícolas, antes da classificação da área como Unidade de Conservação. Por este motivo, a ilha apresenta sua vegetação em diferentes estágios de regeneração (Alho *et al.*, 2002).

Um estudo de modelagem de distribuição potencial indicou que a área poderia ter duas espécies do gênero *Trinomys* (*T. dimidiatus* e *T. iheringi*), onde ambas as espécies ocorreriam em simpatia (Attias *et al.*, 2009). A potencial distribuição de ambas as espécies na localidade, somada aos estudos publicados na literatura, aumentam ainda mais a dúvida sobre qual (ais) espécie (s) estão presentes na ilha.

Diversos trabalhos foram publicados com *Trinomys* na Ilha Grande, tratando dos mais diversificados assuntos. Embora Attias e colaboradores (2009) através da modelagem de distribuição tenham verificado a possibilidade de ambas as espécies estarem presentes na ilha, todos os estudos realizados na área, sejam anteriores a este, ou posteriores, só registram a ocorrência de uma das espécies na ilha, não havendo consenso sobre qual das espécies está presente. Estudos anteriores a Attias e colaboradores (2009) descrevem a interação de espécies de ácaros com a espécie *T. dimidiatus* (Martins-Hatano *et al.*, 2002; Gettinger; Bergallo, 2003) e de artrópodes ectoparasitas com espécies de mamíferos, incluindo *T. dimidiatus* (Esbérard *et al.*, 2005).

Além disso, em estudo realizado após o de Attias e colaboradores (2009), Mello e colaboradores (2015), também classificaram a espécie presente na Ilha Grande como *T.*

dimidiatus. Neste estudo, eles modelam a capacidade suporte da espécie em relação a variação da abundância de jaqueiras na Ilha Grande.

Outros estudos classificam a espécie encontrada na Ilha como *T. iheringi*. Em estudo anterior ao de Attias e colaboradores (2009), Bittencourt e Rocha (2002) estudaram a fauna de ectoparasitos e besouros associados a fauna de quatro espécies de mamíferos, incluindo *T. iheringi*. Nacif e colaboradores (2015), realizaram estudo citogenético de espécimes provenientes da localidade identificando todos como *T. iheringi*. A maioria dos trabalhos realizados na localidade classificam a espécie presente na ilha como *T. dimidiatus*, entretanto nenhum trabalho realizado até o presente momento reporta a existência de ambas as espécies em simpatria na ilha. A dificuldade de diferenciar as duas espécies, principalmente em trabalhos de captura-marcação-recaptura pode gerar problemas taxonômicos, que ainda podem ser aumentados pela possível existência de híbridos na localidade. Sendo assim, torna-se importante investigar a identidade taxonômica de *Trinomys* e a possibilidade da ocorrência de hibridação entre as duas espécies na Ilha Grande. Para isso, utilizaram-se sequências de marcadores nuclear (exon 28 do gene que codifica o fator von Willebrand) e mitocondrial (citocromo b) a fim de identificar a espécie do gênero *Trinomys* presente em Ilha Grande, além de investigar a possibilidade da existência de híbridos, ainda não investigada para as espécies aqui citadas.

2) OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar geneticamente os espécimes coletados na localidade de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ e investigar se há hibridização entre as espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar geneticamente a (s) espécie (s) do gênero *Trinomys* presentes na localidade Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, a partir de sequências do gene mitocondrial citocromo b.
- Investigar se há evidência de cruzamento interespecífico entre as duas espécies do gênero *Trinomys*, *T. dimidiatus* e *T. iheringi*, utilizando a região do exon 28 do gene nuclear que codifica o fator von Willebrand (vWF).
- Investigar se há evidência de introgressão genética nos espécimes analisados utilizando a região do exon 28 do gene nuclear que codifica o fator von Willebrand (vWF).

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de amostras

Vinte amostras de tecido (equivalente a vinte espécimes) foram obtidas a partir de biopsia de orelha, após a coleta dos espécimes através de procedimento de captura-marcação-recaptura. As coletas foram realizadas na localidade de Ilha Grande, no município de Angra dos Reis no Estado do Rio de Janeiro (Figura 7A), utilizando metodologia RAPELD (Magnusson, *et al.*, 2005). Todos os espécimes foram coletados no lado leste da ilha (Módulo Leste) (Figura 7B). O módulo possui 10 parcelas de 250 × 1,5 m, colocadas a pelo menos 1 km de distância, com trilhas de 5 km de comprimento. Cada parcela se estende a uma mesma curva de nível, e as altitudes variam de 500 a 4500m.

