

**Biogeografia de *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia;
Sigmodontinae): integração entre modelos de nicho ecológico e
filogeografia**

ARIELLI FABRÍCIO MACHADO

Manaus, Amazonas

Agosto de 2015

ARIELLI FABRÍCIO MACHADO

**Biogeografia de *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia;
Sigmodontinae): integração entre modelos de nicho ecológico e
filogeografia**

ORIENTADORA: MARINA ANCIÃES

Coorientadora: Maria Nazareth Ferreira Da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Biologia (Ecologia).

Manaus, Amazonas

Agosto de 2015

Banca examinadora do trabalho

Nome (Instituição)

Dr. Rafael do Nascimento Leite (INPA)

Dr. Igor Luis Kaefer (UFAM)

Dr. Fabricio Beggiato Baccaro (UFAM)

Parecer

Aprovado com Distinção e Louvor

Aprovado com Distinção e Louvor

Aprovado com Distinção e Louvor

M149b Machado, Arielli Fabrício
Biogeografia de *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia;
Sigmodontinae): integração entre modelos de nicho ecológico e
filogeografia / Arielli Fabrício Machado. --- Manaus: [s.n.], 2015.
vii, 35 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientador : Marina Anciães.

Coorientador: Maria Nazareth Ferreira da Silva.

Área de concentração: Ecologia.

1. Roedor.
 2. *Hylaeamys megacephalus*.
 3. Diversificação.
- I.Título

CDD 599.32

Sinopse:

A filogeografia de *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia; Sigmodontinae) foi investigada, avaliando a importância dos fatores históricos e ecológicos na diversificação das linhagens do grupo integrando filogenética, filogeografia e modelos de nicho ecológico.

Palavras-chave: Diversificação, vicariância, dispersão, roedor, Amazônia, Cerrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia por proporcionar o aprendizado e vivência na Amazônia. Ao CNPQ pela bolsa de mestrado. A minha orientadora Dra. Marina Anciães, pela excelente orientação, difusão de conhecimentos e ter estado presente em todas as etapas deste estudo. E a coorientadora Dra. Maria Nazareth Ferreira da Silva, por ensinar-me sobre sistemática e filogenética de roedores na Amazônia e conduzir-me ao grupo de mamíferos do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), possibilitando meu aprendizado em genética e a realização deste estudo.

Agradeço a equipe do Laboratório de Biologia Evolutiva e Comportamento Animal (LABECA), pelo apoio, troca e carinho dos colegas. A equipe do LEGAL pelo carinho e auxílio, principalmente ao Me. Mário S. Nunes, pela colaboração e dedicação em ensinar-me técnicas moleculares da teoria à prática. A Dra. Izeni P. Farias pela colaboração, revisão e auxílio no financiamento do estudo. Ao projeto Sisbiota, a Coleção de Mamíferos do INPA, Coleção de Mamíferos da UnB, Dra. Cláudia Regina da Silva e Dr. Rogério Vieira Rossi pela disponibilização de amostras de tecido. A Dra. Fernanda Werneck e ao Dr. Andrew Townsend Peterson, pelo excelente trabalho de revisão primordial para o direcionamento deste estudo. Aos Drs. Igor L. Kaefer, Rafael N. Leite e Fabrício B. Baccaro, membros da banca da Defesa Pública, pelas excelentes sugestões e revisões. Ao Me. Marcelo A. dos Santos Jr. e Dr. Gabriel C. Costa pelo auxílio no aprendizado das técnicas de modelagem de nicho ecológico.

Aos amigos Ma. Cristiane F. Marks, Ma. Camila D. Ritter e Me. Cleuton L. Miranda pela ajuda no aprendizado de análises e revisões do texto, importantíssimas para a conclusão do mesmo. À minha pequena grande família, minha mãe, Joseane Medeiros Fabrício, e meus avós, José Luís Ferreira Fabrício da Silva e Zaira Maria Medeiros Fabrício, por todo apoio e incentivo desde sempre em minha dedicação aos estudos e crescimento profissional, por estarem sempre presentes com muito amor e carinho. Ao meu amor, Daniel Saavedra Griott pelo imenso apoio ao longo desses anos, por todo o seu amor e dedicação em meu bem-estar, seu apoio e companhia foram essenciais para minhas escolhas e conclusão deste trabalho. Não só agradeço como dedico a vocês o fruto do meu trabalho!

RESUMO

Fatores históricos e ecológicos influenciam na distribuição e diversificação das espécies. *Hylaeamys megacephalus* é um roedor que apresenta linhagens divergentes entre o norte e sul do rio Amazonas e também no Cerrado. Estudos prévios sugeriram diversificação alopátrica entre o norte e sul do rio Amazonas e parapátrica entre o sul da Amazônia e Cerrado. Investigamos a história evolutiva da espécie e as hipóteses de diversificação sugeridas para suas linhagens, integrando filogeografia e modelos de nicho ecológico (ENMs). Utilizando um marcador mitocondrial, construímos uma árvore filogenética e uma rede de haplótipos, estimando tempo de divergência, demografia histórica, áreas de distribuição ancestral e eventos de dispersão e vicariância. Rodamos ENMs para a espécie e suas linhagens projetando-os para o passado. Avaliamos a similaridade de nicho ecológico e corredores de habitat entre as linhagens. Nossos resultados corroboram a existência das três linhagens e revelam compartilhamento de haplótipos apenas entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado. Todas as linhagens divergiram por vicariância durante o Pleistoceno, porém indivíduos com haplótipos relacionados divergiram por dispersão e vicariância. Houve baixa similaridade de nicho entre o norte e sul da Amazônia, mas alta entre sul e Cerrado. Corroboramos diversificação vicariante para o norte da Amazônia, associado ao estabelecimento do rio Amazonas. Porém, devido à ampla distribuição ancestral da espécie, sugerimos que fatores ecológicos também tenham influenciado neste processo, causando variação ecológica entre norte e sul da Amazônia antes do surgimento da barreira. Quanto às linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado, estudos prévios sugeriram diversificação parapátrica, entretanto, estas linhagens apresentaram alta similaridade ecológica e o modelo de especiação parapátrica requer variação seletiva. Sugerimos que estas linhagens divergiram pelo surgimento do rio Xingu, passando por eventos sucessivos de dispersão e vicariância causados pela alteração do curso deste rio durante o Pleistoceno.

Palavras-chave: Diversificação, roedor, Amazônia, Cerrado, vicariância, dispersão.

ABSTRACT

Historical and ecological factors affect distribution and diversification of species. *Hylaeamys megacephalus* is a rodent from Amazonian forests and Cerrado, with distinctive lineages to the north and south of Amazonas River. Previous studies suggested allopatric divergence by the Amazonas River for northern Amazonia, and parapatric between southern Amazonia and Cerrado. We investigated the evolutionary history of the species integrating phylogeography and ecological niche models (ENMs). Through cytochrome b mitochondrial gene, we constructed a phylogenetic tree, haplotype network, estimating divergence time, historical demography, ancestor areas and dispersion and vicariance events. We ran ENMs of the species and its lineages, projecting it to the past. We analyzed niche similarity and habitat corridors. Our results show the three structured lineages, revealing sharing haplotypes only between south of the Amazon and Cerrado. All lineages diverged by vicariance in Pleistocene, however individuals with associated haplotypes diverged by dispersion and vicariance. We found low niche similarity between northern and southern Amazonia, but high between southern Amazonia and Cerrado. We corroborate vicariant diversification in northern Amazonia, associated with the establishment of Amazon river. However, due to the wide distribution of ancestral species, we suggest that environmental factors have also influenced this process, causing ecological variation between north and south of the Amazon before the rise of the barrier. About the lineages of the southern Amazon and Cerrado, previous studies have suggested diversification Parapatric, however, these lines showed high similarity ecological and model Parapatric Speciation requires selective variation. We suggest that these lineages diverged by the emergence of Xingu River, going through successive dispersion and vicariance events caused by change of the river's water level during the Pleistocene.

Key-words: Diversification, rodent, Amazon, dry forest, vicariance, dispersion.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
APRESENTAÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	2
Objetivo Geral.....	2
Objetivos específicos.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
Capítulo 1.....	4
ABSTRACT.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
<i>Área de estudo</i>	<i>8</i>
<i>Coleta de dados.....</i>	<i>8</i>
<u>Registros de ocorrência.....</u>	<u>8</u>
<u>Amostras de DNA.....</u>	<u>9</u>
<u>Variáveis ambientais.....</u>	<u>10</u>
<i>Modelos de nicho ecológico.....</i>	<i>10</i>
<u>Tratamento dos dados.....</u>	<u>10</u>
<u>Construção dos modelos de nicho ecológico.....</u>	<u>12</u>
<i>Análise dos dados.....</i>	<i>13</i>
<u>Análises filogenéticas.....</u>	<u>13</u>
<u>Análises filogeográficas.....</u>	<u>14</u>
<u>Análises pós-modelos de nicho ecológico.....</u>	<u>14</u>
Resultados.....	15
<i>Filogenética.....</i>	<i>15</i>
<i>Filogeografia.....</i>	<i>16</i>
<i>Modelos de nicho ecológico.....</i>	<i>17</i>
Discussão.....	18
Conclusão.....	21
Agradecimentos.....	21
Referências bibliográficas.....	22
Tabelas.....	27
Figuras.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Registros de ocorrência de *Hylaeamys megacephalus* (x) e das suas linhagens baseadas no gene do citocromo b (pontos verde-escuro, vermelhos e amarelos representando: “Norte da Amazônia”, “Sul da Amazônia” e “Cerrado”, respectivamente). Linhas azuis representam grandes rios da Bacia Amazônica. Área em verde claro representa o bioma da Floresta Amazônica, em rosa de transição Amazônia-Cerrado e em bege o bioma do Cerrado.

