

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Filogeografia comparada de espécies de *Trinomys*
(Rodentia: Echimyidae) na região central da Mata
Atlântica**

Juliander Agrizzi

**Vitória, ES
Julho, 2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Filogeografia comparada de espécies de *Trinomys*
(Rodentia: Echimyidae) na região central da Mata
Atlântica**

Juliander Agrizzi

Orientador: Yuri Luiz Reis Leite

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia
Animal**

**Vitória, ES
Julho, 2013**

Agradecimentos

Ao meu orientador Yuri L. R. Leite, pela paciência, conhecimento compartilhado e excelente orientação concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por terem viabilizado financeiramente a realização desse trabalho.

À Coleção de Tecidos e DNA da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), à Valéria Fagundes e Leonora Pires Costa (UFES), ao Pedro Luiz Bernardo da Rocha e Candelaria Estavillo (Universidade Federal da Bahia), Mariana Ferreira Rocha (Universidade Federal de Lavras) por terem cedido amostras dos tecidos. À Bertha Nicolaevsky pela ajuda na construção dos mapas.

À minha família e aos amigos pelo carinho, incentivo constante e todo o suporte dado nos momentos que precisei.

A todos os colegas do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia da UFES, que diariamente conviveram e me ajudaram. Principalmente à Ana Carolina Loss, pelos auxílios constantes nos procedimentos laboratoriais e de análise.

Aos membros da banca, Leonora Pires Costa e José Wellington Alves dos Santos, por terem aceitado me avaliar e certamente contribuir para a melhoria desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	01
Lista de Figuras	02
Resumo	04
Abstract.....	05
Introdução.....	06
Material e Métodos.....	07
Resultados.....	11
Discussão	13
Referências	18
Tabelas e Figuras	23
Apêndice I.....	32

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Divergência genética média par a par para vWF e citb dentro de espécies e filogrupos de *Trinomys*. n = número de sequências. **23**
- TABELA 2.** Divergência genética média par a par entre espécies e filogrupos de *Trinomys* para os genes citb (abaixo da diagonal) e vWF (acima da diagonal). Valores em porcentagem. **23**
- TABELA 3.** Testes para detecção de expansão populacional e diversidade haplotípica utilizando dados do gene citb. **24**
- TABELA 4.** Coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p) entre a distância genética e a geográfica para dados de citocromo b (citb) e Fator von Willebrand (vWF). **24**
- TABELA 5.** Estimativas do tempo de divergência em milhões de anos (Ma), desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC) para os nós datados na filogenia das espécies de *Trinomys*, usando relógio molecular relaxado para sequências do citocromo b e Fator von Willebrand. **25**

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Árvore de inferência bayesiana de amostras de *Trinomys* construída com sequências concatenadas dos genes do citocromo b e Fator von Willebrand. Acima dos ramos valores de probabilidade posterior bayesiana (BPP) $\geq 0,95$. GE = grupo externo. **26**
- FIGURA 2.** Rede de haplótipos de citb (esquerda) e vWF (direita) para *Trinomys paratus*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos haplótipos e dos remanescentes de Mata Atlântica em verde. **27**
- FIGURA 3.** Rede de haplótipos de citb (esquerda) e vWF (direita) para *Trinomys panema*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos espécimes. O número entre os haplótipos H13 e H20 indica a quantidade de passos mutacionais entre eles. **28**
- FIGURA 4.** Rede de haplótipos de citb (esquerda) e vWF (direita) para *Trinomys setosus*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos espécimes. *EEA (Estação Ecológica de Acauã - MG). O número entre os haplótipo H10 e o intermediário (circulo branco) indica a quantidade de passos mutacionais entre eles. **29**

- FIGURA 5.** (a) Regressão linear simples entre o número de haplótipos e o número de espécimes de *Trinomys* spp. por localidade com dados de citb com dados logaritmizados. (b) Relação entre a diversidade haplotípica e o número de espécimes por localidade. **30**
- FIGURA 6.** Relação entre distância genética e distância geográfica em *Trinomys panema* com dados de citb (a) e vWF (c) com indivíduos do Caraça (cuja comparação com os demais indivíduos encontra-se destacada em vermelho) e a mesma relação sem os espécimes dessa localidade para citb (b) e vWF (d). **30**
- FIGURA 7.** Árvore de inferência bayesiana de amostras de *Trinomys* datada pelo relógio molecular relaxado. Valores nos ramos indicam o tempo de divergência médio em milhões de anos entre as linhagens e as barras horizontais correspondem aos respectivos intervalos de confiança de 95%. **31**

Filogeografia comparada de espécies de *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae) na região central da Mata Atlântica

Resumo: Os roedores de espinho Echimyidae são a família mais diversa em termos taxonômicos e fenotípicos dentre os roedores histricognatos. Nessa família, as espécies de *Trinomys* são restritas à região leste do Brasil, com distribuição associada à Mata Atlântica. Dados da literatura sugerem que a grande a variação intraespecífica nesse gênero dificulta a tarefa de se alocar espécimes de museu às 13 espécies atualmente descritas. Dos poucos trabalhos realizados com esse gênero, a maioria se baseou em dados fenotípicos e aqueles que abordaram análises moleculares consideraram poucos genes ou número de exemplares reduzido. O objetivo do presente trabalho foi identificar e comparar a estrutura geográfica da diversidade genética das populações de três espécies de *Trinomys*, *T. paratus*, *T. panema* e *T. setosus*, que ocorrem na região central da Mata Atlântica. Para tal, foram sequenciados e analisados o gene mitocondrial do citocromo b (citb) e um gene nuclear do fator von Willebrand (vWF) de 103 espécimes. A filogenia concatenada dos genes confirmou a monofilia e o alto grau de divergência genética entre essas três espécies. Foram identificados dois filogrupos divergentes tanto em *T. setosus* e quanto em *T. panema*, sendo sustentados nas diferentes análises, indicando que sejam unidades taxonômicas distintas. Segundo a datação molecular, a diversificação das linhagens que levam à essas três espécies de *Trinomys* ocorreu no Mioceno Superior, enquanto a diversificação intraespecífica aconteceu principalmente no Plioceno e Pleistoceno. As redes haplotípicas indicaram que populações dessas três espécies de *Trinomys* apresentam certa estruturação geográfica na região central da Mata Atlântica. As redes de citb mostraram-se geograficamente mais estruturadas do que as de vWF, o que sugere que as fêmeas dessas espécies de *Trinomys* devem ter áreas de uso menores e provavelmente dispersam menos do que os machos, pois o gene mitocondrial é transmitido de forma maternal. As populações de *T. setosus* e *T. panema* não possuem haplótipos compartilhados de citb, apresentam isolamento por distância e não demonstram sinais de expansão populacional recente. Já o contrário foi observado em *T. paratus*, onde a maioria dos espécimes analisados foram de baixada e de regiões próximas, facilitando o fluxo gênico e consequentemente o compartilhamento de haplótipos.

Palavras-chave: *biogeografia, citocromo b, diversidade genética, filogenia, Fator von Willebrand.*

Comparative phylogeography of *Trinomys* species (Rodentia: Echimyidae) in the central region of the Atlantic Forest

Abstract: Echimyidae spiny rats are the most diverse family among hystrichognath rodents from both taxonomic and phenotypic perspectives. In this family, *Trinomys* species are restricted to eastern Brazil, and their distribution is associated with the Atlantic Forest. Data from the literature suggest that the extensive intraspecific variation in this genus makes the task of allocating museum specimens to the 13 currently described species very difficult. Most of the studies on this genus are based on phenotypic traits and those that included molecular analyses examined a few genes or a small number of specimens. The goal of the present paper is to identify and compare the geographical structure of the genetic diversity in populations of three *Trinomys* species, *T. paratus*, *T. panama*, and *T. setosus*, which occur in the central region of the Atlantic Forest. We sequenced and analyzed the mitochondrial cytochrome b (cytb) gene and the nuclear von Willebrand Factor gene (vWF) of 103 specimens. The concatenated gene phylogeny confirmed the monophyly and the high level of sequence divergence among the three species. We identified two diverging phylogroups in *T. setosus* and in *T. panama*, well supported in different analyses, indicating that these phylogroups are distinct taxonomic units. According to our molecular dating, the diversification of the lineages leading to these the three species of *Trinomys* must have occurred in the Upper Miocene, while intraspecific diversification took place mainly in the Pliocene and Pleistocene. The haplotype networks indicated that populations of the three *Trinomys* species are geographically structured in the central region of the Atlantic Forest. Cytb haplotype networks were geographically more structured than vWF networks, suggesting that females of these species have smaller home ranges and do not disperse as far as males do, because mitochondrial DNA is maternally inherited. Populations of both *T. setosus* and *T. panama* do not share cytb haplotypes, show isolation by distance and no evidence of recent demographic expansion. The opposite was observed in *T. paratus*, in which most specimens analyzed were from nearby, lowland regions, facilitating gene flow and, therefore haplotype sharing.

Key words: *biogeography, cytochrome b, genetic diversity, phylogeny, von Willebrand Factor.*

Introdução

Os roedores de espinho neotropicais Echimyidae são a família mais diversa em termos taxonômicos e fenotípicos dentre os roedores histricognatos vivos (Leite & Patton 2002). Nessa família, *Trinomys* é restrito ao leste do Brasil, com área de distribuição associada ao domínio da Mata Atlântica. Thomas (1921) descreveu *Trinomys* como um subgênero de *Proechimys* restrito ao sudeste do Brasil. Posteriormente, Lara *et al.* (1996) mostraram que *Trinomys* não era grupo-irmão de *Proechimys* com base em sequências de DNA mitocondrial e, desde então, esses táxons vem sendo considerados gêneros separados.