As coletas são realizadas desde 2013 pelo Laboratório de Ecologia de Mamíferos - UERJ, que realiza um monitoramento de longo prazo na localidade. As coletas são feitas semestralmente, abrangendo as estações seca (abril a julho) e chuvosa (agosto a março). Após a coleta o material foi acondicionado em álcool absoluto e armazenado em congelador a -20°C até que fosse utilizado.

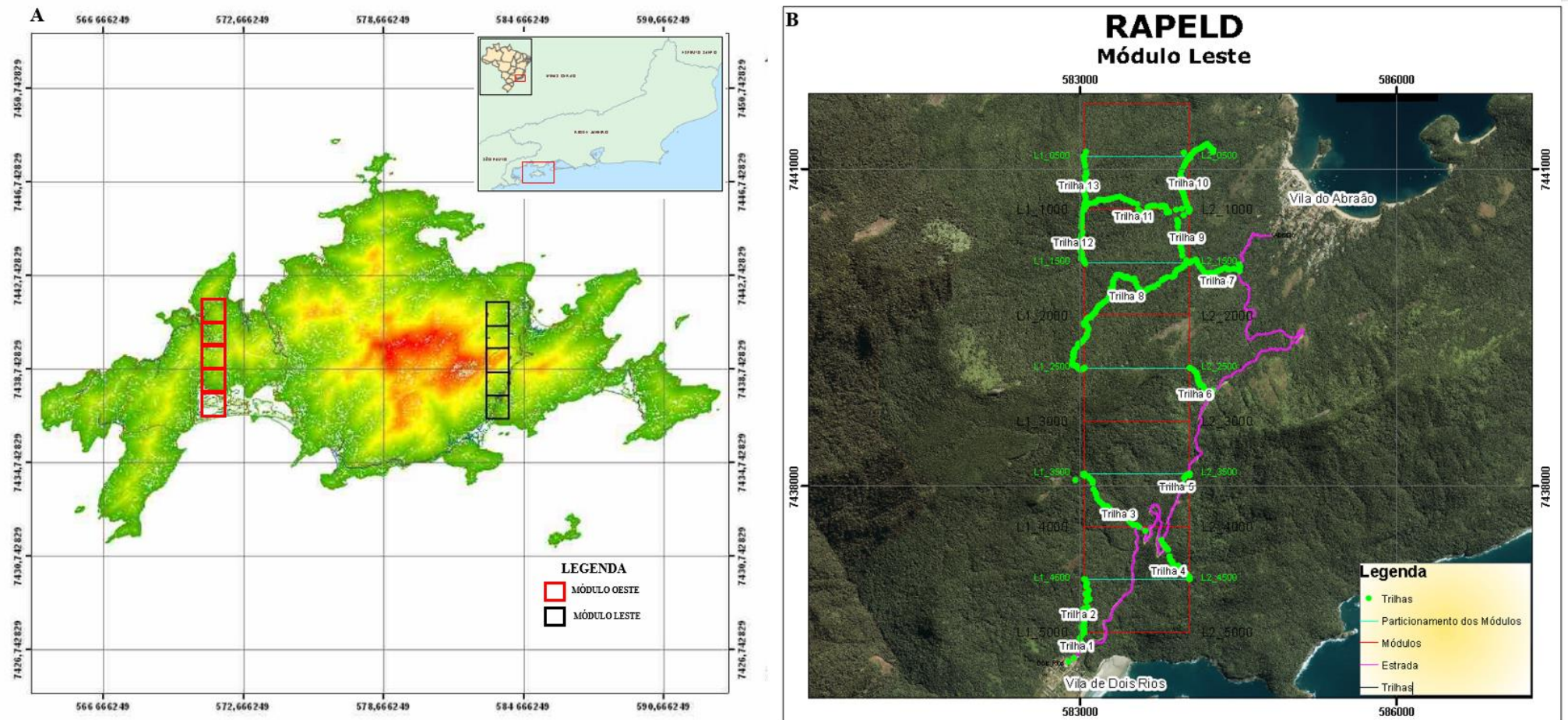


Figura 7A: Mapa altimétrico da Ilha Grande evidenciando a localização da Ilha Grande e os dois módulos do RAPELD; Figura 7B: Módulo Leste do RAPELD implementado na Ilha Grande contendo os respectivos pontos de coleta do presente estudo. Mapas retirados e modificados do site: <http://www.rapeld-igrande.uerj>