Figura 2. Árvore filogenética Bayesiana calibrada baseada no gene Cytb e reconstrução de área ancestral de *Hylaeamys megacephalus*. Em verde: linhagem do norte da Amazônia; rosa: sul da Amazônia; amarelo: Cerrado. Eixo representa a escala de tempo de 0 (presente) até 4.5 milhões de anos, com intervalos de 250 mil anos. Círculos coloridos representam áreas ancestrais (marrom = norte da Amazônia + sul da Amazônia + Cerrado, azul = sul da Amazônia + Cerrado, azul petróleo = norte da Amazônia + Cerrado, verde = norte da Amazônia, rosa = sul da Amazônia, amarelo = Cerrado). Barras coloridas à direita representam as áreas de ocorrência atual (barra verde = norte da Amazônia, rosa = sul da Amazônia, amarela = Cerrado). Letras à esquerda dos círculos representam os eventos de diversificação: V = vicariância; D = dispersão.

Figura 3. Análise Bayesiana Skyline Plot (BSP) mostrando a demografia histórica das linhagens de *Hylaeamys megacephalus*: (A) do Norte da Amazônia, (B) sul da Amazônia e (C) Cerrado. Eixo y representa o tamanho populacional e eixo x a escala de tempo em milhões de anos (Ma).

Figura 4. Rede de haplótipos de *Hylaeamys megacephalus*. Em verde, linhagem do norte da Amazônia. Em vermelho e amarelo, linhagens do sul da Amazônia e Cerrado, respectivamente. Círculo vermelho com 1/3 amarelo representa compartilhamento de um haplótipo entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado. Tamanho dos círculos representa o número de haplótipos compartilhado variando de 1 a 3.

Figura 5. Modelos de nicho ecológico de: a) *Hylaeamys megacephalus*, b) linhagem do norte da Amazônia (N=23), c) linhagem do sul da Amazônia (N=20) e d) linhagem do Cerrado (N=21). A escala indica a probabilidade de condições adequadas para ocorrência, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

Figura 6. Modelos de nicho ecológico das linhagens de *Hylaeamys megacephalus* para o presente (a. linhagem do norte da Amazônia; b. sul da Amazônia; c. Cerrado) projetados para períodos do tempo passado: Último Máximo Glacial (LGM) (d. linhagem do norte da Amazônia; e. sul da Amazônia; f. Cerrado) e Último Máximo Interglacial (LIG) (g. linhagem do norte da Amazônia; h. sul da Amazônia; i. Cerrado). A escala indica a probabilidade de condições adequadas para a ocorrência, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

Figura 7. Corredores de menor custo (LCCP) baseado no modelo de nicho ecológico de *Hylaeamys megacephalus* a) entre localidades e b) entre haplótipos. (▲) Linhagem do norte da Amazônia, (■) sul da Amazônia e (●) do Cerrado. Linhas em escala branco, cinza e preto representam a densidade dos corredores detalhada na legenda. A escala no canto inferior direito indica a probabilidade de condições adequadas para a ocorrência da espécie, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

APRESENTAÇÃO

Biogeografia é a ciência que estuda o padrão de distribuição geográfica das espécies. Filogeografia é um sub-ramo da biogeografia que busca compreender os processos e mecanismos responsáveis pelo padrão de distribuição dos táxons estreitamente relacionados (Avice, 2000). Para compreender a distribuição geográfica das espécies, é preciso pensar no espaço geográfico como um espaço ambiental, onde cada espécie ocupa um espaço que contém condições ambientais adequadas para a sobrevivência e manutenção das suas populações (Pearson, 2010). Dessa forma, a distribuição geográfica de uma espécie pode ser relacionada com o nicho ecológico desta, uma vez que o nicho ecológico é representado pelo conjunto de variáveis ambientais que permite a persistência da espécie em uma área (Hutchinson, 1957). Modelos de nicho ecológico (ENMs - *Ecological niche models*) são ferramentas que revelam a distribuição potencial das espécies através das variáveis ambientais dos pontos de ocorrência conhecidos, prevendo que elas são capazes de persistir em áreas com equivalência ambiental, e assim, também acessam informações a cerca do nicho ecológico potencial, também conhecido como nicho fundamental (Phillips *et al.*, 2006; Pearson, 2010).

Hylaeamys megacephalus (Fischer, 1814) é uma espécie de roedor da subfamília Sigmodontinae, a qual apresenta ampla radiação no Neotrópico e um grande número de espécies com diversas variações morfológicas e ecológicas (Eisenberg e Redford, 1999; Prado e Percequillo, 2013). Essa espécie de hábito terrestre (Mares *et al.*, 1986; Nitikman e Mares, 1987) e ampla distribuição geográfica na América do Sul, uma das maiores do gênero *Hylaeamys*, ocorre em florestas desde a Amazônia até o Cerrado e Mata Atlântica (Prado e Percequillo, 2013). A taxonomia do seu gênero foi revisada recentemente por Weksler *et al.* (2006). *H. megacephalus* pertencia anteriormente ao gênero *Oryzomys* (Musser *et al.*, 1998), onde estavam agrupadas as espécies *O. yunganus* (Thomas, 1902) e *O. laticeps* (Lund, 1840), correspondentes a *H. yunganus* e *H. laticeps*, e o complexo *O. "capito"*, o qual incluía *O. megacephalus* e *O. perenensis* (Allen, 1901), correspondentes a *H. megacephalus* e *H. perenensis*. Através de dados genéticos e morfológicos, Weksler *et al.* (2006) revelaram a relação polifilética de *Oryzomys*, dividindo-o em outros gêneros, entre eles, *Hylaeamys* no qual *H. megacephalus* foi reconhecida como espécie válida e irmã de *H. perenensis* e *H. laticeps*.

Estudos prévios baseados em genes mitocondriais revelaram um padrão filogeográfico interessante para *H. megacephalus*, com três linhagens distintas, sendo duas localizadas ao norte e sul do rio Amazonas, e outra em florestas do Cerrado (Miranda *et al.*, 2007; Nunes, 2011). Miranda *et al.* (2007) sugeriram diversificação alopátrica para a linhagem do norte da Amazônia, através do rio Amazonas como barreira, e diversificação parapátrica por gradiente ecológico entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado. Apesar disso, nenhum estudo antes do presente testou tais hipóteses. Dessa forma, investigamos a filogeografia de *H. megacephalus* avaliando as hipóteses de diversificação sugeridas para suas linhagens.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a história evolutiva de *Hylaeamys megacephalus* avaliando as hipóteses de diversificação sugeridas para as linhagens desta espécie.

Objetivos específicos

- I) Investigar a filogenética e filogeografia das linhagens de *H. megacephalus*;
- II) Estimar o grau de similaridade de nicho ecológico entre as linhagens dessa espécie;
- III) Associar fatores históricos e ecológicos à diversificação das linhagens dessa espécie, considerando a filogeografia histórica e a ecologia destas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado-Serrano, D. F.; Knowles, L. L. 2014. Ecological niche models in phylogeographic studies: applications, advances and precautions. **Molecular Ecology Resources**, 14: 233–248.
- Avise, J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15.
- Chan, L. M.; Brown, J. L.; Yoder, A. D. 2011. Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59: 523–537.
- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding remarks. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 22: 415-427.
- Kozak, K. H.; Graham, C. H.; Wiens, J. J. 2008. Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 23(3): 141-148.
- Miranda, G. B.; Miranda-Andrades, J.; Oliveira, L. F. B.; Langguth, A.; Mattevi, M. S. 2007. Geographic patterns of genetic variation and conservation consequences in three South American rodents. **Biochemical Genetics**, 45: 839-856.
- Nunes, M. S. 2011. Filogeografia comparativa e diversidade genética de espécies do gênero *Hylaeamys* (Rodentia: Sigmodontidae). Dissertação. PPG em Biodiversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas.
- Pearson, R. G. 2010. Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. **Lessons in conservation**, 3: 54-89.
- Phillips, S. J.; Anderson, R. P.; Schapire R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, 190: 31-259.
- Weksler, M.; Percequillo, A. R.; Voss, R. S. 2006. Ten new genera of Oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). **American Museum of Natural History**, 3537: 29 pp.

Machado, A. F.; Nunes, M. S.; da Silva, M. N. F.; Farias, I. P.; Silva, C. R.; Santos Jr., M. A.; Anciães, M. **Diversification process of *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia, Sigmodontinae) integrating ecological niche modeling and phylogeography.** Manuscrito formatado segundo as regras do periódico *Molecular Ecology*.

Diversification process of *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia; Sigmodontinae) integrating ecological niche modeling and phylogeography

Arielli F. Machado^{1*}, Mario S. Nunes², Cláudia R. da Silva³, Marcelo A. dos Santos Jr.¹, Izeni P. Farias², Maria N. F. da Silva⁴, Marina Anciães⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André Araújo 2936, Aleixo, Manaus, AM 69060-001, Brazil.

² Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, INPA, Avenida André Araújo 2936, Aleixo, Manaus, AM 69.060-000, Brazil.

⁴ Coordenação de Biodiversidade e Coleções Zoológicas, INPA, Av. André Araújo 2936, Aleixo, Manaus, AM 69060-001, Brazil.

*Corresponding author: Arielli F. Machado, INPA, Av. André Araújo 2936, Aleixo, Manaus, AM 69060-001, Brazil.

E-mail: ariellifm@gmail.com

ABSTRACT

Historical and ecological factors affect distribution and diversification of species. *Hylaeamys megacephalus* is a rodent from Amazonian forests and Cerrado, with distinctive lineages to the north and south of Amazonas River. Previous studies suggested allopatric divergence by the Amazonas River for northern Amazonia, and parapatric between southern Amazonia and Cerrado. We investigated the evolutionary history of the species integrating phylogeography and ecological niche models (ENMs). Through cytochrome b mitochondrial gene, we constructed a phylogenetic tree, haplotype network, estimating divergence time, historical demography, ancestor areas and dispersion and vicariance events. We ran ENMs of the species and its lineages, projecting it to the past. We analyzed niche similarity and habitat corridors. Our results show the three structured lineages, revealing sharing haplotypes only between south of the Amazon and Cerrado. All lineages diverged by vicariance in Pleistocene, however individuals with associated haplotypes diverged by dispersion and vicariance. We found low niche similarity between northern and southern Amazonia, but high between southern Amazonia and Cerrado. We corroborate vicariant diversification in northern Amazonia, associated with the establishment of Amazon river. However, due to the wide distribution of ancestral species, we suggest that environmental factors have also influenced this process, causing ecological variation between north and south of the Amazon before the rise of the barrier. About the lineages of the southern Amazon and Cerrado, previous studies have suggested diversification Parapatric, however, these lines showed high similarity ecological and model Parapatric Speciation requires selective variation. We suggest that these lineages diverged by the emergence of Xingu River, going through successive dispersion and vicariance events caused by change of the river's water level during the Pleistocene.