Estudos moleculares (Lara *et al.* 1996; Lara & Patton 2000; Leite & Patton 2002; Galewski *et al.* 2005), citogenéticos (Gardner & Emmons 1984; Leal-Mesquita *et al.* 1992; Pessôa & Correa, 2005), ecológicos (Davis 1945; Alho 1981; Fonseca & Redford 1984; Mares *et al.* 1986), parasitológicos (Guimarães & Linardi 1993; Vicente *et al.* 1997), morfológicos (Pessôa & Reis 1992; Pessôa *et al.* 1996; Monteiro & Reis 2005; Lazar *et al.* 2006), de comportamento social (Santos & Lacey 2011) e a revisão taxonômica feita por Iack-Ximenes (2005) documentaram vários aspectos da diversidade do gênero *Trinomys*. Apesar de tais esforços, aspectos de sua distribuição geográfica, os limites das espécies e sua taxonomia são ainda pouco compreendidos. Iack-Ximenes (2005) reconheceu 13 espécies válidas de *Trinomys* e quatro outras aparentemente não descritas. Além disso, constatou-se que a grande variação fenotípica intraespecífica dificulta muito a tarefa de se alocar espécimes de museu às espécies atualmente descritas (Iack-Ximenes 2005).

Na região central da Mata Atlântica, que vai do sul da Bahia ao sul do Espírito Santo e leste de Minas Gerais, ocorrem principalmente três espécies de *Trinomys* (Iack-Ximenes 2005): *T. panema*, cuja distribuição compreende o leste do estado de Minas Gerais, centro-sul do estado do Espírito Santo e extremo sudoeste do estado do Rio de Janeiro (Iack-Ximenes 2005); *T. paratus*, encontrado em parte dos estados do Espírito Santo e de Minas Gerais (Pessôa & Reis 1996); e *T. setosus*, cuja distribuição vai do estado de Sergipe ao do Espírito Santo e leste do estado de Minas Gerais (Iack-Ximenes 2005).

Uma alternativa para estudos evolutivos, populacionais e de sistemática é o uso de dados moleculares. O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado nesses estudos (Hewitt 2001), assim como em investigações sobre relações filogenéticas entre táxons e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (Avice *et al.* 1987; Bermingham & Moritz 1998; Avice 2000). É relevante ainda considerar que

diversos trabalhos têm adicionado mais de um gene para essas análises, visto que um único marcador não necessariamente reflete a real história dos ancestrais do espécime que o transporta (Page & Holmes, 1998). Além disso, tem sido comum a inclusão de genes nucleares, além dos marcadores mitocondriais (Michaux *et al.* 2002; Steppan *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2004; Galewski *et al.* 2005; Steppan *et al.* 2007; Themudo *et al.* 2009). Patterson & Velazco (2008), Galewski *et al.* (2005) e Loss & Leite (2011) incluíram genes nucleares em seus estudos com Echimyidae e obtiveram conclusões mais refinadas para as relações filogenéticas interespecíficas e/ou intergenéricas. Tais resultados indicam a importância da utilização de marcadores nucleares e mitocondriais na análise da história evolutiva de Echimyidae, podendo ser vantajoso tanto para compreensão de filogenias interespecíficas quanto sobre a estrutura populacional de espécies.

Somente Galewski *et al.* (2005) e Patterson & Velazco (2008) incluíram *Trinomys* em análises utilizando genes nucleares e mitocondriais, mas com número muito reduzido de espécimes e espécies, pois os objetivos eram inferir relações entre os gêneros. Contudo, a maioria dos estudos moleculares com esse gênero tem apenas utilizado um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (Lara *et al.* 1996; Lara & Patton 2000; Leite & Patton, 2002). Dentre esses estudos, apenas o trabalho de Lara & Patton (2000) enfocou especificamente a história evolutiva das espécies de *Trinomys*. Os resultados obtidos a partir das análises de dados moleculares contribuíram para o entendimento da evolução fenotípica, taxonomia e biogeografia desse grupo de roedores da América do Sul. Entretanto, mesmo analisando a maioria das espécies do gênero em questão, o reduzido número de exemplares de algumas espécies limitou conclusões de cunho taxonômico e filogeográfico.

Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi identificar e comparar a estrutura geográfica da diversidade genética das populações de três espécies de *Trinomys* na região central da Mata Atlântica, utilizando sequências de DNA de um gene mitocondrial e um gene nuclear.

Material e Métodos

As amostras de tecido (músculo ou fígado), conservados em álcool absoluto, foram obtidas a partir de 103 espécimes distribuídos em três espécies de *Trinomys*: *T. panema*, *T. paratus* e *T. setosus* (Apêndice I). A identificação das espécies foi baseada nas características morfológicas segundo Iack-Ximenes (2005). As siglas dos espécimes de *Trinomys* utilizados nas análises moleculares referem-se à instituição de tombo –

Museu de Biologia Professor Mello Leitão (MBML), Coleção de Tecidos e DNA da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – ou às iniciais do coletor – Valéria Fagundes (LGA), Leonora Pires Costa (LC ou LPC), Yuri Leite (YL), Mariana Ferreira Rocha (TAX) e Candelaria Estavillo (VAL).

Para o grupo externo foram escolhidos espécimes de três gêneros de Echimyidae, listados a seguir com o número de acesso do Banco de Sequência de DNA GenBank: *Echimys chrysurus* (citb: EU313208; vWF: AJ251141), *Proechimys simonsi* (citb: EU313250.1; vWF: AJ849320) e *Euryzgomatomys spinosus* (citb: EU544667; vWF: AJ849319).

Foram utilizados dois genes no presente trabalho: 1) parte de um marcador mitocondrial: 801 pb do citocromo b (citb), amplamente empregado para reconstrução de filogenia de mamíferos (Smith & Patton 1993; Avise 1998; Tsuchiya *et al.* 2000; May-Collado & Agnarsson, 2006); 2) parte de um marcador nuclear: 491 pb do exon 28 do gene que codifica o fator von Willebrand (vWF). Tais genes já foram utilizados com sucesso para Echimyidae (Galewski *et al.* 2005; Lara *et al.* 1996; Lara & Patton, 2000; Leite & Patton, 2002; Loss & Leite 2011).

As amostras de tecidos foram submetidas ao protocolo de extração de DNA total com sal (SDS/NaCl/Proteinase K) de Brufford *et al.* (1992) e seus produtos quantificados no NanoDrop (Thermo Scientific) para confirmar a extração e obter a concentração. Todas as amostras foram diluídas a 150 ng/μL para que não houvesse comprometimento das etapas seguintes.

Os fragmentos de interesse foram amplificados por meio da clonagem *in vitro* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em termociclador, utilizando-se os pares de iniciadores com temperaturas de anelamento de 48°C para os iniciadores MVZ05 e MVZ16 do citb (Smith & Patton 1993) e 55°C para os iniciadores V10 e W13 do vWF (Galewski *et al.* 2005). Foram utilizados os seguintes reagentes para cada reação de PCR com volume final de 12,5 μl: tampão 10x, 50 Mm de MgCl₂ (Invitrogen), 10 Mm de cada dNTP, 10 Mm de cada iniciador, três unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 40 ng de DNA.

O perfil da PCR utilizado para amplificação dos fragmentos foi: 94°C/5 min; seguidos de 39 ciclos de 94°C/30 s, 45 segundos na temperatura de anelamento do gene (55°C para vWF e 48°C para citb), 72°C/45 s; e um ciclo final de 72°C/5 min. Após a amplificação, os produtos de PCR gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com marcador molecular 1 Kb a fim de estimar o tamanho do fragmento

amplificado. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta, segundo Maniatis *et al.* (1989).

O produto amplificado foi purificado com as enzimas ExoSAP (USB Corporation) para eliminar potenciais inibidores do sequenciamento e em seguida, incubados a 37°C por 30 minutos e aquecida a 80°C por 15 minutos para inativação da enzima. O produto purificado foi submetido à reação de sequenciamento e precipitação, para então ter condições e reagentes necessários ao sequenciamento. As amostras preparadas foram sequenciadas utilizando o kit d-Rhodamine (Applied Biosystems) com 25 ciclos de 95°C/30 s, 50°C/15 s, 60°C/4 min. As sequências foram obtidas no sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi feito nas duas direções e as duas sequências complementares foram comparadas a fim de ter maior confiabilidade na sequência final.

As sequências foram alinhadas no ClustalW de Larkin *et al.* (2007) implementado no programa MEGA 4.1 de Kumar *et al.* (2008). Depois de alinhadas, as sequências foram analisadas no MEGA 4.1 para obtenção dos valores de divergência par-a-par intra e interespecíficos para cada gene, utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2p) (Kimura 1980).

As 103 sequências de cada gene foram submetidas ao programa MEGA 4.1 para análise de máxima parcimônia. A análise de inferência bayesiana foi realizada no BEAST 1.6.1 de Drummond & Rambaut (2007) com 10⁶ gerações, sendo amostrada uma árvore a cada 100 gerações, totalizando 10⁴ árvores. Para obtenção do consenso final, foram descartadas as primeiras 2.500 árvores. Apenas grupos com probabilidade posterior bayesiana (BPP) maior do que 95% foram considerados significativos. A seleção dos melhores modelos evolutivos para a inferência bayesiana foi realizada no programa JModeltest 0.1.1 de Posada (2008), com utilização do Critério de Informação de Akaike (AIC). Os modelos de evolução determinados para as análises do citb e vWF foram GTR+I+G e HKY+G, respectivamente. As análises das sequências de cada gene foram realizadas de forma independente e posteriormente concatenadas.