3.2. Extração de ADN, amplificação e sequenciamento

A extração de ADN dos tecidos dos 20 espécimes obtidos no presente trabalho foi realizada seguindo protocolo de extração salina (Aljanabi; Martinez, 1997; vide capítulo anterior). O sucesso da extração foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X. Para visualização das amostras, as mesmas foram coradas com Safer (Kasvi) e visualizadas sob luz azul. A quantificação da concentração de ADN foi realizada utilizando o marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Fermentas Life Sciences). Após serem quantificadas, todas as amostras foram normalizadas a 20ng/μL e acondicionadas à -20°C até serem utilizadas

Os fragmentos alvo deste trabalho foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction – PCR*). A amplificação do gene cit b foi realizada seguindo as condições anteriormente descritas no capítulo 1 desta dissertação. Para a amplificação do gene vWF a *PCR* foi realizada utilizando um par de iniciadores universais da região flanqueadora V10 e W13 (Tabela 11), com temperatura de anelamento de 55°C (Agrizzi, 2013). Esses flanqueadores possibilitaram à amplificação parcial do gene (493pb).

Tabela 12: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parciais dos genes do cit b (803pb) e vWF (493pb). R = purina (A/G) e Y= pirimidina (C/T)

Nome	Sequência	Biblioteca de referência
MVZ05	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	da Silva e Patton, 1993
MVZ16	5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'	da Silva e Patton, 1993
V10	5'-TTAGTGCTACCACCCCATACCTGGAAG-3'	Galewski <i>et al</i> , 2005
W13	5'-GGCCCGATGCCCACTGGCATCA-3'	Galewski <i>et al</i> , 2005

As reações de *PCR* foram realizadas em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems), com volume final de 20 μL. Para realização foram adicionados 2 μL de tampão 10X, 0,8 μL de MgCl₂ (50mM), 0,4 μL de solução de dNTP (10mM por nucleotídeo), 0,5 μL de cada primer (10mM), 0,5 μL de Taq Platinum (Invitrogen Corporation) totalizando 2,5 U por reação, e 1 μL de DNA (20ng/ μL). As condições de reação foram as mesmas utilizadas por Agrizzi (2013) sendo: um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos; seguidos de 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45 segundos na temperatura de anelamento específica para cada

marcador, sendo de 48°C e 55°C respectivamente para cit b e vWF, 72°C por 1 minuto e 15 segundos; e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Após *PCR*, os produtos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 1X, corado com o corante Safer® (Kasvi) e visualizados sob luz azul, a fim de confirmar o sucesso da amplificação, o tamanho dos fragmentos de ADN e a ausência de contaminação, utilizando o marcador de peso molecular Generuler 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Em seguida os produtos foram purificados com a enzima ExoSAP (GE Healthcare Life Sciences), sendo incubados a 37°C por 30 minutos e em sequência a 80°C por 15 minutos.

A posteriori foram realizadas reações de pré-sequenciamento, utilizando os mesmos iniciadores utilizados nas reações de *PCR*. Para cada amostra, foram realizadas duas reações de pré-sequenciamento (uma para o iniciador *forward* e outra para o iniciador *reverse*). Para isso foram utilizados 3,2pmol/ µL de iniciador, 3,5 µL de produto de *PCR* purificado, 1 µL de *BigDye* e 1,5 µL de tampão do kit (*ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems), completando com água purificada pelo sistema Milli-Q (modelo Direct-Q™, Millipore) até que fosse obtido 10 µL de volume final. A ciclagem utilizada no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) foi: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, repetindo-se este ciclo por 40 vezes.

Os produtos da reação de pré-sequenciamento foram precipitados com utilização de colunas com resina do tipo Sephadex do kit de purificação de colunas Amersham (GE Healthcare®). O método de utilização das colunas está descrito no Anexo I. Após precipitação, as amostras foram ressuspensas em 12 µL de formamida Hi-Di e sequenciadas no sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies) no Laboratório de Diagnóstico por DNA/UERJ.

3.3. Alinhamento das sequências

As sequências foram editadas manualmente no programa Geneious 4.8.2 (Biomatters) e os *contigs* foram montados a partir da junção das duas sequências obtidas através dos diferentes iniciadores, *forward* e *reverse*. As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Ao contrário do que acontece com o gene cit b, que apresenta herança uniparental (no caso dos mamíferos estritamente materna) o gene vWF é um gene nuclear, apresentando herança biparental, e conseqüentemente pode apresentar espécimes

heterozigotos. Entretanto, nenhum dos espécimes analisados no presente estudo é heterozigoto.