Key-words: Diversification, rodent, Amazon, dry forest, vicariance, dispersion.

Introdução

Diversos fatores históricos e ecológicos, como variações climáticas, topográficas, latitudinais, bióticas (competição ou mutualismo) e/ou eventos geomorfológicos, podem influenciar na distribuição geográfica das espécies, assim como levar à especiação quando esses fatores desencadeiam processos de diversificação, extinção e/ou dispersão (Endler, 1982; Ricklefs, 2004; Cox e Moore, 2005; Wiens, 2011). A filogeografia investiga os processos e mecanismos responsáveis pelo padrão de distribuição dos táxons estreitamente relacionados, integrando diversas áreas como filogenética, genética de populações, demografia histórica, paleogeografia e paleontologia (Avise, 2009). Nos últimos anos, modelos de nicho ecológico (ENMs - *Ecological niche models*) também têm sido utilizados com muito sucesso em estudos filogeográficos, pois permitem a integração entre dados genéticos, espaciais e ambientais auxiliando na compreensão do papel dos processos históricos e ecológicos sobre os mecanismos de diversificação, além de possibilitar o teste de hipóteses de diversificação (Kozak *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2011).

A Floresta Amazônica é considerada a floresta tropical mais diversa do mundo, conforme evidenciado pelas suas áreas de endemismo (Cracraft, 1985; Borges e Da Silva, 2012). Diversas hipóteses biogeográficas foram sugeridas para explicar a diversificação das espécies na Amazônia. A hipótese dos rios sugere especiação alopátrica através do surgimento dos rios como barreira geográfica. Ela foi proposta originalmente por Wallace (1854) e aceita para explicar a diversificação de aves (Ribas *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2014) e primatas da Amazônia (Ayers e Clutton-Brock, 1992; Boubli *et al.*, 2014). A hipótese dos refúgios, proposta por Haffer (1969), sugere diversificação alopátrica por isolamento devido à fragmentação das florestas úmidas durante as flutuações climáticas do Pleistoceno. Esta hipótese foi considerada para explicar a diversificação de borboletas na Amazônia (Garzón-Orduña *et al.*, 2014). Já a hipótese de gradientes, proposta por Endler (1982), sugere especiação parapátrica, sem isolamento ou barreira geográfica, através da adaptação a diferentes pressões seletivas em um ambiente contínuo que varia em clima.

Hylaeamys megacephalus (Fischer, 1814) é uma espécie de roedor que apresenta um padrão filogeográfico interessante, com três linhagens distintas, sendo duas localizadas ao norte e sul do rio Amazonas, e outra nas florestas do Cerrado (Miranda *et al.*, 2007; Nunes, 2011). Miranda *et al.* (2007) sugeriram diversificação alopátrica para a linhagem do norte da Amazônia, considerando o rio Amazonas uma barreira; e diversificação parapátrica por

gradiente ecológico para as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado. Apesar disso, nenhum estudo antes do presente testou tais hipóteses de diversificação sugeridas para as linhagens dessa espécie.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a filogeografia de *H. megacephalus* e as hipóteses de diversificação para suas linhagens por meio de uma abordagem integrativa entre filogeografia e modelos de nicho ecológico. Este estudo contribui para a melhor compreensão da estruturação genética e ecologia da espécie, assim como do papel dos fatores ecológicos e históricos na biogeografia e diversificação das suas linhagens. Além disso, disponibiliza um número significativo de dados genéticos para a espécie, contribuindo para estudos futuros.

Material e Métodos

Área de estudo

A área de estudo corresponde à área de distribuição geográfica conhecida para a espécie *H. megacephalus*. Esta espécie é amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo nas Guianas, Suriname, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Brasil, onde habita florestas úmidas da Amazônia e Florestas Estacionais Semidecíduais do interior do Brasil e norte do Paraguai (Prado e Percequillo, 2013). Definimos a área de estudo selecionando um quadrante abrangendo toda a área de distribuição desta espécie, mais uma área adicional localizada pelo menos a 100 km de distância dos pontos de ocorrência mais externos. Esta área resultou em um retângulo localizado entre as coordenadas geográficas 12°N e 29°S de latitude, e 71°W 30' e 34°W de longitude (Figura 1).

Coleta de dados

Registros de ocorrência

Reunimos registros de ocorrência para a espécie *H. megacephalus* encontrados na base de dados speciesLink (<http://splink.cria.org.br/>) e literatura. Extraímos as coordenadas geográficas de cada registro, assim como informações adicionais. Identificamos os registros que possuíam dados moleculares de sequências de DNA do gene mitocondrial do citocromo b (Cytb) disponíveis na base de dados genéticos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Incluímos também em nosso banco de dados, registros de ocorrência referentes às amostras de tecido sequenciadas no presente estudo.

Amostras de DNA

Utilizamos amostras de tecido de espécimes depositados na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Universidade Federal de Brasília (UnB) e Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). As etapas de coleta de dados genéticos foram realizadas no Laboratório de Evolução e Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas (LEGAL/UFAM).

Extraímos o DNA seguindo o protocolo de fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Amplificamos e sequenciamos o gene mitocondrial do Cytb. O DNA mitocondrial animal é uma excelente ferramenta para análises filogeográficas, principalmente intraespecíficas, pois é um gene não recombinante que apresenta altas taxas de mutação, permitindo uma visualização clara das divergências maternas (Harrison, 1989). Para amplificação e sequenciamento dos segmentos de DNA, utilizamos os *primers*: OryzCytbF1 e OryzCytbR1, MVZ 05 e MVZ 16 (Smith e Patton, 1993), todos seguindo a ordem 5' para 3'.

A amplificação foi feita pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis e Faloona (1987). Para isso, utilizamos um volume final de 13 μL , contendo: 5,2 μL de ddH₂O; 1,5 μL de MgCl₂ (25mM); 1,25 μL de dNTP (2,5 mM); 1,25 μL de 10X Tampão (100mM Tris-HCl, 500mM KCl); 1 μL do *primer* OryzCytbF1 (0,2 μM); 1 μL do *primer* OryzCytbR1 (0,2 μM); 0,8 μL de Taq DNA Polimerase (5 U/ μl) e 1 μl de DNA genômico. A amplificação consistiu em 30 ciclos compostos pelos seguintes passos: 1 minuto a 94°C; 1 minuto e 30 segundos a 57°C; e 1 minuto a 72°C, sendo estes precedidos por um passo inicial de 5 minutos a 94°C para a homogeneização da temperatura do bloco e seguidos por um passo final de 10 minutos, a 72°C para polimerização de eventuais moléculas das quais a polimerase tenha se dissociado antes do final da síntese total do fragmento. O tamanho e a concentração dos produtos da amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando 2 μL do volume final da reação e 2 μL de corante fluorescente GelRed (Uniscience) e observado sob luz ultravioleta, com a utilização do transiluminador Image Master (Pharmacia Biotech).

A purificação do produto amplificado foi realizada com a adição de Polietilenoglicol (PEG, 1 g/mL) misturado, incubado a 37°C por 15 minutos, centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. A reação de sequenciamento foi feita empregando o método desenvolvido por

Sanger *et al.* (1977) utilizando 2 μL dos produtos amplificados e purificados, 3,2 μL de ddH₂O, 0,3 μL de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 2,5 μL de tampão do Big Dye e 2 μL de *primer* (10 μM). As reações foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: 96 °C por 1 minuto, 30 ciclos de: 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador ABI e as sequências obtidas foram editadas no programa Geneious 7.0 (Kearse *et al.*, 2012). Neste mesmo programa, alinhamos as sequências por meio de uma extensão para o programa MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*).

Variáveis ambientais

Reunimos camadas digitais de variáveis ambientais com dados contínuos, de precipitação, temperatura e altitude, em formato raster. Utilizamos variáveis com resolução de pixel de cerca de 5 km², equivalentes a 2.5 arcos de minutos, considerando adequada para *H. megacephalus*, visto que roedores de hábito e porte semelhantes podem utilizar áreas de vida com mais de 1 km² (Bergallo e Magnusson, 2004). Também utilizamos variáveis ambientais paleoclimáticas estimadas para períodos passados como Último Interglacial (LIG, ~120 mil anos atrás) e Último Máximo Glacial (LGM, ~21 mil anos atrás), referentes ao modelo CCSM4 (*Community Climate System Model*). Todas as camadas foram obtidas através da base de dados online do WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005).

Modelos de nicho ecológico

Tratamento dos dados

Os registros de ocorrência das espécies geralmente encontram-se agrupados em regiões que apresentam maior esforço amostral, o que pode resultar em localidades espacialmente correlacionadas. Diversos estudos tem utilizado uma técnica para reduzir este efeito, filtrando espacialmente os pontos de ocorrência através da exclusão de localidades muito próximas uma das outras (Pearson *et al.*, 2007; Anderson e Raza, 2010; Radosavljevic e Anderson, 2013; Boria *et al.*, 2014). Estes estudos mostram que a filtragem espacial dos pontos reduz os efeitos de sobreajuste (*overfitting*) nos modelos de distribuição de espécies. *Overfitting* ocorre quando o modelo se ajusta muito aos dados de calibração e, assim, não consegue prever de forma independente a acurácia dos dados (Radosavljevic e Anderson, 2013). Com isso, os pontos de ocorrência da espécie e suas linhagens foram filtrados espacialmente no programa *Geographic Distance Matrix Generator* 1.2.3 (Ersts, 2015),

calculando a distância geográfica entre cada par de localidades. Foi considerado um limiar de 10 km de distância entre si e aleatoriamente, uma das localidades correlacionadas foi excluída. Foram mantidas apenas pares de localidades de margens opostas de rios, quando estas correspondiam a “píxeis” com diferentes valores para cada variável ambiental. Devido ao número reduzido de pontos de ocorrência com dados genéticos para a linhagem do sul da Amazônia, foram incluídos pontos de ocorrência adicionais, sem dados genéticos, oriundos da literatura e registros de museus, localizados dentro de um polígono criado com os pontos conhecidos desta linhagem e mesma bacia hidrográfica ou interflúvios.