A avaliação da estrutura genética das populações e da filogeografia foi obtida a partir da construção de redes de haplótipos geradas no programa Network 4.6 de Bandelt *et al.* (1999). Devido à constatação de heterozigotos nas sequências do gene vWF, o conjunto de dados foi submetido à extração dos haplótipos no programa DnaSPPhase 5.10.01 de Librado & Rozas (2009) e só depois foi feita a construção da rede de haplótipos. As análises foram obtidas para cada espécie e gene. A partir dos gráficos obtidos foram analisados os eventos de mutação entre os haplótipos e

comparados à distribuição geográfica. Para a construção das redes de haplótipos, alguns pontos de coleta com distância menor do que 10 km foram considerados como única localidade, denominada “Santa Teresa”: Estação Biológica de Santa Lúcia, Valsugana Velha e Santa Maria de Jetibá, todas no estado do Espírito Santo. Mapas para cada espécie foram feitos utilizando o programa ArcMap 9.3 (ESRI 2011).

A relação entre o número de haplótipos e o número de espécimes por região foi avaliada a partir da análise de regressão utilizando-se o modelo linear generalizado (GLM), que minimiza problemas heterocedasticidade e leves desvios da normalidade, realizada no Programa R (<http://www.R-project.org/>). Nesse mesmo programa foram realizados os testes de diversidade haplotípica.

Para analisar a relação entre as distâncias genética e geográfica foi utilizado o teste de Mantel, considerando a correlação Pearson e 10 mil permutações no programa XLSTAT de Fahmy & Aubry (2011).

Os testes de neutralidade para estimar se a população está em equilíbrio ou expansão populacional foram realizados no programa DnaSP 5.1 de Librado & Rozas (2009). Dos vários testes disponíveis, foram escolhidas as estatísticas F_s de Fu (1997) e R_2 de Ramos-Onsins & Rozas (2002) possuem as melhores respostas na detecção de expansão populacional, segundo análises realizadas por Ramos-Onsins & Rozas (2002). Além disso, os autores sugerem a aplicação do teste R_2 para amostras pequenas (de até 20 espécimes) e o teste F_s para amostras maiores (acima de 20 espécimes). Para a estimativa F_s , valores negativos são observados em caso de expansão populacional, e para o teste R_2 são esperados valores próximos à zero para a condição de expansão.

As estimativas dos tempos de divergências entre as linhagens foram obtidas a partir do programa BEAST 1.6.1 de Drummond & Rambaut (2007), com análise bayesiana considerando o relógio relaxado e permitindo variação do comprimento dos ramos de acordo com uma distribuição log-normal não-correlacionada (Drummond *et al.* 2006). Como pontos de calibração (média \pm intervalo de confiança) foram utilizados a separação de *Trinomys* mais *Euryzygomatomys* de outros Echimyidae há $17,1 \pm 3,9$ milhões de anos (Ma), a separação de *Euryzygomatomys* de *Trinomys* há $14,5 \pm 3,6$ Ma e a separação de *Trinomys setosus* de *T. paratus* há $4,1 \pm 2,0$ Ma, calculados por Galewski *et al.* (2005) a partir de sequências do gene vWF.

Para a árvore foi utilizado o processo Yule de especiação como prévia (“prior”). O modelo de evolução selecionado pelo JModeltest 0.1.1 de Posada (2008) e seus parâmetros foram utilizados como priors. As análises foram conduzidas por 2×10^7 gerações, com uma árvore amostrada a cada 2×10^3 gerações, totalizando 2×10^4

árvores. A qualidade dos parâmetros calculados foi ponderada no programa Tracer e o consenso das árvores foi obtido no programa TreeAnnotator, com descarte das 10³ primeiras árvores. Ambos programas fazem parte do pacote BEAST 1.6.1 de Drummond & Rambaut (2007).

Resultados

Nas análises de parcimônia, a matriz de citb com 801 pb apresentou 267 sítios variáveis, sendo 241 informativos, enquanto para vWF, com 491 pb na matriz, foram observados 93 sítios variáveis e 63 informativos. De forma geral, os diferentes critérios de otimização analisados para os dois genes resultaram em topologias semelhantes, dessa forma apenas a árvore de inferência bayesiana com dados concatenados é apresentada (Figura 1). Essa filogenia apresentou valores significativos de probabilidade posterior ($BPP \geq 0,95$) para a monofilia de cada uma das espécies. Na árvore, é possível notar dois filogrupos dentro das espécies *Trinomys panema* e *Trinomys setosus*, ambos com valores de probabilidade posterior significativos. Para os filogrupos da primeira espécie, um é composto por espécimes provenientes do Parque Natural do Caraça, Minas Gerais (UFES 920, 1091, 1096), que a partir de agora será chamado de ‘*T. panema* Caraça’ e outro filogrupo é formado por indivíduos de outras regiões, chamado de ‘*T. panema* outros’. Na segunda espécie, um filogrupo é constituído por um indivíduo de Valença, Bahia (VAL 25), que será tratado como ‘*T. setosus* Valença’ e outro filogrupo contendo indivíduos de outras regiões, que será chamado de ‘*T. setosus* outros’.

A maior média de divergência genética intraespecífica de citb foi em *Trinomys panema* (2,9%), seguida por *T. setosus* (1,4%) e *T. paratus* (0,7%). Já para vWF, as médias de divergência foram de 0,1% em *T. panema* e *T. setosus*, e 0,03% em *T. paratus* (Tabela 1). Para os filogrupos de *T. panema*, a média de divergência intraespecífica do citb foi de 0,2% para ‘*T. panema* Caraça’ e 1,3% para ‘*T. panema* outros’, já para vWF a divergência observada foi de zero para os dois filogrupos. Para *T. setosus*, a divergência dentro do filogrupo ‘*T. setosus* outros’ foi de 0,6% e 0,006% para citb e vWF, respectivamente (Figura 1).

A divergência entre espécies ou filogrupos variou de 6,8 a 17,7% para citb e de 0,5 a 7,4% para vWF (Tabela 2). Quando comparamos os dois filogrupos de *T. panema*, os valores de divergência foram de 9,3% para citb e 0,5% para vWF (Tabela 2). Já em *T. setosus*, a divergência entre os filogrupos foi de 6,8% e 0,7% para citb e vWF, respectivamente (Tabela 2). De forma geral, a divergência genética média entre as

espécies foi o dobro daquela encontrada entre os filogrupos para o citb. Enquanto para o vWF, apesar dos valores de divergência serem sempre menores, essa diferença variou de cerca de 3 a 15 vezes, dependendo da comparação.

Nas análises de estruturação genética das populações com dados de citb, foram identificados 25 haplótipos em *T. paratus* (n = 60), 10 em *T. setosus* (n = 15) e 21 em *T. panema* (n = 28). Para o vWF, foram observados 17 haplótipos em *T. paratus* (n = 60), 5 em *T. setosus* (n = 15) e 6 em *T. panema* (n = 25). De forma geral, as três espécies não apresentaram estruturação geográfica para ambos os genes.

Nas redes haplotípicas para ambos os genes é possível observar que a quantidade de eventos de mutação entre os haplótipos variou de 1 a 7 (Figuras 2–4), exceto em dois casos. Para dados do citb de *T. panema*, existem de 61 a 63 eventos de mutação entre os haplótipos H21 e H20, provenientes do Parque Natural do Caraça, Minas Gerais e o haplótipo H13 de Domingos Martins, Espírito Santo (Figura 3), que se liga a todos os outros. Já em *T. setosus* observa-se 48 eventos de mutação entre um haplótipo de Valença, Bahia e um haplótipo intermediário (Figura 4). Os vários eventos de mutação observados indicam a existência de grandes lacunas genéticas dentro dessas duas espécies que talvez devam ser reconhecidos como unidades evolutivas ou taxonômicas distintas. De maneira geral, as redes de haplótipos usando o gene vWF parecem ter trazido menos informações do que as do citb e algumas conclusões foram obtidas somente com base nos dados de citb.

A relação logarítmica entre o número de haplótipos e o número de espécimes de uma mesma região foi uma regressão linear simples e significativa (p-valor <0,0001) (Figura 5a). Já para os valores de diversidade haplotípica (Tabela 3), houve regiões com número baixo número de espécimes que apresentaram maior diversidade do que regiões com elevado número de espécimes (Figura 5b).

Para o teste neutralidade R_2 , os valores resultantes foram próximos de zero para todas as populações analisadas, porém não foram significativos (Tabela 3). Já para as duas populações de *T. paratus* onde o teste F_s de F_u foi aplicado, os valores obtidos foram negativos tanto para *T. paratus* de Duas Bocas ($F_s = -0,31$; $P_{fs} = 0,28$) quanto para *T. paratus* com todos os indivíduos ($F_s = -0,36$; $P_{fs} = 0,004$), mas só foi significativo para esta última população.