3.4. Identificação molecular e verificação de hibridização

Os espécimes foram identificados de forma preliminar através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), que consiste na busca e localização de regiões de similaridade local entre as sequências. O algoritmo do programa compara as sequências nucleotídicas inseridas com as contidas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - GenBank), calculando a significância estatística da atribuição da sequência a uma espécie alvo, cuja sequência fora inserida anteriormente na base de dados do NCBI (Johnson *et al.*, 2008). Os espécimes foram assim identificados geneticamente usando ambos os marcadores, cit b e vWF.

A posteriori, foi realizado novo alinhamento no programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), novamente utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), implementado no programa, desta vez utilizando não só as sequências geradas no presente estudo, mas também as sequências provenientes do GenBank (Tabela 13), a fim de comparar as sequências, identificar os sítios diagnósticos evidenciados para cada uma das espécies (Tabelas 14 e 15), e confirmar a identificação realizada através da ferramenta BLAST. O tamanho dos fragmentos utilizados para identificação e verificação dos sítios diagnósticos então sofreu uma redução passando para 798pb para cit b - do nucleotídeo 1 ao 798 (Smith; Patton, 1991) - e 175pb para o gene vWF - do nucleotídeo 309 ao 537 (Galewski *et al.*, 2005). Tal diminuição se deu pelo fato de serem consideradas para tais análises apenas as regiões homólogas entre as duas espécies, tendo como base sequências provenientes do GenBank (Tabela 13).

A partir da análise dos sítios polimórficos do marcador vWF (Tabela 14) foi investigada a possível existência de híbridos, comparando as sequências geradas no presente trabalho com as sequências retiradas do GenBank tanto de *Trinomys iheringi*, como de *T. dimidiatus*.

Tabela 13: Sequências de citocromo b e vWF de espécimes de *T. dimidiatus* e *T. iheringi* obtidas no GenBank, com seus respectivos números de acesso.

Acesso GenBank		Espécie
cit b	vWF	
U35170	KJ742620	<i>Trinomys dimidiatus</i>
U35168		<i>Trinomys dimidiatus</i>
U35169		<i>Trinomys dimidiatus</i>
U35170		<i>Trinomys dimidiatus</i>
EU544664	KF590677	<i>Trinomys iheringi</i>
EU313254		<i>Trinomys iheringi</i>
EU313255		<i>Trinomys iheringi</i>
KU892762		<i>Trinomys iheringi</i>

Tabela 14: Sítios diagnósticos do marcador nuclear vWF, analisados para identificação das espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi*

Espécie	Posição								
	11	68	71	75	90	94	98	119	166
<i>T. dimidiatus</i>	T	G	T	C	G	A	T	C	A
<i>T. iheringi</i>	C	A	C	A	A	G	C	T	C

Tabela 15: Sítios diagnósticos do marcador mitocondrial cit b, analisados para identificação das espécies *Trinomys dimidiatus* e *T. iheringi*

Espécie	Posição																				
	18	24	33	67	123	151	162	186	192	198	204	207	216	222	252	273	277	279	282	294	309
<i>T.dimidiatus</i>	A	C	T	A	C	C	C	C	G	C	C	T	C	C	T	C	T	C	A	T	C
<i>T.iheringi</i>	G	T	C	G	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	C	T	C	T	T	C	T

Espécie	Posição																				
	312	345	351	358	360	363	364	375	381	396	402	438	450	465	473	475	477	483	489	490	513
<i>T.dimidiatus</i>	C	T	T	T	G	T	T	C	C	T	C	T	C	C	A	C	C	A	A	G	C
<i>T.iheringi</i>	T	C	A	C	A	C	C	T	A	C	T	C	T	T	C	A	T	T	G	A	T

Espécie	Posição																					
	541	549	567	575	578	600	603	639	642	648	669	678	713	714	715	718	729	745	753	769	774	780
<i>T.dimidiatus</i>	T	C	C	T	T	C	C	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	A	G	T	C	C
<i>T.iheringi</i>	C	T	T	C	C	T	T	A	C	C	C	T	T	A	T	T	T	C	A	A	T	T

3.5. Diversidade Molecular

Os haplótipos foram identificados no programa DnaSP 5.1 (Librado; Rosas, 2009), que também foi utilizado para calcular o número de sítios polimórficos (S), o número de haplótipos observados (K) e os índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), assim como seus respectivos desvios (SD). A divergência média total (distância p) foi estimada no programa Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

4) RESULTADOS

4.1. Identificação molecular e verificação de hibridização

Conforme esperado, os genes citocromo b e vWF permitiram a identificação molecular dos espécimes da Ilha Grande, assim como a investigação da existência de híbridos. Todas as sequências geradas no presente estudo, provenientes da localidade Ilha Grande, foram identificadas sem ambiguidade como *T. iheringi*. Não houve híbridos identificados através dos sítios diagnósticos do gene vWF.