A área de estudo (*background*) foi selecionada através do corte das camadas de variáveis ambientais, amostrando uma área de menor extensão geográfica possível abrangendo a distribuição geográfica da espécie. A redução da extensão da área de estudo em modelagem de distribuição de espécies diminui os erros de omissão nos modelos (Anderson e Raza, 2010). Erros de omissão são as predições falsas negativas e ocorrem quando um modelo não consegue prever uma área em que a espécie ocorre (Pearson, 2010). Por fim, todas as camadas foram cortadas nas extensões: x mínimo -71.5, x máximo -34 (equivalentes a 71°W 30' e 34°W), y mínimo -29 e y máximo 12 (12°N e 29°S) no programa ArcMap (ArcGIS 10.2.2, ESRI, Redlands, CA). Ainda com este programa, convertemos as camadas para o formato .asc (ASCII - *American Standard Code for Information Interchange*), necessário para análises posteriores de similaridade de nicho.

O nível de correlação entre as variáveis foi testado utilizando uma matriz de correlação de Pearson no programa ENMTools (Warren *et al.*, 2010). Seguindo o mesmo procedimento utilizado por Rissler e Apodaca (2007), para a construção dos modelos finais foram mantidas apenas variáveis não correlacionadas (considerando o limiar de correlação 0.75; $r > 0.75$) e de alta relevância biológica para a espécie. Para investigar a relevância biológica de cada variável para a espécie e suas linhagens, foram gerados modelos MaxEnt preliminares incluindo todas as variáveis e a contribuição destas foi avaliada através dos resultados do gráfico *Jackknife*. O *Jackknife* gera um modelo com cada uma das variáveis de maneira isolada (*with only variable*) e outro excluindo esta (*without variable*) (Phillips, 2006), revelando a perda e o ganho dos modelos com ou sem esta variável.

Por fim, foram selecionadas oito variáveis ambientais, não correlacionadas entre si e de alta relevância para a espécie e cada uma das suas linhagens, dentre as quais, sete foram variáveis bioclimáticas e uma topográfica: bio4 = *Temperature Seasonality (standard*

*deviation *100*), bio6 = *Min Temperature of Coldest Month*, bio14 = *Precipitation of Driest Month*, bio15 = *Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)*, bio16 = *Precipitation of Wettest Quarter*, bio18 = *Precipitation of Warmest Quarter*, bio19 = *Precipitation of Coldest Quarter* e alt = *Altitude*.

Construção dos modelos de nicho ecológico

Através dos pontos de ocorrência da espécie e das linhagens reveladas através das análises filogenéticas preliminares, associados aos dados de variáveis ambientais não correlacionadas e de alta relevância biológica para este grupo, foi construído um ENM para espécie *H. megacephalus* (considerando todos os pontos de ocorrência espacialmente filtrados) e um ENM para cada uma das linhagens desta espécie (considerando os pontos de ocorrência espacialmente filtrados de cada linhagem).

Os ENM's foram construídos através do algoritmo de máxima entropia (MaxEnt) rodado pelo programa MAXENT versão 3.3.3k (Phillips *et al.*, 2007). MaxEnt é um algoritmo que realiza previsões ou inferências a partir de um conjunto de dados com informações incompletas (apenas dados de presença) baseando-se no princípio de máxima entropia, assumindo que a melhor aproximação para uma distribuição de probabilidades desconhecida é aquela que satisfaz qualquer restrição à sua distribuição (Phillips *et al.*, 2006; Elith *et al.*, 2011). Devido à escassez de estudos em longo prazo que coletem dados de ausência confiáveis para as espécies, MaxEnt se torna um algoritmo adequado e muito utilizado atualmente, além disso, este algoritmo tem maior sucesso para gerar modelos a partir de um número reduzido de pontos de ocorrência (Elith *et al.*, 2011), como é o caso do presente estudo para as linhagens de *H. megacephalus*.

Os modelos foram gerados com 10 réplicas independentes e 25% dos pontos (k) foram utilizados para teste através do método bootstrap. Bootstrap é um método recomendado para números reduzidos de dados de ocorrência, pois seleciona aleatoriamente do banco de dados original, um número de dados para teste (k) substituindo-os, de forma que o mesmo registro da ocorrência pode ser incluído para teste mais de uma vez (Pearson, 2010). O formato de saída (*output*) escolhido para a apresentação do resultado dos modelos gerados foi o cumulativo, no qual a probabilidade de cada píxel para adequabilidade do ambiente em relação à ocorrência da espécie é representada variando de 0 (representando condições inadequadas) a 100 (máxima adequabilidade) (Phillips *et al.*, 2006).

Os modelos gerados foram projetados para tempos passados, como o Último Interglacial (LIG, ~120 mil anos atrás) e Último Máximo Glacial (LGM, ~21 mil anos atrás), utilizando as variáveis paleoclimáticas correspondentes às variáveis selecionadas para geração dos modelos para o presente. Adicionando a variável de altitude para o presente, devido a falta de modelos de simulação para o passado desta variável ambiental, considerando que os níveis de altitude não variaram durante este período até o presente.

Análise dos dados

Análises filogenéticas

Foi reconstruída uma árvore filogenética de Inferência Bayeseana com todas as sequências de Cytb da espécie *H. megacephalus* (*ingroup*) incluindo como grupo externo (*outgroup*) as espécies *H. acritus*, *H. laticeps*, *H. yunganus*, *H. perenensis* e *Oecomys trinitatus*. O modelo evolutivo mais apropriado para a reconstrução filogenética de *H. megacephalus* foi estimado através do critério de informação de Akaike corrigido (AICc) no programa JModeltest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo HKY+G apresentou melhor valor de AICc. A árvore filogenética foi reconstruída através do método de Inferência Bayeseana no programa BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012), utilizando 613 pares de bases e nenhuma base não lida (*missing data*), através do modelo evolutivo HKY+G, gerando 10^7 gerações de cadeias de Markov (MCMC) e excluindo 25% das rodadas iniciais (*'burnin'*).

Estimamos o tempo de divergência entre as linhagens através do modelo de relógio molecular relaxado não correlacionado (*Lognormal relaxed clock - uncorrelated*) e modelo de especiação de Yule (*Yule Process pure-birth*) (Drummond *et al.*, 2002). A taxa de substituição utilizada foi de $0.066 \text{ sítios}^{-1}/\text{Ma}^{-1}$, equivalente a uma taxa de 13.1% de divergência/ Ma^{-1} , referente à média calculada por Weksler *et al.* (2010) para os gêneros de roedores *Lemmus* (0.038; Galbreath e Cook, 2004) e *Microtus* (0.093; Triant e DeWoody, 2007) da subfamília Arvicolinae, pertencente a família Cricetidae, mesma família a qual pertence *H. megacephalus*, espécie foco do presente estudo. Leite *et al.* (2014) estimaram a divergência entre *Hylaeamys* e *Oecomys* para 3.5 Ma, utilizamos esta data como critério de informação para calibração do ancestral comum mais recente (MRCA - *most recent common ancestor*) deste nó, considerando uma distribuição normal e um desvio padrão de 0.5 (*Stdev*).

A demografia histórica das linhagens de *H. megacephalus* também foi investigada através da análise Bayeseana Skyline Plot (BSP) também no BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*,

2012). Este método estima o tamanho das populações ao longo do tempo (Drummond *et al.*, 2005). Para esta análise foi utilizada a mesma base de dados utilizada para gerar a árvore filogenética de Inferência Bayeseana, e 10^7 MCMC, excluindo 25% das rodadas iniciais ('burnin'). O resultado foi visualizado no programa Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013). A partir da identificação das linhagens de *H. megacephalus*, reveladas pela árvore filogenética, calculamos as distâncias genéticas entre as linhagens pelo programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Análises filogeográficas

Foi construída uma rede de haplótipos através do método de máxima verossimilhança no programa Haploview (Barrett *et al.*, 2005), nomeando cada sequência de acordo com sua ocorrência biogeográfica, a qual dividimos em: norte da Amazônia, sul da Amazônia e Cerrado. As redes de haplótipos são uma ferramenta filogeográfica importante onde cada haplótipo representa uma sequência única e indivíduos que compartilham haplótipos possuem sequências idênticas. Elas geralmente representam os haplótipos em círculos e o número de passos mutacionais que os separam em linhas cortadas ou conectadas por nós. O diâmetro dos círculos corresponde ao número de indivíduos que compartilham um mesmo haplótipo. Elas permitem a associação dos dados genéticos a dados geográficos e ilustram de forma mais clara as relações entre os haplótipos amostrados (Gehring *et al.*, 2012).

Utilizando a árvore filogenética de Inferência Bayeseana, estimamos as áreas de distribuição ancestral e os eventos de diversificação entre os clados através da análise estatística de dispersão e vicariância (S-DIVA) no programa RASP 3.1 (Yu *et al.*, 2010). RASP (Reconstrução do Estado Ancestral em Filogenias) é uma ferramenta útil para reconstruir histórias evolutivas em filogenias de inferência bayeseana, revelando a probabilidade de cada gama de área ancestral possível para cada nó. O método utiliza análises de parcimônia com base numa matriz de custo tridimensional, revelando também os eventos de diversificação para os nós (Yu *et al.*, 2010).