No teste de Mantel (Tabela 4), os valores obtidos não foram significativos para *T. paratus* ($p_{citb} = 0,349$ e $p_{vWF} = 0,395$) e *T. panema* ($p_{citb} = 0,94$ e $p_{vWF} = 0,828$), indicando que não há correlação entre as distâncias genética e geográfica para essas espécies. No entanto, valores positivos e significativos foram observados para ambos os genes em *T.*

setosus ($r_{\text{citb}}=0,896$ e $p_{\text{citb}}<0,0001$; $r_{\text{vWF}}=0,8$ e $p_{\text{vWF}}=0,001$) e somente para o citb em ‘*T. setosus* outros’ ($r_{\text{citb}}=0,576$ e $p_{\text{citb}}=0,029$), sugerindo haver associação entre distâncias genética e geográfica nesses casos. Para *T. panema*, comparação entre as distâncias genéticas e geográficas para todos os indivíduos e ‘*T. panema* outros’ sustentam as diferenças já observadas para ‘*T. panema* Caraça’ em relação aos ‘*T. panema* outros’ (Figura 6).

Em relação aos tempos de divergência entre as linhagens (Tabela 5 e Figura 7), a separação de *Trinomys* e *Euryzygomatomys* teria ocorrido há $10,6 \pm 0,09$ Ma, durante o Mioceno Superior. Nessa mesma época geológica também há indícios de que tenha acontecido o isolamento entre *T. paratus* e *T. setosus*, há $6,3 \pm 0,04$ Ma e ainda a separação *T. panema* e *T. paratus* + *T. setosus*, há $8,9 \pm 0,08$ Ma. Já a diversificação dentro das espécies deve ter ocorrido no Plioceno (Figura 7).

Discussão

Os genes mitocondrial e nuclear mostraram-se eficazes na delimitação das três espécies de *Trinomys* como grupos monofiléticos. Essa clara separação não ocorre com dados fenotípicos, pois a variação intraespecífica observada dificulta sua classificação (Iack-Ximenes 2005). Mesmo em termos da morfometria geométrica do crânio, somente a variação na sua forma em vista lateral em uma escala pequena e localizada foi congruente com a estrutura filogenética molecular das espécies (Nicola *et al.* 2003).

A diversificação das linhagens que levam às três espécies de *Trinomys* do presente estudo provavelmente começou no Mioceno, pois o intervalo de confiança para esse evento é de 5,2 a 12,9 Ma. Já a diversificação intraespecífica parece ter ocorrido no Plioceno e no Pleistoceno, cenário também confirmado pelo estudo de Lara & Patton (2000).

Iack-Ximenes (2005) já documentara a diversidade *Trinomys* em estudo com dados morfológicos. Em *T. panema*, por exemplo, ele sugeriu duas novas espécies para indivíduos do Parque Nacional do Caraça, Minas Gerais. No presente estudo, espécimes de *T. panema* dessa mesma região juntaram-se no filogrupo ‘*T. panema* Caraça’, separando-se do filogrupo ‘*T. panema* outros’, com suporte máximo de probabilidade posterior. Além disso, a divergência genética para citb entre esses dois filogrupos (9,3%) foi em torno de 7 e 46 vezes maior do que a divergência intraespecífica observada para ‘*T. panema* outros’ e ‘*T. panema* Caraça’, respectivamente. O tempo de divergência entre esses filogrupos é outro indício das diferenças, ele é quase tão antigo quanto o isolamento entre *T. paratus* e *T. setosus*, onde a maior parte do intervalo de

confiança é sobreposto. Em vista disso, esses dois filogrupos devem pertencer unidades taxonômicas diferentes. Todavia, os espécimes de '*T. panema* Caraça' utilizados aqui foram analisados por Jack-Ximenes (2005), mas considerados da mesma espécie que os indivíduos LC 185, UFES 878 e 1078, que no presente estudo pertencem ao filogrupo '*T. panema* outros'. Essa aparente confusão taxonômica deve ser esclarecida quando dados moleculares e morfológicos forem analisados de forma conjugado para o mesmo conjunto de espécimes, cobrindo de forma mais adequada sua distribuição geográfica. Para *T. setosus*, as divergências genéticas do citb entre os dois filogrupos separados na filogenia (6,8%), que é cerca de 11 vezes maior do que a divergência intraespecífica do filogrupo '*T. setosus* outros', e o fato da separação dos filogrupos ter o intervalo de confiança em sua maioria sobreposta com a separação dos filogrupo de *T. panema*, também indicam a possibilidade de '*T. setosus* valença' e '*T. setosus* outros' serem espécies distintas. Entretanto, o número de espécimes analisados foi muito reduzido. O filogrupo '*T. setosus* Valença', por exemplo, que contem apenas um espécime e é de Valença, Bahia, dista mais de 500 km das outras amostras. A análise de espécimes tão distantes pode ter enviesado a análise, principalmente considerando que somente nessa espécie a distância genética pode ser explicada pela distância geográfica entre as amostras. No entanto, se indivíduos proveniente de locais dessa lacuna amostral forem analisados, será possível, por exemplo, testar se a espécie apresenta variação na forma de gradiente ou abrupta, indicando que realmente existam unidades taxonômicas diferentes para essa espécie na sua distribuição atual.

De forma geral, as redes de haplótipos de ambos os genes indicaram alguma estruturação geográfica para as três espécies, mas aquelas obtidas a partir do citb mostraram mais estruturação geográfica do que as do vWF. As redes haplotípicas do gene nuclear apresentaram muitos haplótipos de regiões distintas, e muitas vezes distantes, sendo compartilhados. A principal razão disso é o fato dos genes nucleares serem mais conservados do que os mitocondriais, que possuem evolução mais rápida (Avice 1994; Simon *et al.* 1994; Page & Holmes 1998). Esse cenário é corroborado pelos valores de parcimônia, pois enquanto o citb apresentou 30% de sítios informativos do total de 801 pb, o vWF teve apenas 13% dos 491 pb analisados. Além disso, na maioria das espécies de roedores Echimyidae estudadas, os machos dispersam mais do que as fêmeas (Adler 2011). Em *Trinomys*, tal padrão foi observado em campo na espécie *T. moojeni*, onde fêmeas são mais territoriais (Cordeiro Jr. & Talamoni 2006). Isso explicaria a maior estruturação observada para os haplótipos do gene mitocondrial, cujo modo de transmissão é materno, quando comparado ao nuclear.

A população de *T. paratus* de Cariacica, Espírito Santo, foi a que mais compartilhou haplótipos com outras regiões, inclusive com haplótipos provenientes de Santa Rita de Jacutinga (H18 – citb; H16 e H17 – vWF), que possuem entre 0 e 4 eventos de mutação para os outros haplótipos e distam mais de 400 km. O aparente fluxo gênico observado é ainda sustentado pelo fato de não haver associação entre a distância genética e a distância geográfica para ambos os genes nessa espécie. Essa ausência de isolamento por distância pode ser explicada pelo fato da maioria dos espécimes analisados serem de baixada e de regiões próximas, o que pode facilitar o contato entre eles e, conseqüentemente, o fluxo gênico. Além disso, quando todos os espécimes de *T. paratus* foram analisados conjuntamente, pode-se observar que há sinais de expansão populacional recente e as populações ainda compartilhariam haplótipos, como foi constatado nas redes de haplótipos.

Não há compartilhamento de haplótipos de *T. panema* de regiões diferentes nas redes com dados de citb, o contrário do observado para *T. paratus*. Essa separação entre as populações pode ainda ser sustentada quando observamos que no filogrupo ‘*T. panema* outros’ há isolamento por distância. Outra explicação para esse isolamento pode ser a distribuição altitudinal, visto que essa espécie ocorre somente acima de 500 m (Jack-Ximenes 2005). Nesse caso, as populações ficam praticamente isoladas em topos de morro, levando a uma redução do fluxo gênico. Além disso, a ausência de sinais de expansão populacional recente em *T. panema*, ao contrário de *T. paratus*, pode ser devido a influência negativa do isolamento altitudinal das populações.

Ainda para *T. panema*, cabe mencionar que o alto número de passos de mutação (61-63) entre haplótipos dos filogrupos ‘*T. panema* Caraça’ e ‘*T. panema* outros’ sustenta ainda mais as especulações de que esses filogrupos pertençam a unidades taxonômicas distintas. O Parque Natural do Caraça está situado na serra de mesmo nome e apresenta escarpas muito íngremes, que surgem abruptamente na paisagem, formando uma massa de quartzito distinta das regiões vizinhas (Maxwell 1972). Tais características indicam uma área de difícil acesso, principalmente assumindo que as fêmeas dispersem pouco (Cordeiro Jr. & Talamoni 2006), e podem ter conquistado esse ambiente uma vez há muito tempo. Nesse caso, o fluxo de DNA nuclear teria sido mantido pelos machos, explicando a discrepância observada entre a divergência dos haplótipos nucleares e mitocondriais.

A rede haplotípica com dados mitocondriais de *T. setosus*, assim como de *T. panema*, mostrou que não há haplótipos em comum para regiões distintas e a existência de associação entre a distância genética e a geográfica observada sustenta tal padrão.

Entretanto, ao contrário de *T. panema*, *T. setosus* ocorre em baixadas, e o isolamento por distância constatado não está relacionado a barreiras de altitude. Talvez esse isolamento seja reflexo de baixa capacidade de dispersão ou de alguma fidelidade de hábitat. De fato, espécies de *Trinomys* tendem a apresentar uma variação estruturada pelo hábitat, com clados distintos ocupando tipos de floresta diferentes (Lara *et al.* 2005). Características de habitat também influenciam diretamente no nível do fluxo gênico entre espécies amazônicas de *Proechimys* (Matocq *et al.* 2000), uma forma ecomorfologicamente muito semelhante à *Trinomys*. Além disso, Attias *et al.* (2009), em um estudo de modelagem de nicho, mostraram que a distribuição potencial de *T. setosus* é bem maior que a de *T. panema*, o que pode indicar uma maior fidelidade ao habitat da segunda espécie.