4.2. Diversidade Molecular

4.2.1. Citocromo b

Foi obtido um total de 20 sequências parciais de cit b provenientes da localidade de Ilha Grande, RJ. O fragmento analisado corresponde aos nucleotídeos 0 a 803 do gene de citocromo b, em relação ao gene completo (Smith; Patton, 1993).

A partir das 20 sequências analisadas de *T. iheringi* foram identificados quatro haplótipos do gene do citocromo b, com cinco sítios polimórficos (de um total de 803pb), dos quais três sítios são informativos para parcimônia e dois sítios são *singletons*. A diversidade nucleotídica (π) foi de 0,00215 (dp=0,00027), e haplotípica (h) foi de 0,6 (dp=0,077). A diversidade média total (distância p) foi de 0,002.

4.2.2. vWF

Do gene de vWF foram obtidas 20 sequências parciais provenientes da localidade de Ilha Grande, RJ. Esse fragmento corresponde a parte do exon 28 do gene que codifica o fator von Willebrand, do nucleotídeo 44 ao 537, em relação ao gene completo (Galewski *et al*, 2005).

As 20 sequências do gene vWF de *T. iheringi* pertenciam a um mesmo haplótipo, impossibilitando as análises de diversidade molecular do gene.

5) DISCUSSÃO

Os marcadores utilizados no presente estudo se mostraram eficientes para identificação das espécies do gênero *Trinomys*. O fragmento do gene mitocondrial cit b foi eficiente na separação das duas espécies, apresentando 64 sítios diagnósticos, que correspondem a 8% do tamanho total das sequências obtidas para cit b. O gene nuclear vWF também teve êxito na identificação de ambas as espécies, apresentando 11 sítios diagnósticos (2,5% do total) além de possuir um haplótipo fixado para a espécie *T. iheringi* na Ilha Grande. O número maior de sítios diagnósticos (considerando o percentual) pode ser decorrente da taxa de evolução do gene mitocondrial ser mais alta quando comparada a um exon nuclear, como o vWF (Avice, 2004).

Não foi verificado nenhum indício de hibridação, nem de introgressão genética entre *Trinomys iheringi* e *Trinomys dimidiatus* na Ilha Grande. Sendo assim, é extremamente improvável que a Ilha Grande seja uma zona de hibridação entre as duas espécies.

A identificação molecular mostrou que a espécie presente na Ilha Grande, pelo menos no lado leste, é *T. iheringi* e não *T. dimidiatus* como a maioria dos trabalhos publicados na localidade considera (e.g. Martins-Hatano *et al*, 2002; Gettinger e Berrgallo, 2003; Esbérard *et al*, 2005; Mello *et al*, 2015), corroborando a classificação utilizada no estudo ecológico de Bittencourt e Rocha (2002), e no estudo citogenético de Nacif e colaboradores (2015). Entretanto, a presença de *T. dimidiatus* não pode ser totalmente descartada na Ilha Grande, já que os estudos realizados até então não abrangem o lado oeste da ilha.

A identificação errada das espécies em campo ocasionou erros em cascata, tais como nos registros de interações parasita-hospedeiro. Por exemplo, Martins-Hatano e colaboradores (2002) atribuíram *T. dimidiatus* como hospedeiro de acáros da família Laelapidae na Ilha Grande, quando o hospedeiro na verdade era sua espécie irmã *T. iheringi*. Da mesma forma, novas espécies da família Laelapidae na Ilha Grande foram relacionadas ao hospedeiro incorreto por Gettinger e Bergallo (2003). Em estudo experimental realizado por Esbérard e colaboradores (2005) há atribuição errônea da preferência de artrópodes parasitas em relação a espécie *T. dimidiatus*.

Além das relações incorretas entre parasita-hospedeiro, Mello e colaboradores (2015) inferiram a resposta de *T. dimidiatus* à variação de abundância da jaqueira *Artocarpus heterophyllus*. Neste estudo, os autores modelam a capacidade suporte de *T. dimidiatus* em áreas com abundâncias diferentes de jaqueira. Embora tenham hábitos semelhantes, e talvez possam apresentar respostas parecidas, essa relação foi modelada para populações de *T. iheringi* e não para *T. dimidiatus*.