Análises pós-modelos de nicho ecológico

O desempenho dos modelos foi avaliado através do parâmetro pré-definido conhecido como área abaixo da curva (AUC - *Area Under the Curve*), considerando adequados apenas os modelos com $AUC > 0.7$ (Warren e Seifert, 2011). Para testar a similaridade de nicho ecológico entre as linhagens de *H. megacephalus*, utilizamos os modelos de nicho ecológico

destas para calcular a sobreposição de nicho ecológico através do índice de similaridade de Schoener D (Schoener, 1968) e índice I (derivado da distância de Hellinger) no programa ENMTools 1.4.3 (Warren *et al.*, 2010).

Utilizando o modelo de nicho ecológico gerado para a espécie, ou seja, considerando todos os pontos de ocorrência espacialmente filtrados, estimamos os corredores de habitat de menor custo (LCCP – “*Least-cost-corridors-path*”) entre todas as localidades, sem considerar as relações filogenéticas e também considerando as informações filogenéticas dos indivíduos de cada localidade (Brown, 2014). Rodamos essa análise através da ferramenta SDMToolsbox no programa ArcMap (ArcGIS 10.2.2, ESRI, Redlands, CA).

Resultados

Foram encontrados 258 pontos de ocorrência para *H. megacephalus*, dos quais, após a filtragem espacial, totalizaram 209 pontos de ocorrência representando localidades espacialmente independentes. Conseguimos reunir um total de 146 sequências de Cytb, referentes a 50 localidades, 23 para a linhagem do norte da Amazônia, 20 para a linhagem do sul da Amazônia (sendo apenas 7 localidades destas com dados genéticos) e 21 para a linhagem do Cerrado (Tabela 1, Figura 1).

Filogenética

A reconstrução filogenética revelou três linhagens distintas e geograficamente estruturadas, sendo elas: norte da Amazônia, sul da Amazônia e Cerrado. A linhagem do norte da Amazônia aparece bem diferenciada das restantes, com 7% de distância genética. As linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado apresentam 3% de distância genética entre si, e estão um pouco menos estruturadas geograficamente em relação à linhagem do norte da Amazônia, com alguns indivíduos relacionados entre essas linhagens.

O tempo de divergência entre qualquer uma das linhagens de *H. megacephalus* foi estimado para o Pleistoceno. O tempo de divergência entre a linhagem do norte da Amazônia em relação às outras linhagens foi estimado para 2.4 milhões de anos atrás (Ma), com intervalos de confiança de 95% da densidade máxima posterior (HPD) variando de 1.5 a 3.75 Ma. A divergência entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado teria ocorrido há 1.4 Ma (HPD 500 mil anos atrás (Kya) - 2.5 Ma). Os indivíduos dessas linhagens que

apresentaram haplótipo compartilhado entre as margens do rio Xingu divergiram há 194 Kya, e os indivíduos de áreas do Cerrado que apresentaram haplótipos mais relacionados com os da linhagem do sul da Amazônia divergiram desta há 262 Kya (Figura 2).

Quanto à demografia histórica, a análise BSP indicou início de expansão demográfica da linhagem do norte da Amazônia há 100 Kya, passando por um período de estabilidade entre 50 e 25 Kya e expandindo novamente a partir de 25 Kya até o presente (Figura 3a). O tamanho populacional da linhagem do sul da Amazônia teve uma expansão discreta, mas contínua, ascendendo levemente a partir de 90 Kya e de forma mais abrupta a partir de 40 Kya (Figura 3b). O resultado para a linhagem do Cerrado foi similar ao resultado obtido para a linhagem do sul da Amazônia, porém a linhagem do Cerrado apresentou expansão populacional mais ascendente iniciando a partir de 60 Kya, alcançando seu ápice em 25 Kya e estabilizando desde este período até o presente (Figura 3c).

Filogeografia

A rede de haplótipos revelou 132 haplótipos únicos agrupados em três linhagens, onde a linhagem do norte da Amazônia aparece bem definida e separada das linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado por mais de 28 passos mutacionais e não apresenta haplótipos compartilhados com estas. Apesar das linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado estarem separadas por 13 passos mutacionais, elas apresentaram um haplótipo compartilhado e oito haplótipos relacionados entre si, onde sete destes são haplótipos oriundos de áreas do Cerrado, mas que estão geneticamente relacionados com a linhagem do sul da Amazônia, aparecendo agrupados dentro desta. Apenas um dos oito haplótipos relacionados entre estas linhagens é oriundo de áreas do sul da Amazônia, mas geneticamente relacionado com a linhagem do Cerrado (Figura 4). O haplótipo compartilhado entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado pertence a localidades de margens opostas do rio Xingu, próximas a Altamira na região do baixo Xingu, e da Floresta Nacional Tapirapé-Aquiri em Carajás, área de transição entre Amazônia e Cerrado (Figura 4).

A análise de reconstrução de área ancestral indicou com maior probabilidade (74%) que o ancestral de *H. megacephalus* ocorria em toda a área de distribuição atual da espécie, ou seja, tanto no norte como no sul da Amazônia e no Cerrado (Figura 2, círculo, cor marrom). Para a reconstrução da área ancestral das linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado, a

análise apontou com maior probabilidade (74%) que os ancestrais destas linhagens ocorriam em áreas do sul da Amazônia e do Cerrado (Figura 2, círculo azul).

A análise de dispersão e vicariância indicou que a linhagem do norte da Amazônia divergiu das outras através de um evento vicariante. Assim como para a divergência entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado (Figura 2). Para a divergência do clado dos indivíduos do Cerrado que compartilham haplótipo com a linhagem do sul da Amazônia ou que apresentam haplótipos relacionados com esta, a análise indicou dispersão e vicariância, seguidas por eventos sucessivos de dispersão e vicariância. A divergência pontual entre o haplótipo compartilhado entre as margens opostas do rio Xingu (LHE510 e USNM549548) e de Carajás (PSA180) foi mediada por um evento de dispersão (Figura 2). O mesmo resultado foi obtido para a separação entre o haplótipo do sul da Amazônia que se mostrou proximamente relacionado com a linhagem do Cerrado, revelando dispersão seguida de vicariância (Figura 2).

Modelos de nicho ecológico

O modelo de nicho ecológico de *H. megacephalus* apresentou um valor de AUC alto (AUC = 0.923) e as variáveis que mais contribuíram para este modelo foram: precipitação da estação mais úmida (bio16), temperatura mínima do mês mais frio (bio6), sazonalidade da temperatura (bio4) e precipitação da estação mais quente (bio18), respectivamente. O modelo da linhagem do norte da Amazônia apresentou um dos valores mais altos de AUC (AUC = 0.983), sendo que as variáveis que mais influenciaram na sua distribuição foram precipitação da estação mais fria (bio19), temperatura mínima do mês mais frio (bio6) e precipitação do mês mais seco (bio14), respectivamente. Para a linhagem do sul da Amazônia, as variáveis que mais contribuíram para o modelo (AUC = 0.961) foram bio4 e bio16, respectivamente e para a linhagem do Cerrado, foram bio14 e bio4 (AUC = 0.953). Os modelos de nicho ecológico da espécie e cada linhagem são apresentados na Figura 6.

A projeção dos modelos para o LGM mostrou que a área de distribuição potencial para a linhagem do norte da Amazônia encontrava-se fragmentada durante este período (Figura 7a). Já a área prevista para a linhagem do sul da Amazônia durante este período foi maior que a prevista para o presente (Figura 7b). A área prevista para a ocorrência da linhagem do Cerrado durante o LGM também foi fragmentada e projetada para leste e noroeste da área prevista para o presente (Figura 7c). A projeção dos modelos para o LIG mostrou um

deslocamento para sudoeste na área de distribuição potencial da linhagem do norte da Amazônia, além de uma área menor que a prevista para o presente e LGM (Figura 7d). A projeção do modelo da linhagem do sul da Amazônia para o LIG mostrou uma redução da área de distribuição potencial, localizada mais ao sul que a prevista para o presente e LGM (Figura 7e). A projeção do modelo da linhagem do Cerrado para o LIG mostrou uma área potencial fragmentada e deslocada (Figura 7f).

As análises de sobreposição de nicho ecológico revelaram baixa sobreposição de nicho entre a linhagem do norte da Amazônia e as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado ($D = 0.179 / I = 0.450$), mas alta sobreposição entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado ($D = 0.473 / I = 0.755$) (Tabela 2). A LCCP estimou alguns corredores de habitat adequado entre as localidades, porém os corredores com maior densidade entre linhagens foram entre localidades do norte da Amazônia e do Cerrado (Figura 8a). A análise LCCP considerando as relações filogenéticas não estimou nenhum corredor de habitat adequado entre localidades do norte da Amazônia com as do sul da Amazônia ou do Cerrado. Esta análise revelou que existem alguns corredores de habitat adequado entre localidades do sul da Amazônia e do Cerrado referentes às localidades que possuem haplótipos compartilhados e/ou relacionados entre si (Figura 8b).

Discussão

Nossos resultados mostram que a linhagem do norte da Amazônia é geograficamente estruturada, acima do rio Amazonas, e separada das linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado apresentando alta distância genética em relação a estas (7%). Patton *et al.* (2000) e Costa (2003), também utilizando o gene do Cytb, encontraram valores de distância genética semelhantes para a linhagem de *H. megacephalus* do norte (5.3% e 8.7%, respectivamente). Patton *et al.* (2000) analisaram a distância genética entre diversas espécies de pequenos mamíferos, dentre os roedores destacamos a distância genética entre *H. laticeps* e *H. perenensis*, espécies do mesmo gênero da espécie foco deste estudo, que possuem apenas 3.36% de distância genética entre si.