A correlação positiva entre o número de haplótipos para DNA mitocondrial de *Trinomys* de uma região e a quantidade de espécimes analisados indicam que quanto mais indivíduos forem coletados, mais haplótipos serão obtidos. Isso também foi observado em humanos (Pereira *et al.* 2004) e tartarugas-verdes (Formia *et al.* 2007), em estudos com a região controle do DNAm (d-loop). No entanto, espera-se que a partir de algum momento a quantidade de espécimes analisados de uma região necessária para representar a diversidade local atinja um limiar, a partir do qual o aumento do número de indivíduos amostrados não influencie na diversidade genética estimada. No presente estudo, essa tendência não foi observada, mesmo com 42 indivíduos analisados na população com maior amostragem (Cariacica, Espírito Santo), indicando que mais indivíduos por região devem ser analisados para que se amostrasse uma boa parcela da diversidade haplotípica de *citb* nessa espécie. Para as tartarugas mencionadas acima, os 245 espécimes analisados foram suficientes para documentar a diversidade haplotípica, no entanto também foi observado que para cada região pode haver quantidades diferentes de espécimes necessárias para representar a diversidade genética da população local (Formia *et al.* 2007).

Mesmo que a monofilia das três espécies de *Trinomys* tenha sido confirmada, há indícios de que existam outras unidades taxonômicas em *T. setosus* e *T. panema*, sustentadas nas diferentes análises. Além disso, as populações das espécies de *Trinomys* apresentaram certa estruturação geográfica: *T. setosus* e *T. panema* não possuem haplótipos compartilhados para *citb*, o contrário do observado para *T. paratus*, única espécie a apresentar sinais de expansão populacional recente. Em adição, pode-se constatar que o número de espécimes analisados das três espécies não foi suficiente para amostrar a diversidade haplotípica das mesmas para a região de estudo. Dessa forma, o

presente estudo lançou novas e importantes informações sobre os limites das espécies e a estrutura geográfica da diversidade genética das populações de *Trinomys* da Mata Atlântica, e novas lacunas de conhecimento foram destacadas. Sendo assim, estudos que contemplem maior amostragem por região e espécimes de novas áreas poderão contribuir com novas informações para as pouco conhecidas espécies desses ratos-de-espinho.

Referências bibliográficas

- Adler GH (2011) Spacing patterns and social mating systems of echimyid rodents. *Journal of Mammalogy*, **92**, 31-38.
- Alho, CJR (1981) Small mammal populations of Brazilian Cerrado: the dependence of abundance and diversity on habitat complexity. *Revista Brasileira de Biologia*, **41**, 223-230.
- Attias N, Raíces DSL, Pessoa FS, Albuquerque H, Jordão-Nogueira T, Modesto TC, Bergallo HG (2009) Potential distribution and new records of *Trinomys* species (Rodentia: Echimyidae) in the state of Rio de Janeiro. *Zoologia*, **26**, 305-315.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**: 489–522.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 512 pp.
- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**: 371-379.
- Avise JC (2000) *Phylogeography – The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. 447 pp.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **1**, 37-48.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative Phylogeography: Concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367-369.
- Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and DNA fingerprinting. 225-269. In: *Molecular genetic analyses of populations*. A Practical Approach. A.R. Hoelzel (ed.). IRL Press, Oxford.
- Cordeiro Jr. DA, Talamoni SA (2006) New data on the life history and occurrence of spiny rats *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae), in southeastern Brazil. *Acta Theriologica*, **51**(2), 163-168.
- Davis DE (1945) The annual cycle of plants, birds and mammals in two Brazilian forests. *Ecological Monographs*, **15**, 243-295.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biology*, **4**, 699-710.

- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- ESRI (2011) ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands.
- Fahmy T, Aubry P (2011) XLSTAT-Pro (version 2001.4.03.). Society Addinsoft, New York.
- Fonseca GAB, Redford KH (1984) The mammals of IBGE's ecological reserve, Brasília and an analysis of the role of gallery forests in increasing diversity. *Revista Brasileira de Biologia*, **44**, 517-523.
- Formia A, Broderick AC, Glen F, Godley, Hays GC, Bruford MW (2007) Genetic composition of the Ascension Island green turtle rookery based on mitochondrial DNA: implications for sampling and diversity. *Endangered Species Research*, **3**, 145–158.
- Fu X-Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Galewski T, Mauffrey JF, Leite YLR, Patton JL, Douzery EJP (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.
- Gardner AL, Emmons LH (1984) Species groups in *Proehimys* (Rodentia: Echimyidae) as indicated by karyology and bullar morphology. *Journal of Mammalogy*, **65**, 10-25.
- Guimarães LR, Linardi PM (1993) *Hechitiella lopesi* sp. N. from São Paulo state, Brazil (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **88**, 547-550.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537-549.
- Iack-Ximenes GE (2005) Revisão de *Trinomys* Thomas, 1921 (Rodentia, Hystricognathi, Echimyidae). *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo.
- Kimura M (1980) A single method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, **9**, 299-306.

- Lara MC, Geise L, Schneider CJ (2005) Diversification of small mammals in the Atlantic Forest of Brazil: testing the alternatives. *University of California Publications in Zoology*, **133**, 311-334.
- Lara MC, Patton JL, Da Silva MNF (1996) The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5**, 403-413.
- Lara MC, Patton JL (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.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Lazar GSA, Correa MMO, Pessôa LM (2006) Morphometric discrimination between *Trinomys albispinus* (Is. Geoffroy, 1838) and *Trinomys minor* (Reis & Pessôa, 1995) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, and the karyotype of *Trinomys albispinus* (Rodentia, Echimyidae). *Arquivos do Museu Nacional*, **64**, 1-10.
- Leal-Mesquita ER, Yonenaga-Yassuda Y, Chu TH, Rocha PLB (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**, 197-212.
- Leite YLR, Patton JL (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 v5.1: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Loss AC, Leite YLR (2011) Evolutionary diversification of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, **92**, 1352-1366.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.*
- Mares MA, Ernest KA, Gettinger D (1986) Small mammal community structure and composition in the Cerrado province of central Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **2**, 289-300.

- Matocq MDM, Patton JL & Da Silva MNF (2000) Population genetic structure of two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution*, **54**, 1423–1432.
- Maxwell CH (1972) Geology and ore deposits of the Alegria District, Minas Gerais, Brasil. *United States Geological Survey, Professional Paper* **341-J**, p. 72.
- May-Collado L, Agnarsson I (2006) Cytochrome *b* and Bayesian inference of whale phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 344-354.
- Michaux JR, Chevret P, Filippucci MG, Macholan M (2002) Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis to the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 123-136.
- Monteiro LR, Reis SF (2005) Morphological evolution in the mandible of spiny rats, genus *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **43**, 332-338.
- Nicola PA, Monteiro LR, Pessôa LM, Von Zuben FJ, Rohlf FJ & Reis SF (2003) Congruence of hierarchical, localized variation in cranial shape and molecular phylogenetic structure in spiny rats, genus *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **80**, 385–396
- Page RDM, Holmes EC (1998) *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science, 346 pp.
- Patterson BD, Velazco PM (2008) Phylogeny of the Rodent Genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its Diversification in Amazonia and the Eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution*, **15**, 181-201.
- Pereira L, Cunha C, Amorim A (2004) Predicting sampling saturation of mtDNA haplotypes: an application to an enlarged Portuguese database. *International Journal of Legal Medicine*, **118**, 132–136.
- Pessôa LM, Reis SF, Pessôa, MF (1996) Bacular variation in subspecies taxonomy of the Brazilian spiny rat *Proechimys (Trinomys) iheringi*. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **31**, 129-132.
- Pessôa LM, Reis SF (1992) Bacular variation in the subgenus *Trinomys*, genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae). *Zeitschrift fur Saugetierkunde*, **57**, 100-100.
- Pessôa, LM, Correa MMO, Bitencourt E, Reis SF (2005) Chromosomal characterization of taxa of the genus *Trinomys* in the states of Rio de Janeiro and São Paulo (Rodentia: Echimyidae). *Arquivos do Museu Nacional*, **63**, 161-168.

- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092-2100.
- Santos JWA, Lacey EA (2011) Burrow sharing in the desert-adapted torch-tail spiny rat, *Trinomys yonenagae*. *Journal of Mammalogy*, **92**, 3-11.
- Simon C, Frati F, Bechenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Smith MF, Patton JL (1993) Diversification of South American muroid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 149-177.
- Steppan SJ, Ramirez O, Banbury J, Huchon D, Pacheco V, Walker LI, Spotorno AE (2007) A molecular reappraisal of the systematics of the leaf-eared mice *Phyllotis* and their relatives. *University of California Publications in Zoology*, **134**, 799-826.
- Steppan SJ, Storz BL, Hoffmann RS (2004) Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and Rag1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**, 703-719.
- Suzuki H, Shimada T, Terashima M, Tsuchiya K, Aplin K (2004) Temporal, spatial, and ecological modes of evolution of Eurasian *Mus* based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 647-663.
- Themudo GE, Wielstra B, Arntzen JW (2009) Multiple nuclear and mitochondrial genes resolve the branching order of a rapid radiation of crested newts (*Triturus*, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 321-328.
- Thomas O (1921) On spiny rats of the *Proechimys* group from Southeastern Brazil. *Annals and Magazine of Natural History*, **9**, 140-143.
- Tsuchiya K, Suzuki H, Shinohara A, Harada M, Wakana S, Sakaizumi M, Han SH, Lin LK, Kryukov AP (2000) Molecular phylogeny of East Asian moles inferred from the sequence variation of the mitochondrial cytochrome b gene. *Genes and Genetic Systems*, **75**, 17-24.
- Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM (1997) Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de Mamíferos. *Revista Brasileira de Zoologia*, **14**, 1-452.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Divergência genética média par a par para vWF e citb dentro de espécies e filogrupos de *Trinomys*. n = número de sequências.