Tais comparações e atribuições equivocadas foram causadas por erros na identificação dos espécimes no campo, e denotam a importância de uma classificação taxonômica correta. Esses erros foram causados pela impossibilidade de examinar mais a fundo a anatomia do animal em campo, o que seria fundamental para espécimes cuja morfologia é muito semelhante;; e pela dificuldade de a identificação de espécimes juvenis, que podem não apresentar características importantes na distinção de espécies próximas.

Em casos como o de *Trinomys* na Ilha Grande, em que as duas espécies com distribuição potencial para a localidade são difíceis de distinguir no campo, torna-se necessário o uso de metodologias alternativas, tal como o uso de marcadores moleculares para a identificação destas espécies. A identificação molecular pode minimizar a chance de falha recorrente na classificação taxonômica, principalmente quando há possibilidade de sequenciar espécimes *voucher* de cada espécie, identificados por um especialista. Este é o caso das duas espécies do presente estudo, cujas sequências já estavam depositadas no GenBank e foram geradas através de espécimes testemunho, identificadas anteriormente através de sua morfologia (Lara *et al.*, 1996; Lara; Patton, 2000). Estudos como este, e o de Nacif e colaboradores (2015) servem como subsídio para minimizar os erros taxonômicos, já que fornecem informações importantes e de fácil interpretação para separação e identificação correta das espécies. As consequências geradas por erros taxonômicos podem ser muito maiores do que as mencionadas aqui. Informações equivocadas podem levar à um manejo

indevido de recursos naturais, causando problemas graves para a conservação de diversas espécies e conseqüentemente para o meio ambiente e a biodiversidade.

6) CONCLUSÕES

1. Tanto o marcador mitocondrial do gene do citocromo b quanto o marcador nuclear vWF se mostraram eficientes na identificação molecular de espécies do gênero *Trinomys*, sendo uma ferramenta auxiliar útil para identificação dos espécimes, principalmente em estudos ecológicos, onde se trabalha com os espécimes vivos.

2. Todos os indivíduos analisados (N = 20) foram identificados molecularmente como *Trinomys iheringi*.

3. Não foi constatada a presença de híbridos na localidade Ilha Grande, possivelmente pelo fato de existir apenas uma espécie de *Trinomys* no lado leste da Ilha Grande (*T. iheringi*).

4. Há uma necessidade de estudos parecidos no lado oeste da Ilha, a fim de descartar possíveis erros de identificação, e para entender melhor a distribuição das espécies no gênero.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIZZI, J. (2013). Filogeografia comparada de espécies de *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae) na região central da Mata Atlântica. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.
- ALHO, C. J. R.; SCHNEIDER, M.; VASCONCELLOS, L. A. (2002). Degree of threat to the biological diversity in the Ilha Grande State Park (RJ) and guidelines for conservation. *Brazilian Journal of Biology*, 62(3), 375-385.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693.
- ALLENDORF, F. W.; LEARY, R. F.; SPRUELL, P.; WENBURG, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in ecology & evolution*, 16(11), 613-622
- ALVES, M. A. S.; VECCHI, M. B.; VALLEJOS, L. M.; DE ABREU RIBEIRO, E.; MARTINS-SILVA, J.; SAINT CLAIR, R. D. S. A. (2017). New records of bird species from Ilha Grande, state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Check List*, 12(6).
- ARCHANA, M.; D’SOUZA, P. E.; OJHA, R.; JALALI, S. K. (2016). DNA barcoding of flies commonly prevalent in poultry farms of Bengaluru District. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(4), 228-233.
- ATTIAS, N.; RAÍCES, D. S.; PESSOA, F. S.; ALBUQUERQUE, H.; JORDÃO-NOGUEIRA, T.; MODESTO, T. C.; BERGALLO, H. D. G. (2009). Potential distribution and new records of *Trinomys* species (Rodentia: Echimyidae) in the state of Rio de Janeiro. *Zoologia (Curitiba)*, 26(2), 305-315.
- AVISE, J. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. 2a ed. Sinauer Press. 541 p.
- BEAUMONT, M.; BARRATT, E. M.; GOTTELLI, D.; KITCHENER, A. C.; DANIELS, M. J.; PRITCHARD, J. K.; BRUFORD, M. W. (2001). Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular ecology*, 10(2), 319-336

BITTENCOURT, E. B.; ROCHA, C. D. (2002). Spatial use of rodents (Rodentia: Mammalia) host body surface by ectoparasites. *Brazilian Journal of Biology*, 62(3), 419-425.

CAMPTON, D. E. (1987). Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. *Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, 161-192.