A linhagem do norte da Amazônia também não compartilhou nenhum haplótipo em relação às outras linhagens. A S-DIVA revelou que os ancestrais de *H. megacephalus* ocupavam toda a área de distribuição atual e que essa distribuição foi interrompida por um

evento vicariante. O tempo de divergência para essa linhagem foi estimado para o início do Pleistoceno (2.4 Ma). O rio Amazonas teria surgido no Mioceno tardio (cerca de 10 Ma), com o soerguimento dos Andes, levando ao desprendimento do sistema lacustre conhecido como Lago Pebas e resultando na formação do sistema fluvial Acre, mudando o sentido da bacia amazônica antiga que começou a transcorrer de oeste para leste em direção ao Oceano Atlântico (Hoorn *et al.*, 2010). Há cerca de 7 Ma é relatada a primeira chegada de sedimentos Andinos na foz do que hoje é o rio Amazonas, porém, todos os autores concordam a drenagem moderna do rio Amazonas teria se estabelecido apenas no final do Plioceno/ início do Pleistoceno entre 7 e 2.5 Ma (Campbell *et al.*, 2006; Latubresse *et al.*, 2010; Hoorn *et al.*, 2010). Com isso, nossos resultados corroboram a hipótese de Miranda *et al.* (2007) de diversificação alopatrica para a linhagem do norte da Amazônia em relação às outras.

Nós encontramos pouca similaridade de nicho entre a linhagem do norte da Amazônia e às outras linhagens. Devido há pouca similaridade de nicho ecológico entre as linhagens do norte e sul da Amazônia e o ancestral de *H. megacephalus* apresentava ampla distribuição geográfica na Amazônia, ocupando toda a área de distribuição atual, sugerimos que fatores ecológicos também tenham contribuído para a primeira diversificação, do norte da Amazônia em relação às linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado, considerando que essa variação ecológica já existia antes do evento vicariante, antes do surgimento da barreira.

A BSP mostrou que o tamanho populacional da linhagem do norte da Amazônia manteve-se estável durante o LIG, período mais quente, começando a expandir a partir deste período e expandindo novamente a partir do LGM até o presente. O ENM desta linhagem e suas projeções para o LGM e LIG foram congruentes com a BSP, revelando que a adequabilidade do hábitat para ocorrência desta linhagem foi expandindo do passado para o presente. Com, isso concluímos que períodos mais úmidos que o presente, como o LIG, não são tão adequados para *H. megacephalus* (ver a seguir para outras linhagens), pois houve expansão populacional em períodos mais secos como o LGM até o presente.

Quanto às linhagens do Sul da Amazônia e do Cerrado, devido ao gradiente ecológico Amazônia-Cerrado, Miranda *et al.* (2007) sugeriram diversificação parapátrica para a divergência entre elas. Porém, diversificação parapátrica requer regimes de variação seletiva (Endler, 1982). Nós encontramos similaridade de nicho ecológico entre estas linhagens. O tempo de divergência entre elas foi estimado para 1.4 Ma, correspondendo também ao Pleistoceno. Nossos resultados mostraram que o ancestral comum das linhagens do sul da

Amazônia e do Cerrado ocupava ambas as áreas de distribuição atual destas (sul da Amazônia e Cerrado), indicando que elas divergiram por vicariância.

Sugerimos que o surgimento do rio Xingu possa ter sido responsável por esta diversificação, atuando como barreira ao fluxo gênico durante esse período. Ribas *et al.* (2012) encontraram resultados semelhantes para a diversificação entre *Psophia interjecta* e *P. dextralis*, espécies de aves terrestres que também se distribuem entre as margens opostas do rio Xingu. Ainda que neste estudo, o tempo de divergência entre estas espécies foi estimado para 480 Kya. Ribas *et al.* (2012) associaram tal divergência ao surgimento do rio Xingu como barreira. Além da associação feita por estes autores, não existe na literatura outra fonte de datação para o surgimento do rio Xingu. Porém, para o início do Pleistoceno são relatadas diversas mudanças geológicas na região da foz da bacia Amazônica, destacando variações no nível do mar, mudança do paleocanal do rio Tocantins, formação da Ilha de Marajó (Vital e Stattegger, 2000; Rosseti e Valeriano, 2007; Rosseti *et al.*, 2014). Considerando este contexto paleogeográfico, podemos considerar que esta região manteve-se geologicamente instável durante este período, podendo levar a formação de barreiras.

Ainda que tenhamos encontrado compartilhamento de um haplótipo entre as margens do rio Xingu, as distribuições das linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado parecem estar delimitadas por este rio (Figura 1). Assim, sugerimos que tal compartilhamento pode representar um contato secundário mais recente entre estas linhagens causado pela mudança do curso deste rio, visto que um estudo recente revelou através de imagem de satélite a existência de um paleocanal, associado a períodos recentes do Pleistoceno Superior-Holoceno (Rossetti *et al.*, 2014). Além disso, encontramos corredores de hábitat adequado conectando as localidades com haplótipos compartilhado e relacionados entre estas linhagens, como entre as regiões do sul do Mato Grosso e Carajás. Assim, esta região parece ter tido um papel importante para a dispersão entre indivíduos destas linhagens revelada no presente estudo.

Conclusão

Corroboramos a hipótese de diversificação alopátrica mediada por vicariância para a linhagem do norte da Amazônia e associada ao estabelecimento do rio Amazonas (2.5 Ma), porém devido à variação de nicho ecológico entre essa linhagem em relação às outras, e pela ampla distribuição de área ancestral, sugerimos que fatores ecológicos também tenham exercido um papel importante nessa diferenciação, existindo antes mesmo do surgimento da barreira vicariante. Refutamos a hipótese de diversificação parapátrica para as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado, visto que uma das premissas desse modelo de especiação é a variação ambiental seletiva e nós encontramos alta similaridade de nicho ecológico entre estas linhagens. Nossos resultados revelaram que no passado estas linhagens distribuíam-se em uma área contínua que foi dividida por um evento vicariante há 1.4 Ma causando a diversificação entre estas linhagens. Sugerimos que este processo de diversificação pode estar associado às mudanças geológicas ocorridas neste período na região leste da bacia Amazônica.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa ao primeiro autor. Ao INPA pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Aos Dr. Rafael N. Leite e Dr. Rogério Rossi, por fornecer amostras de tecido, e Dr. Cleuton Miranda pela revisão do texto, ajuda com a coleta de dados e discussão dos resultados. À Dra. Fernanda Werneck por sua ajuda na preparação do projeto. À Camila Duarte Ritter, Cristiane Fortes Marks e Cleuton Miranda pela ajuda em algumas análises e revisão do texto. Ao LEGAL e todas as pessoas que ajudaram no trabalho de laboratório.

Referências bibliográficas

- Anderson, R. P; Raza, A. 2010. The effect of the extent of the study region on GIS models of species geographic distributions and estimates of niche evolution: preliminary tests with montane rodents (genus *Nephelomys*) in Venezuela. **Journal of Biogeography**, 37: 1378–1393.
- Avice, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15.
- Ayers, J. M.; Clutton-Brock, T. H. 1992. River Boundaries and Species Range Size in Amazonian Primates. **The American Naturalist**, 140(3): 531-537.
- Barrett, J. C.; Fry, B.; Maller, J. D. M. J.; Daly, M. J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, 21(2), 263-265.
- Borges, S. H.; Da Silva, J. M. C. 2012. A New Area of Endemism for Amazonian Birds in the Rio Negro Basin. **The Wilson Journal of Ornithology**, 124(1):15–23.
- Boubli, J. P.; Ribas, C.; Lynch Alfaro, J. W.; Alfaro, M. E.; da Silva, M. N. F.; Pinho, G. M.; Farias, I. P. Spatial and temporal patterns of diversification on the Amazon: A test of the riverine hypothesis for all diurnal primates of Rio Negro and Rio Branco in Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 82: 400-412.
- Brown, J. L. 2014. SDMtoolbox: a python-based GIS toolkit for landscape genetic, biogeographic and species distribution model analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, 5(7): 694–700.
- Campbell Jr, K. E.; Frailey, C. D.; Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene dimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. **Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.**, 239: 166–219.
- Chan, L. M.; Brown, J. L.; Yoder, A. D. 2011. Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59: 523–537.
- Costa, L. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, 30: 71–86.
- Cox, B. C.; Moore, P. D. 2005. **Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach**, 7th edition. Blackwell Publishing, London, UK.
- Cracraft, J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. **Ornithological Monographs**, 36: 49-84.

- Cracraft, J.; Prum. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. **Evolution**, 42(3): 603-620.
- Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8), 772.
- Drummond, A. J.; Suchard, M. A.; Xie, D.; Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, 29: 1969-1973.
- Eisenberg, J. F.; Redford, K. H. 1999. **Mammals of the Neotropics**. The Central Neotropics. Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago, 3: 609 p.
- Elith, J.; Phillips, S. J.; Hastie, T.; Dudík, M.; Chee, Y. E.; Yates, C. J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. **Diversity and Distributions**, 17: 43–57.
- Endler, J. A. 1982. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. **Amer. Zool.**, 22: 441-452.
- Ersts, P. J. 2015. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed on 2015-5-20.
- Fernandes, A. M; Wink, M.; Sardelli, C.; Aleixo, A. 2014. Multiple speciation across the Andes and throughout Amazonia: the case of the spot-backed antbird species complex (*Hylophylax naevius*/*Hylophylax naevioides*). **Journal of Biogeography**, 41(6): 1094–1104.
- Garzón-Orduña, I. J.; Benetti-Longhini, J. E.; Brower, A. V. Z. 2014. Timing the diversification of the Amazonian biota: butterfly divergences are consistent with Pleistocene refugia. **Journal of Biogeography**, 41: 1631-1638.
- Gehring, P.; Pabijan, M.; Randrianirina, J. E.; Glaw, F.; Vences, M. 2012. The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 64: 618–632.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165: 131-137.
- Hansen, J.; Sato, M.; Russell, G; Kharecha, P. 2015. Climate sensitivity, sea level and atmospheric carbon dioxide. **Phil. Trans. R. Soc. A.**, 371: 20120294.
- Harrison, R. G. 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. **TREE**, 4(1): 6-11.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology** 25: 1965-1978.

- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding remarks. **Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.**, 22: 415-427.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P.; Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12): 1647-1649. Available from <http://geneious.com> Accessed on 2014-8-6.
- Kozak, K. H.; Graham, C. H.; Wiens, J. J. 2008. Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 23(3): 141-148.
- Latrubesse, E. M.; Cozzuol, M.; Silva-Caminha, S. A. F.; Rigsby, C. A.; Absy, M. A.; Jaramillo, C. 2010. The late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. **Earth Sci. Rev.**, 99: 99–124.
- Leite, R. N.; Rogers, D. S. 2013. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity & Evolution**, 13: 639-664.
- Machado, L. F.; Leite, Y. L. R.; Christoff, A. U.; Giugliano, L. G. 2013. Phylogeny and biogeography of tetralophodont rodents of the tribe Oryzomyini (Cricetidae: Sigmodontinae). **Zoologica Scripta**, 1-12 .
- Mares, M. A.; Ernest, K. A.; Gettinger, D. D. 1986. Small Mammal Community Structure and Composition in the Cerrado Province of Central Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, 2(4): 289-300.
- Mayle, F. E.; Beerling, D. J.; Gosling, W. D.; Bush, M. B. 2004. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, 359: 499–514.
- Miranda, G. B.; Miranda-Andrades, J.; Oliveira, L. F. B.; Langguth, A.; Mattevi, M. S. 2007. Geographic patterns of genetic variation and conservation consequences in three South American rodents. **Biochem. Genet.**, 45: 839-856.
- Nitikman, L. Z.; Mares, M. A. 1987. Ecology of small mammals in a gallery forest of central Brazil. **Annals of Carnegie Museum**, 56(2): 75-95.
- Nunes, M. S. 2011. Filogeografia comparativa e diversidade genética de espécies do gênero *Hylaeamys* (Rodentia: Sigmodontidae). Dissertação. PPG em Biodiversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas.

- Patton, J. L.; Da Silva, M. N. F.; Malcom, J. R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **American Museum of Natural History**, 244: 306 pp.
- Pearson, R. G. 2010. Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. **Lessons in conservation**, 3: 54-89.
- Peterson, A. T.; Soberón, J.; Sánchez-Cordero, V. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. **Science**, 285: 1265-1267.
- Phillips, S. 2006. A Brief Tutorial on Maxent. **AT&T Research**, 107-135.
- Phillips, S. J.; Anderson, R. P.; Schapire R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, 190: 31-259.
- Phillips, S. J.; Dudík, M.; Schapire, R. E. 2007. Maxent software for species habitat modeling. Version 3.3.3k. Available from <https://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>. Accessed on 2014-10-1.
- Prado, J. R.; Percequillo, A. R. 2013. Geographic distribution of the genera of the tribe Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in South America: patterns of distribution and diversity. **Arquivos de Zoologia**, 44(1): 1-120
- Ribas, C. C.; Aleixo, A.; Nogueira, A. C. R.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proc. R. Soc. B**, 279: 681-689.
- Ricklefs, R. E. 2004. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. **Ecology Letters**, 7: 1-15.
- Rissler, L. J.; Apodaca, J. J. 2007. Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). **Systematic Biology**, 56(6): 924-942.
- Schoener, T. W. 1968. The *Anolis* lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. **Ecology** 49: 704-726.
- Smith, M. F.; Patton, J. L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of the Linnean Society**, 50: 149-177.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 2725-2729.
- Wallace, A. R. 1854. On the monkeys of the Amazon. **Proc. Zool. Soc. Lond.**, 20: 107-110.

- Weksler, M.; Percequillo, A. R.; Voss, R. S. 2006. Ten new genera of Oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). **American Museum of Natural History**, 3537: 29 pp.
- Weksler, M.; Lanier, H. C.; Olson, L. E. 2010. Eastern Beringian biogeography: historical and spatial genetic structure of singing voles in Alaska. **Journal of Biogeography**, 37: 1414–1431.
- Werneck, F. P.; Gamble, T.; Colli, G. R.; Rodrigues, M. T.; Sites, J. W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American ‘dry diagonal’: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. **Evolution**, 66: 3014–3034.
- Wesselingh, F. P.; Räsänen, M. E.; Irion, G.; Vonhof, H. B.; Kaandorp, R.; Renema, W.; Romero Pittman, L.; Gingras, M. 2002. Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia. **Cainozoic Res.**, 1: 35–81.
- Wiens, J. J. 2011. The causes of species richness patterns across space, time, and clades and the role of “ecological limits”. **The Quarterly Review of Biology**, 86 (2): 75-96.
- Yu, Y.; Harris, A. J.; He, X. J. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): a tool for inferring biogeographic histories. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56: 848-850.

Tabelas

Tabela 1. Pontos de ocorrência de indivíduos de *Hylaeamys megacephalus* geneticamente amostrados através de sequências de mtDNA (gene citocromo b). Num = código da localidade; Accession = número de acesso no Genbank.

Num	Longitude	Latitude	Localidade	País	Voucher	Accession
1	-56.1666667	3.9333333	Geyskes Creek, Saramacca	Suriname	CM76933	AF251517
2	-59.1500000	7.5666667	Surama, Rupununi	Guiana	ROM97979	AF251518
3	-61.1333333	5.0333333	San Ignacio de Yuruani, Bolivar	Venezuela	MHNLS8061	EU579499
4	-57.2133000	-1.7140111	FLOTA de Faro esq rio Nhamunda, PA	Brasil	CN20 e 51	-
5	-55.5223000	-0.9627694	FLOTA Trombetas prox rio curua, PA	Brasil	CN77,90,126	-
6	-58.6959000	1.2854194	ESEC Grao Para norte, Oriximina, PA	Brasil	CN219	-
7	-55.7285000	0.6302806	ESEC Grao Para central, Oriximina, PA	Brasil	CN302	-
8	-53.2363000	-0.9439722	FLOTA Paru, Almerim, PA	Brasil	CN252, 280	-
9	-59.4088889	-1.7833333	ReBio do Uatuma, Balbina, AM	Brasil	MLOB1-106	-
10	-61.3830556	-1.7666667	Esq. rio Negro, Lago do Meduinin, AM	Brasil	JLP16813	-
11	-61.4872222	-1.9650000	Dir. foz do rio Jau, AM	Brasil	JLP16773	-
12	-58.2400000	-2.0500000	Dir. rio Jatapú, Comunidade São João, AM	Brasil	CTGA43 e 46	-
13	-62.1330556	-2.0666667	Esq. rio Jaú, Macaco, AM	Brasil	JLP16731	AF251516
14	-51.8500000	-0.8833000	RESEX Cajari, AP	Brasil	RC12	-
15	-52.6779000	-0.5054000	Esq. rio Jari, Itapeuara, AP	Brasil	UHE70-71	-
16	-51.5879440	1.3080910	FloNa Amapá, Igarapé do Braço, AP	Brasil	FL16	-
17	-52.6500000	1.8400000	PN Montanhas Tucumaque, rio Anacuí, AP	Brasil	AP230 e 232	-
18	-51.6193000	0.9670000	FloNa Amapá, rio Falsino PPBio plot, AP	Brasil	KC09-145	-
19	-53.6660000	-1.5933333	Prainha, PA	Brasil	PRA05	-
20	-64.7891667	1.2252778	Serra do Tapirapecó, AM	Brasil	MNRJ56828,35	-
21	-56.7869444	-1.4828500	Dir. rio Trombetas, Trombetas, PA	Brasil	CTG540	-
22	-56.7472222	-1.4218611	Esq. Rio Trombetas, Trombetas, PA	Brasil	CTGA637	-
23	-51.9890200	2.1933300	PN Montanhas Tucumaque, rio Mutum, AP	Brasil	AP186	-
24	-55.1502000	-1.5503000	Rio Mamiá, Curuá, PA	Brasil	MM16	-
25	-52.7500000	-3.6666667	Esq. rio Xingu, Altamira, PA	Brasil	USNM549548	AF108695
26	-63.4666667	-8.7500000	Rio Jamari, RO	Brasil	AL2757	EF455026
27	-60.2522100	-12.715440	Fazenda do Sr. Élsio Rossi, Vilhena, RO	Brasil	MN70000	KF815441
28	-52.3666670	-3.6500000	52 km SSW Altamira, dir. rio Xingu, PA	Brasil	LHE510	AF251519
29	-55.2930556	-11.588972	Faz. Continental, Cláudia, MT	Brasil	TS5,SIN16,APS31	-
30	-58.2197222	-9.8452778	Rio Jurena, Faz. São Nicolau, Cotriguaçu, MT	Brasil	MSN01-24	-
31	-58.5475000	-8.9166667	Rio S. João da Barra, Nova Bandeirantes, MT	Brasil	UTP30-1009	-
32	-55.7000000	-24.516667	Paraguay	Paraguai	GD463	AY275124
33	-46.1000000	-14.483333	3 km E de Mambaí, GO	Brasil	MN36172	EF455028
34	-48.2166667	-13.516667	Serra da Mesa, GO	Brasil	MN36738	EF455031
35	-48.6166667	-17.733333	Ipameri, GO	Brasil	MN37814	EF455033
36	-50.0900000	-9.4700000	Dir. rio Araguaia, PE do Cantão, Pium, TO	Brasil	RGR15	KP027738
37	-50.1200000	-9.9600000	Rio Javaés, PE do Cantão, Pium, TO	Brasil	RGR30	KP027739
38	-50.0400000	-9.9800000	Rio Javaés, PE do Cantão, Pium, TO	Brasil	RGR111	KP027742

39	-50.1400000	-9.6500000	Dir. rio Araguaia, PE do Cantão, Pium, TO	Brasil	RGR267	KP027746
40	-49.9800000	-9.3700000	Rio Coco, PE do Cantão, Caseara, TO	Brasil	RGR286	KP027747
41	-49.7300000	-10.8800000	Ipucas, Lagoa da Confusão, TO	Brasil	RGR158	KP027745
42	-50.1800000	-9.7400000	Esq. rio Araguaia, Santana do Araguaia, PA	Brasil	RGR394	KP027748
43	-48.6400000	-11.8400000	Esq. rio Tocantins, Peixe, TO	Brasil	LPC713	KP027757
44	-51.9300000	-12.6400000	Ribeirão Cascalheira, MT	Brasil	LPC734	KP027758
45	-47.9700000	-15.7300000	Parque Nacional de Brasília, DF	Brasil	UNB2310-13	-
46	-50.2741028	-0.4166667	Ilha de Marajó, PA	Brasil	MAJ06 e 24	-
47	-49.3827778	-8.2975000	Faz. Cabeceira, Conceição do Araguaia, PA	Brasil	RNL73	-
48	-47.8897222	-15.955833	Reserva Ecológica do Roncador, DF	Brasil	RNL144,153	-
49	-47.6851360	-17.927787	Serra do Facão, Catalão, GO	Brasil	UNB2830-2838	-
50	-50.5000000	-5.8000000	FloNa Tapirapé-Aquiri, Carajás, PA	Brasil	PSA02-208 CS3	-

Tabela 2. Sobreposição de nicho ecológico entre as linhagens de *Hylaeamys megacephalus*. I = índice I, derivado da distância de Hellinger. D = índice de distância de Shoener.