Espécie ou filogrupo	citb		vWF	
	n	Média (%)	n	Média (%)
<i>Trinomys paratus</i>	60	0,7	60	0,03
<i>Trinomys setosus</i>	15	1,4	15	0,1
<i>Trinomys panema</i>	28	2,9	28	0,1
<i>T. setosus</i> outros	14	0,6	14	0,06
<i>T. panema</i> Caraça	3	0,2	3	0
<i>T. panema</i> outros	25	1,3	25	0

Tabela 2. Divergência genética média par a par entre espécies e filogrupos de *Trinomys* para os genes citb (abaixo da diagonal) e vWF (acima da diagonal). Valores em porcentagem.

	<i>T. paratus</i>	<i>T. setosus</i> outros	<i>T. panema</i> Valença	<i>T. panema</i> outros	<i>T. panema</i> Caraça
<i>T. paratus</i>	-	2,6	2,3	6,7	6,7
<i>T. setosus</i> outros	15,9	-	0,7	7,4	7,4
<i>T. setosus</i> Valença	14,6	6,8	-	7,4	7,4
<i>T. panema</i> outros	17,1	17,1	18,0	-	0,5
<i>T. panema</i> Caraça	17,7	16,4	17,9	9,3	-

Tabela 3. Testes para detecção de expansão populacional e diversidade haplotípica utilizando dados do gene *citb*.

Espécie	População	Ne	Nh	Dh	R ₂	P _{R2}
<i>T. paratus</i>	Duas Bocas	42	16	0,95 ± 0,0002	NC	NC
	Viana	13	7	0,85 ± 0,007	0,16	0,29
	todos	60	25	NA	NC	NC
<i>T. setosus</i>	Acauã	4	4	1,0 ± 0,31	0,29	0,4
	Pancas	7	2	0,28 ± 0,38	0,29	0,59
	todos exceto Valença	14	9	NA	0,15	0,43
<i>T. panema</i>	Caparaó	6	6	1,0 ± 0,009	0,20	0,09
	Domingos Martins	3	2	NA	0,35	1,0
	Simonésia	3	2	NA	0,43	1,0
	Santa Teresa	10	6	0,91 ± 0,004	0,17	0,17
	todos exceto Caraça	25	19	NA	0,50	0,12
	Caraça	3	2	NA	0,40	1,00

Ne: Número de espécimes; Nh: Número de haplótipos; Dh: Diversidade haplotípica; NC: Não Calculado.

Tabela 4. Coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p) entre a distância genética e a geográfica para dados de citocromo b (*citb*) e Fator von Willebrand (vWF).

Espécie/filogrupo	<i>citb</i>		vWF	
	r	p	r	p
<i>T. paratus</i>	-0,218	0,349	-0,177	0,395
<i>T. setosus</i>	0,896	<0,0001	0,8	0,001
<i>T. setosus outros</i>	0,576	0,029	-0,325	0,348
<i>T. panema</i>	0,011	0,94	-0,04	0,828
<i>T. panema outros</i>	0,393	0,029	0	0,0001

Tabela 5. Estimativas do tempo de divergência em milhões de anos (Ma), desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC) para os nós datados na filogenia das espécies de *Trinomys*, usando relógio molecular relaxado para sequências do citocromo b e Fator von Willebrand.

Nós	Tempo			Época Geológica
	Divergência (Ma)	DP	95% IC	
<i>Trinomys</i> + <i>Euryzygomatomys</i> /outros	11,8	0,1	6,7-17,1	Mioceno Médio
<i>Euryzygomatomys</i> / <i>Trinomys</i>	10,6	0,09	5,7-14,9	Mioceno Superior
<i>Trinomys</i>	8,9	0,08	5,2-12,9	Mioceno Superior
<i>Trinomys setosus</i> / <i>T. paratus</i>	6,3	0,04	3,7- 9,0	Mioceno Superior
<i>Trinomys panema</i>	5,2	0,1	2,4-8,0	Plioceno Inferior
<i>Trinomys setosus</i>	3,9	0,07	1,8-6,1	Plioceno Superior
<i>Trinomys paratus</i>	3,6	0,06	1,8-5,6	Plioceno Superior

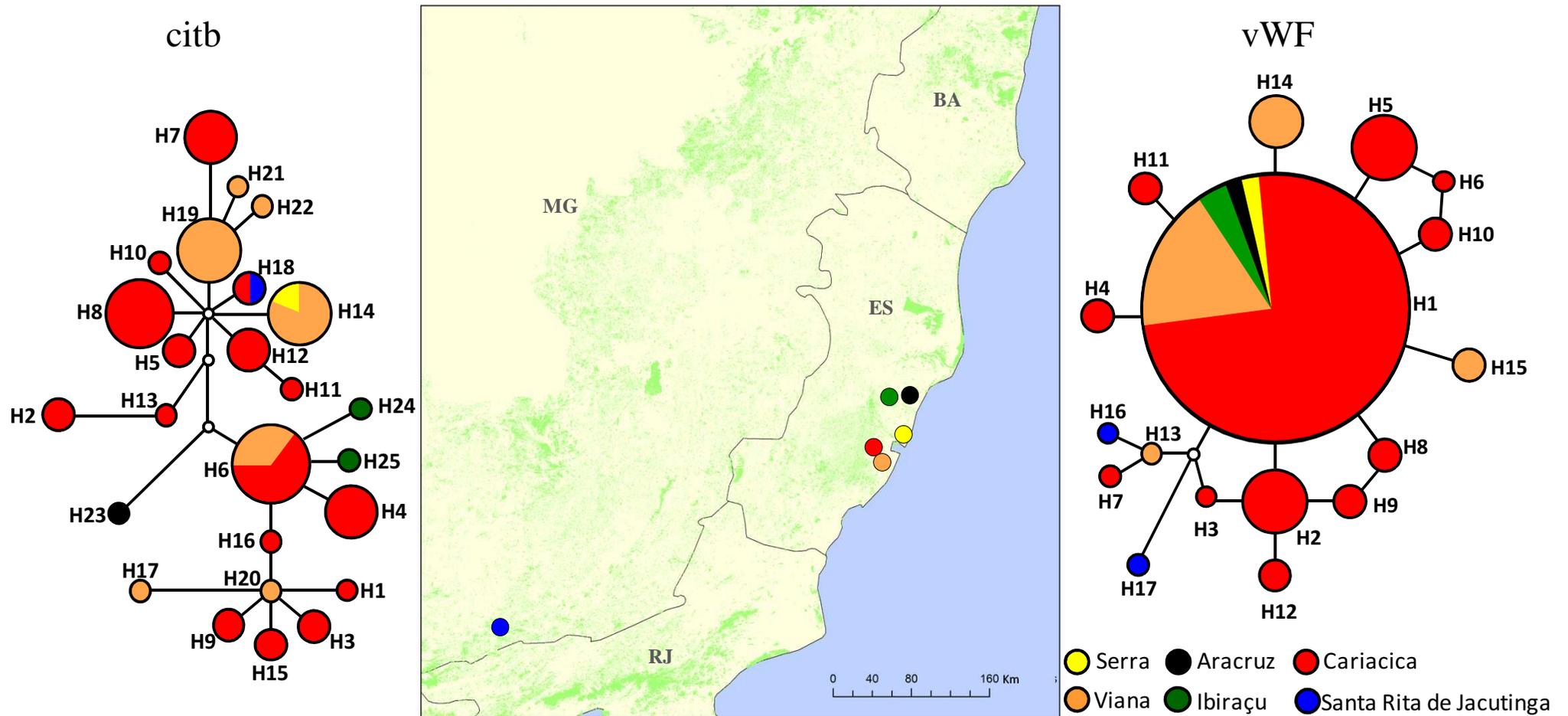


Figura 2. Rede de haplótipos de *citb* (esquerda) e *vWF* (direita) para *Trinomys paratus*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos haplótipos e dos remanescentes de Mata Atlântica em verde.