CARVALHO, A. H. (2009). Caracterização citogenética de espécies de *Rhipidomys* (Cricetidae, Rodentia) de Minas Gerais. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

DESMYTER, S.; GOSSELIN, M. (2009). COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), 89-95

ESBÉRARD, C. E.; MARTINS-HATANO, F.; BITTENCOURT, E. B.; BOSSI, D. E.; FONTES, A.; LARESCHI, M.; MENEZES, V.; BERGALLO, H.G.; GETTINGER, D. (2005). A method for testing the host specificity of ectoparasites: give them the opportunity to choose. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 761-764.

FAGUNDES, V.; CAMACHO, J. P. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. (2004). Are the dot-like chromosomes in *Trinomys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) B chromosomes? *Cytogenetic and genome research*, 106(2-4), 159-164

FUTUYMA, D. J.; SHAPIRO, L. H. (1995). Hybrid Zones and the Evolutionary Process. *Evolution*, 49(1), 222-227.

GALEWSKI, T.; MAUFFREY, J. F.; LEITE Y. L. R.; PATTON J. L.; DOUZERY, E. J. P. (2005). Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 601–615.

GAMA, S. V. G.; SILVA, L. G. A. E; SALGADO, C. M. (2009). Geologia, Relevo e solos. O Ambiente da Ilha Grande. Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

- GAVA, A.; FREITAS, T. R. (2003). Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (Ctenomys) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica*, 119(1), 11-17
- GETTINGER, D.; BERGALLO, H. G. (2003). A New Species of Laelapine Mite (Acari: Parasitiformes: Laelapidae) Associated with *Proechimys dimidiatus* in the Atlantic Forests of Brazil. *Journal of Parasitology*, 89(4), 705-708
- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A.; CLARE, E. L.; HERBERT, P. D. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC biology*, 5(1), 24.
- HARRISON, R. G. (Ed.). (1993). Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press on Demand.
- HARVEY, M. L.; MANSELL, M. W.; VILLET, M. H.; DADOUR, I. R. (2003). Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Medical and veterinary entomology*, 17(4), 363-369
- IACK-XIMENES, G. E. (2005). Revisão de *Trinomys* Thomas, 1921 (Rodentia: Echimyidae). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- KANTHASWAMY, S. (2015). domestic animal forensic genetics–biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. *Animal genetics*, 46(5), 473-484.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- LARA, M. C.; PATTON, J. L. (2000). Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys* Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 130, 661-686.
- LARA, M. C.; PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F. (1996). The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 403-413.

LEITE, Y. L. R.; PATTON, J. L. (2002). Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 455-464.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

LOSS, A. C. Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica. 2014. 139f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2014.

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

MADEIRA, T.; SOUZA, C. M.; CORDEIRO, J.; THYSSEN, P. J. (2016). The use of DNA barcode for identifying species of *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary survey. *Acta tropica*, 161, 73-78

MAGNUSSON, W. E.; LIMA, A. P.; LUIZÃO, R.; LUIZÃO, F.; COSTA, F. R.; CASTILHO, C. V. D.; KINUPP, V. F. (2005). RAPELD: a modification of the Gentry method for biodiversity surveys in long-term ecological research sites. *Biota neotropica*, 5(2), 19-24

MAHIQUES, M. M. D. (1987). Considerações sobre os sedimentos se superfície de fundo da Abaia da Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. 63f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) –Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTINS-HATANO, F.; GETTINGER, D.; BERGALLO, H. G. (2002). Ecology and host specificity of laelapine mites (Acari: Laelapidae) of small mammals in an Atlantic Forest area of Brazil. *Journal of Parasitology*, 88(1), 36-40.

MCKENNA, M. C.; BELL, S. K. (1997). Classification of mammals: above the species level. Columbia University Press.

MELLO, J. H. F.; MOULTON, T. P.; RAÍCES, D. S. L.; BERGALLO, H. G. (2015). About rats and jackfruit trees: modeling the carrying capacity of a Brazilian Atlantic Forest spiny-rat *Trinomys dimidiatus* (Günther, 1877)–Rodentia, Echimyidae–population with varying jackfruit tree (*Artocarpus heterophyllus* L.) abundances. *Brazilian Journal of Biology*, 75(1), 208-215.

MOOJEN, J. (1948). Speciation in the Brazilian spiny rats (genus *Proechimys*, family Echimyidae). *University of Kansas Publications*, 1: 301-406.