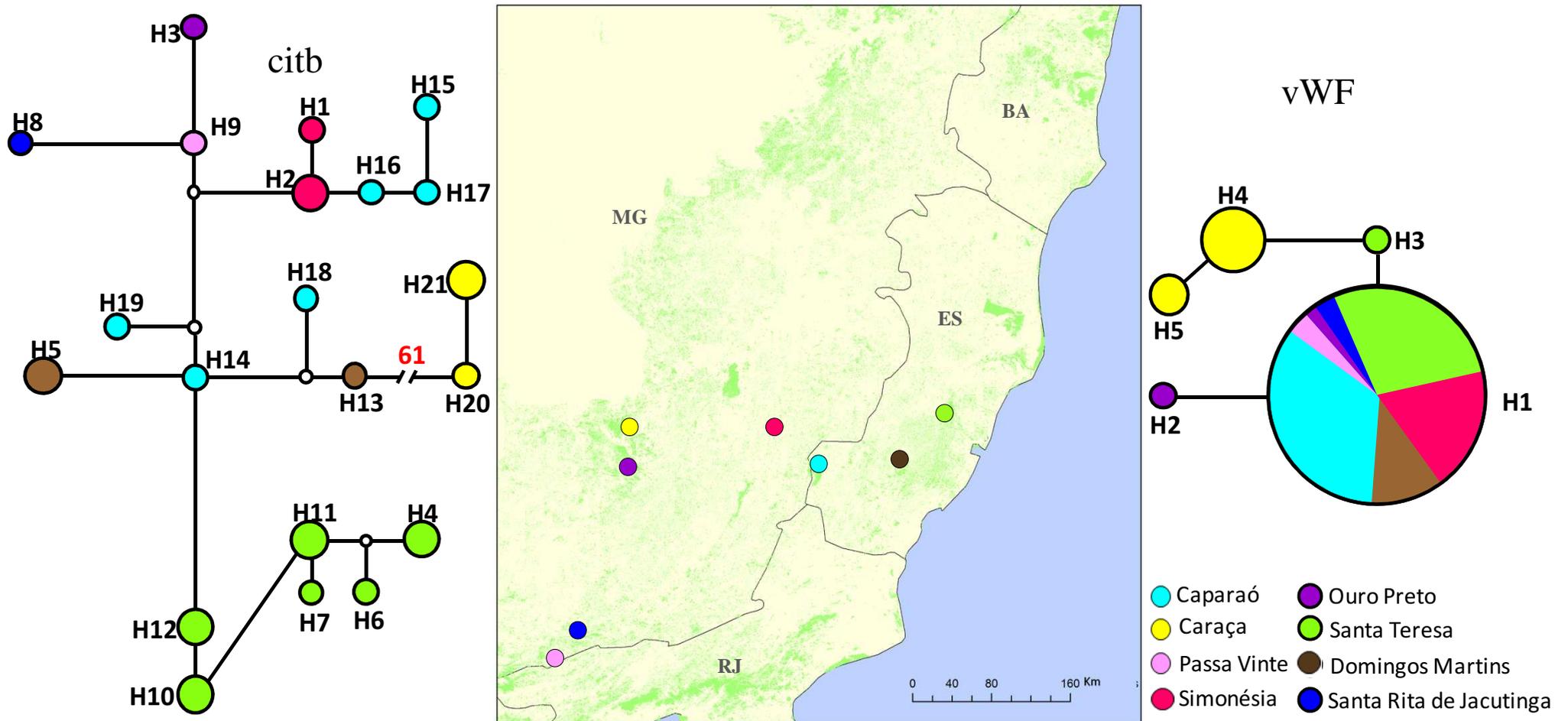


Figura 3. Rede de haplótipos de *citb* (esquerda) e *vWF* (direita) para *Trinomys panema*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos espécimes. O número entre os haplótipos H13 e H20 indica a quantidade de passos mutacionais entre eles.

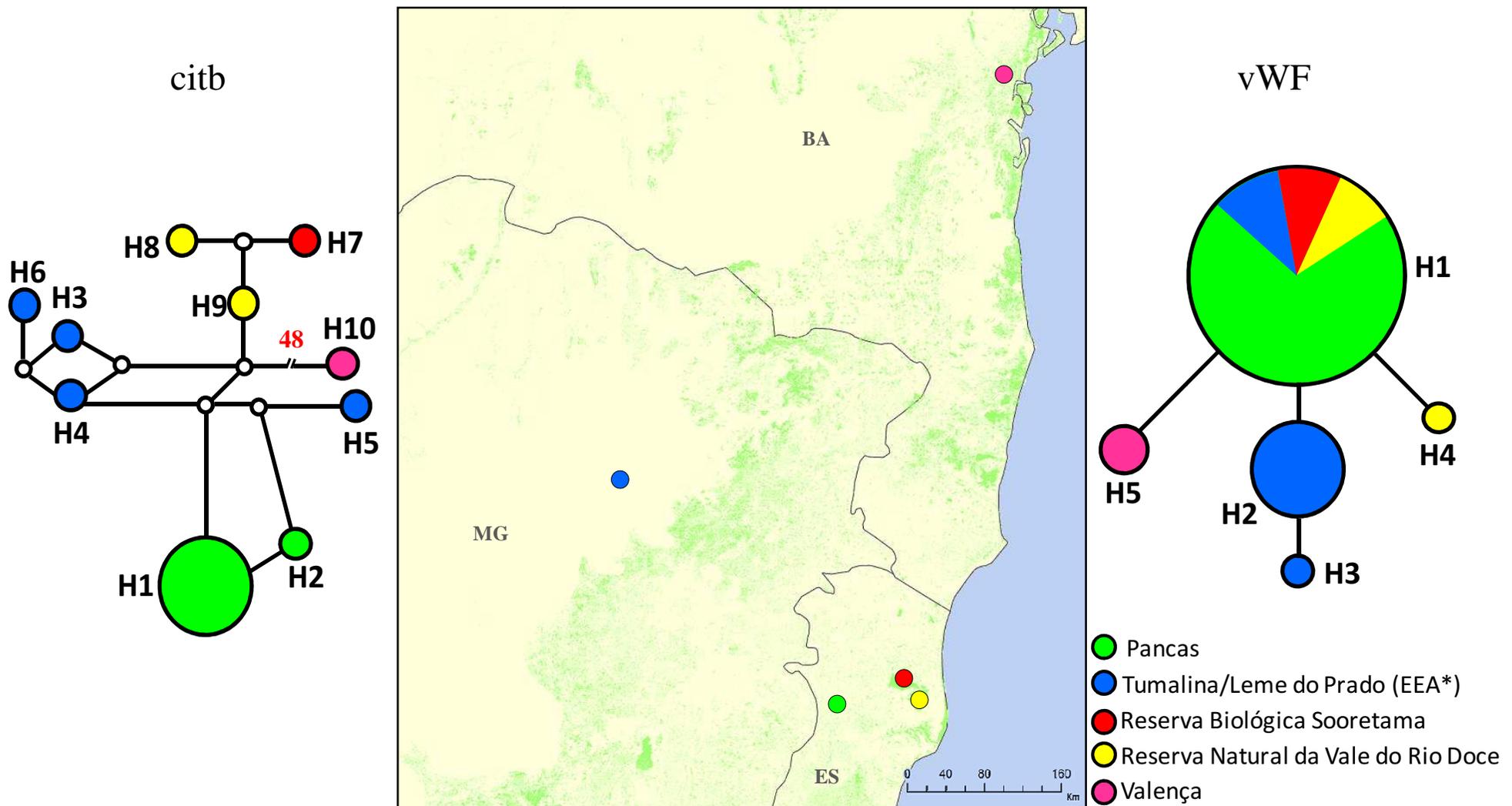


Figura 4. Rede de haplótipos de *citb* (esquerda) e *vWF* (direita) para *Trinomys setosus*. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos e aqueles de cor branca representam haplótipos extintos ou não amostrados. O comprimento das linhas que ligam os haplótipos é proporcional à quantidade de eventos de mutação e o diâmetro dos círculos é proporcional ao tamanho amostral. No centro, o mapa de distribuição dos espécimes. *EEA (Estação Ecológica de Acauã - MG). O número entre os haplótipo H10 e o intermediário (circulo branco) indica a quantidade de passos mutacionais entre eles.

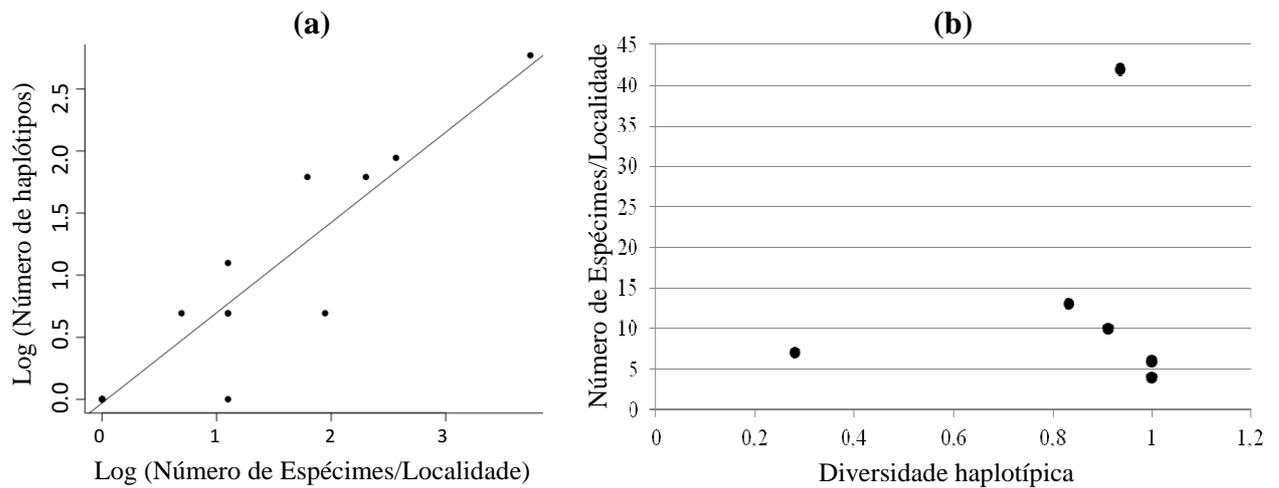


Figura 5. (a) Regressão linear simples entre o número de haplótipos e o número de espécimes de *Trinomys* spp. por localidade com dados de citb com dados logaritmizados. (b) Relação entre a diversidade haplotípica e o número de espécimes por localidade.

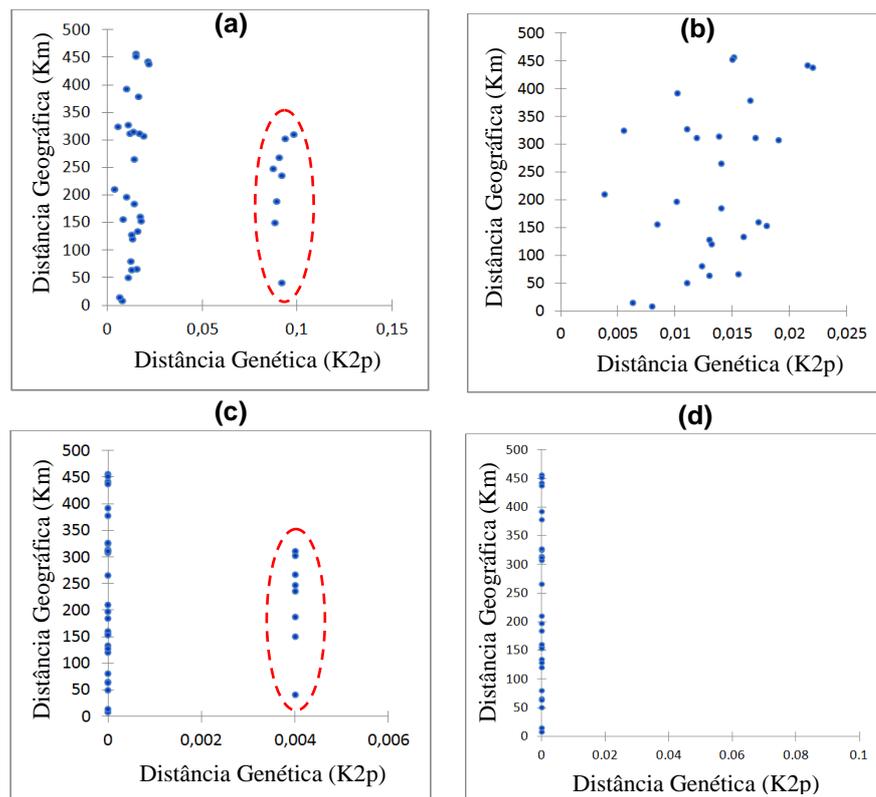


Figura 6. Relação entre distância genética e distância geográfica em *Trinomys panama* com dados de citb (a) e vWF (c) com indivíduos do Caraça (cuja comparação com os demais indivíduos encontra-se destacada em vermelho) e a mesma relação sem os espécimes dessa localidade para citb (b) e vWF (d).

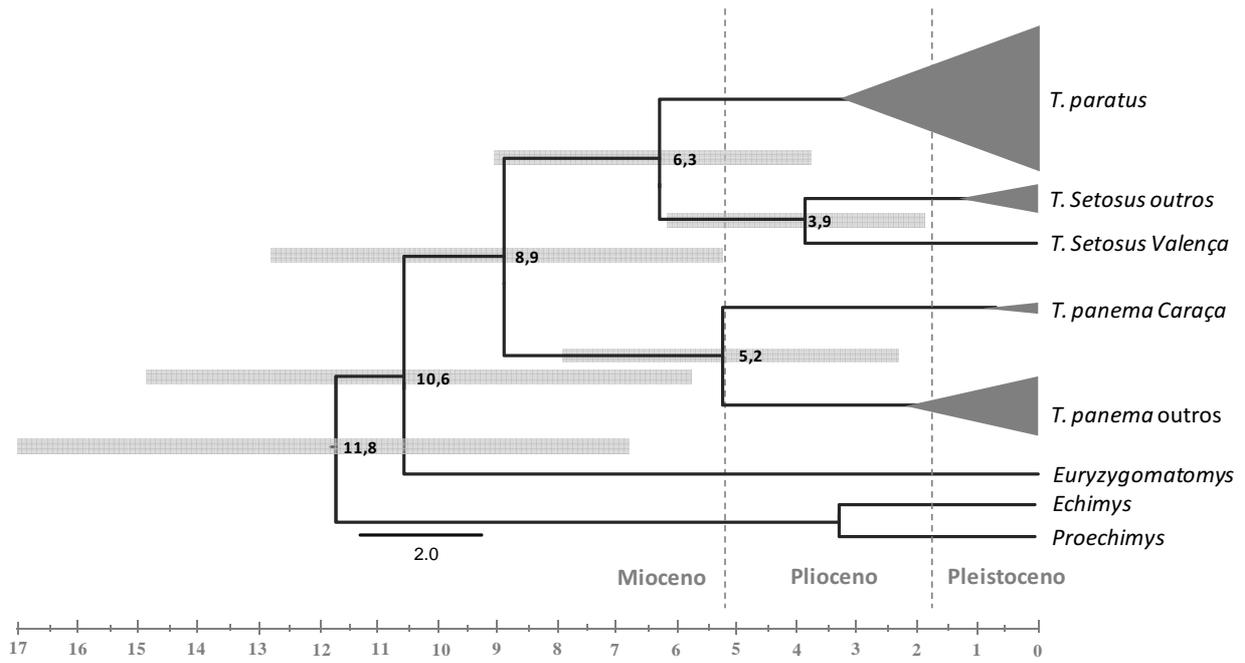


Figura 7. Árvore de inferência bayesiana de amostras de *Trinomys* datada pelo relógio molecular relaxado. Valores nos ramos indicam o tempo de divergência médio em milhões de anos entre as linhagens e as barras horizontais correspondem aos respectivos intervalos de confiança de 95%.

Apêndice I

Lista de amostras de tecidos utilizados nas análises moleculares por espécie e localidade, com respectivos números de tomo ou campo. As abreviações são explicadas em Material e Métodos.

Trinomys panema ($n = 28$): Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego, Minas Gerais, 42°04'10"W, 20°04'19"S, 1330 m (LC 185, 188, UFES 978); Custódio, 10 km SSW Ouro Preto, Minas Gerais, 43°30'W, 20°27'S, 1200 m (UFES 1078); Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo, 40°32'W, 19°57'S, 606m (LPC 1267, 1268, UFES 814, 815, LGA 185, 708); Parque Estadual Pedra Azul, Domingos Martins, Espírito Santo, 40°58'W, 20°24'S, 1179m (UFES 839, LGA 966, 967); Boqueirão, 9 km NNE Santa Rita de Jacutinga, Minas Gerais, 40°04'W, 22°04'S, 740 m (UFES 878); Fazenda Bené, 4 km SE Passa Vinte, Minas Gerais, 44°12'W, 22°14'S, 680 m (UFES880); Valsugana Velha, Santa Teresa, Espírito Santo, 40°36'W, 19°55'S, 700 m (LGA 35, 36); Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo, 40°42'W, 20°02'S, 740 m (LGA 880, 881); Parque Nacional do Caparaó, Ibitirama, Espírito Santo, 41°44'W, 20°23'S, 1000 m (LGA 1198, 1212, 1213, 1557, 1566, 1596); Parque Natural do Caraça; 25 Km SW Santa Bárbara, Minas Gerais, 43°30'W, 20°05'S, 1300 m (UFES 920, 1091, 1096). *Trinomys paratus* ($n = 60$): Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, Espírito Santo, 40°31'19"W, 20°16'52"S, 550 m (UFES 385-387, 575, 577-611, LPC 1012); Reserva Biológica de Duas Bocas, Alto Alegre, Cariacica, Espírito Santo, 40°25'W, 20°16'S, 60 m (LGA 379, 595); Fazenda Boa Baixa, Viana, Espírito Santo, 40°27'W, 20°23'S, 28 m (UFES 619, 617, 625, 626, 742-749, 857); Morro da Vargem, Mosteiro Zen, Ibirajú, Espírito Santo, 40°23'3,31"W, 19°50'43,64"S, 36 m (MBML 2713, 2718); Lagoa Jacunem, Serra, Espírito Santo, 40°14'01"W, 20°10'35"S (UFES 845); Boqueirão, 9 km NNE Santa Rita de Jacutinga, Minas Gerais, 40°04'W, 22°04'S, 740 m (UFES 877); Grota, Aracruz Florestal; 12 km Aracruz, Espírito Santo, 40°10'28"W, 19°48'46"S, 40 m (UFES 904). *Trinomys setosus* ($n = 15$): Reserva Biológica de Sooretama, Sooretama, Espírito Santo, 40°6'28"W, 18°59'16"S, 70 m (YL 710); Reserva Natural da Vale do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo, 40°4'8"W, 19°8'40"S, 60 m (TAX 09, 11); Valença, Bahia, 39°04'02"W, 13°22'25"S (VAL 25); Mata da Pedra do Camelo, Pancas, Espírito Santo, 40°47'49"W, 19°14'15"S, 135 m (UFES 254-258, 120, 121); Estação Ecológica de Acauã, Leme do Prado, Minas Gerais, 42°46'W, 17°08'S, 800 m (UFES 111, 938, 939, 1113).