NACIF, C. A.; PESSÔA, L. M.; BONVINCINO, C.; LAZAR, A. (2015). O cariótipo de *Trinomys iheringi* da Ilha Grande e análises cariotípicas de três outras espécies de *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae) com distribuição no estado do Rio de Janeiro. In: In: Congresso Brasileiro de Mastozoologia, 8, 2015, João Pessoa. Resumos do 8º Congresso Brasileiro de Mastozoologia, 2015. 17-18.

OLIVEIRA, P. V.; MATOS, N. S.; KLIPPEL, A. H.; OLIVEIRA-COSTA, J.; CARETA, F. D. P.; PANETO, G. G. (2017). Using DNA barcodes to identify forensically important species of Diptera in Espírito Santo State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.

PARHAM, J. F.; PAPENFUSS, T. J.; VAN DIJK, P. P.; WILSON, B. S.; MARTE, C.; SCHETTINO, L. R.; SIMISON, W. B. (2013). Genetic introgression and hybridization in Antillean freshwater turtles (*Trachemys*) revealed by coalescent analyses of mitochondrial and cloned nuclear markers. *Molecular phylogenetics and evolution*, 67(1), 176-187.

PESSOA, L. M.; CORRÊA, M.; BITTENCOURT, E.; REIS, S. (2005). Chromosomal characterization of taxa of the genus *Trinomys* Thomas, 1921 (Rodentia, Echimyidae) in the states of Rio de Janeiro and São Paulo. *Arquivos do Museu Nacional*, 63(1), 161-168.

PESSÔA, L. M.; TAVARES, W. C., OLIVEIRA; J. A.; PATTON, J. L. (2015) Genus *Trinomys* Thomas, 1921. *Mammals of South America*. Vol. 2. Rodents. University of Chicago Press, Chicago.

RANDLER, C. (2002). Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Animal behaviour*, 63(1), 103-119.

ROCHA-PESSÔA, T. C.; ROCHA, C. F. D. (2008). Reproductive cycle of *Pitcairnia flammae* Lindl. (Bromeliaceae/Pitcairnioideae) in an insular Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(3), 229-233.

ROLDÁN, E. S.; ACUFIA, A. M.; VERCELLINI, O.; HORGAN, C.; MERANI, M. S. (1984). Parámetros reproductivos de *Akodon molinae* Contreras 1968, *Akodon dolores* Thomas 1916 y sus híbridos (Rodentia, Cricetidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 13, 485-490.

SMITH, M. F.; PATTON, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149-177.

SOUZA, C. R. G.; HIRUMA, S. T.; SALLUM, A. E. M.; RIBEIRO, R. R.; SOBRINHO, J. M. A. (2008). Restinga: conceitos e empregos do termo no Brasil e implicações na legislação ambiental. São Paulo: Instituto Geológico.

TAVARES, W. C.; PESSÔA, L. M.; SEUÁNEZ, H. N. (2016). Stability and acceleration of phenotypic evolution in spiny rats (*Trinomys*, Echimyidae) across different environments. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(1), 149-162.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673- 4680.

UPHAM, N. S.; PATTERSON, B. D. (2012). Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(2), 417-429.

WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 53, 103-120

WOODS, C. A.; KILPATRICK, C. W. (2005). Infraorder Hystricognathi. Pp. 1538–1600 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (DE Wilson and DM Reeder, eds.).

YONENAGA-YASSUDA, Y.; DE SOUZA, M. J.; KASAHARA, S.; L'ABBATE, M.; CHU, H. T. (1985). Supernumerary system in *Proechimys iheringi iheringi* (Rodentia, Echimyidae), from the state of Sao Paulo, Brazil. *Caryologia*, 38(2), 179-194.

ANEXO I

Protocolo de Purificação Sephadex

1. Adicionar 3,3g de Sephadex® a 50mL de água miliq autoclavada.
2. Após utilização das colunas de purificação provenientes do kit de purificação Amersham (GE Healthcare), lavar as colunas e deixá-las secar na estufa a uma temperatura de 37°C.
3. Após secarem, as colunas devem ser adicionadas a eppendorfs de 2mL.
4. Adicionar 750µL de solução de Sephadex em cada tudo, homogeneizando o Sephadex a cada 3 amostras.
5. Centrifugar os eppendorfs contendo a solução de Sephadex em centrífuga vertical a 10000 RPM por 90 segundos.
6. Retirar o excesso de água e dos eppendorfs e centrifugar novamente por 90 segundos a 10000 RPM.
7. Mudar as colunas para outro eppendorf, desta vez numerado, e adicionar 10µL de ADN sobre a resina.
8. Centrifugar os eppendorfs novamente a 10000 RPM, desta vez por 180 segundos.
9. Jogar fora a resina e fechar os eppendorfs.