I / D	Norte	Sul	Cerrado	Sul+Cerrado
Norte	1	0.341207	0.166975	0.178067
Sul	0.639567	1	0.473546	0.556925
Cerrado	0.436705	0.755435	1	0.851936
Sul+Cerrado	0.449724	0.818686	0.981071	1

Figuras

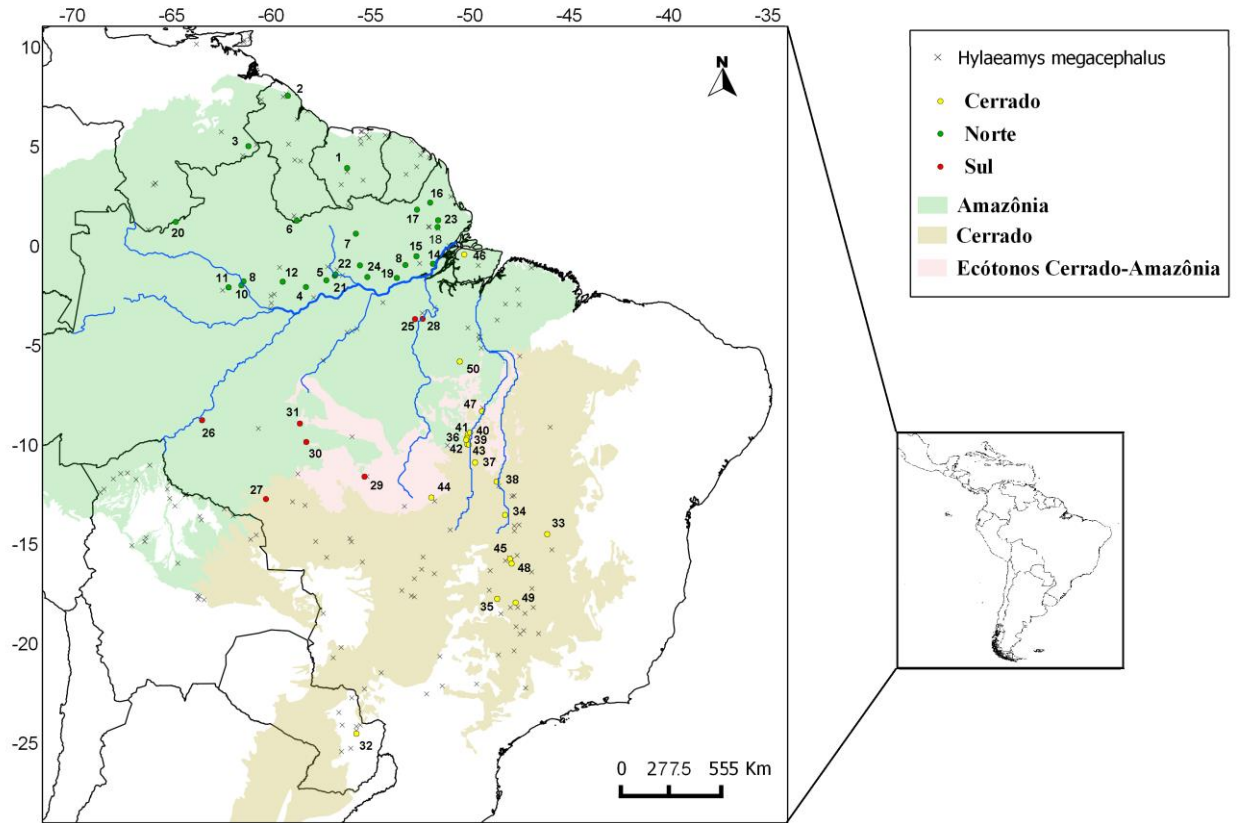


Figura 1. Registros de ocorrência de *Hylaeamys megacephalus* (x) e das suas linhagens baseadas no gene do citocromo b (pontos verde-escuro, vermelhos e amarelos representando: “Norte da Amazônia”, “Sul da Amazônia” e “Cerrado”, respectivamente). Números representam os códigos de localidade (detalhados na Tabela 1). Linhas azuis representam grandes rios da Bacia Amazônica. Área em verde-claro representa o bioma da Floresta Amazônica, em rosa transição Amazônia-Cerrado e bege bioma Cerrado.

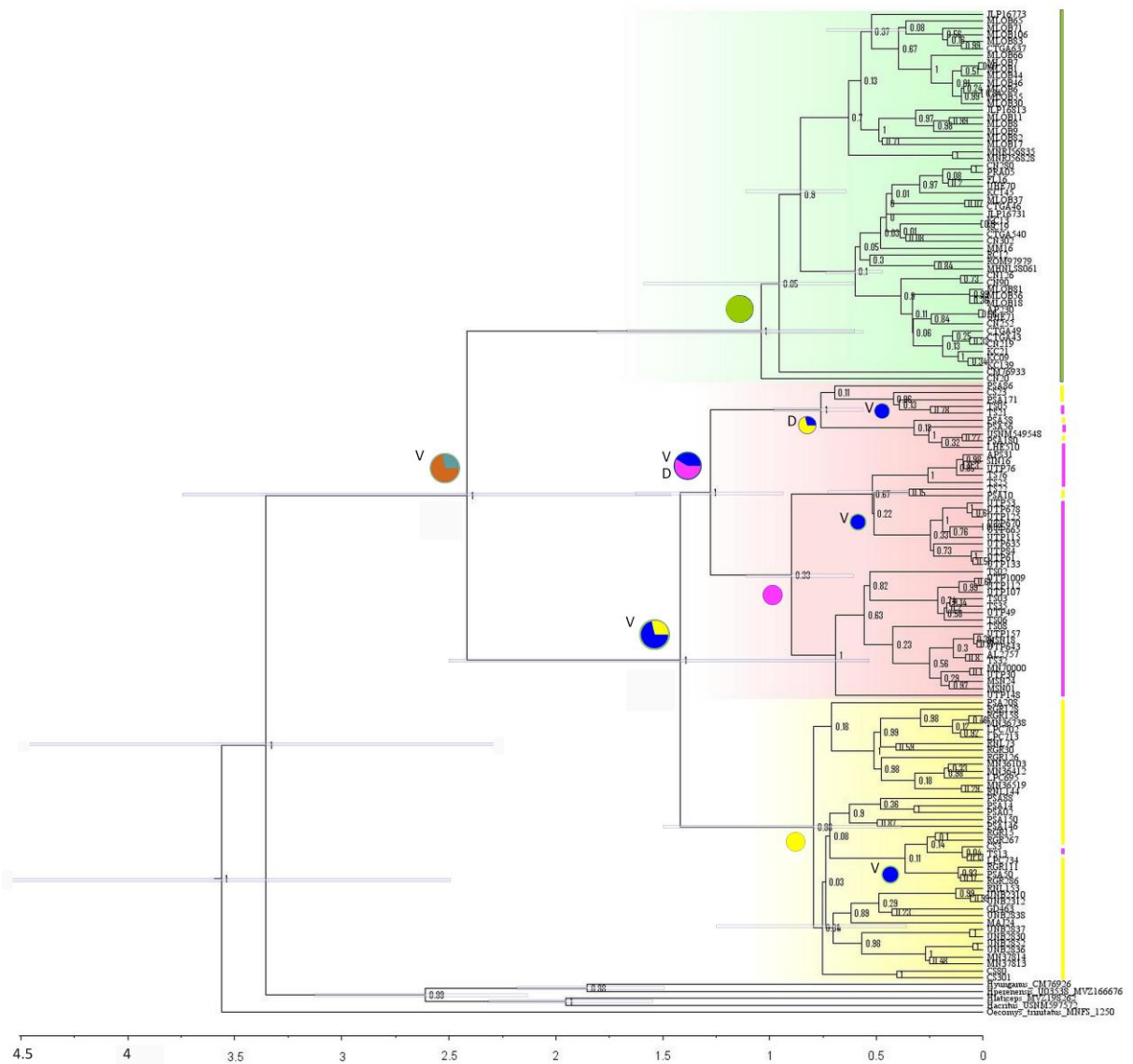


Figura 2. Árvore filogenética Bayesianamente calibrada baseada no gene *Cytb* e reconstrução de área ancestral de *Hylaeamys megacephalus*. Em verde: linhagem do norte da Amazônia; rosa: sul da Amazônia; amarelo: Cerrado. Eixo representa a escala de tempo de 0 (presente) até 4.5 milhões de anos, com intervalos de 250 mil anos. Círculos coloridos representam áreas ancestrais (marrom = norte da Amazônia + sul da Amazônia + Cerrado, azul = sul da Amazônia + Cerrado, azul petróleo = norte da Amazônia + Cerrado, verde = norte da Amazônia, rosa = sul da Amazônia, amarelo = Cerrado). Barras coloridas à direita representam as áreas de ocorrência atual (barra verde = norte da Amazônia, rosa = sul da Amazônia, amarela = Cerrado). Letras à esquerda dos círculos representam os eventos de diversificação: V = vicariância; D = dispersão.

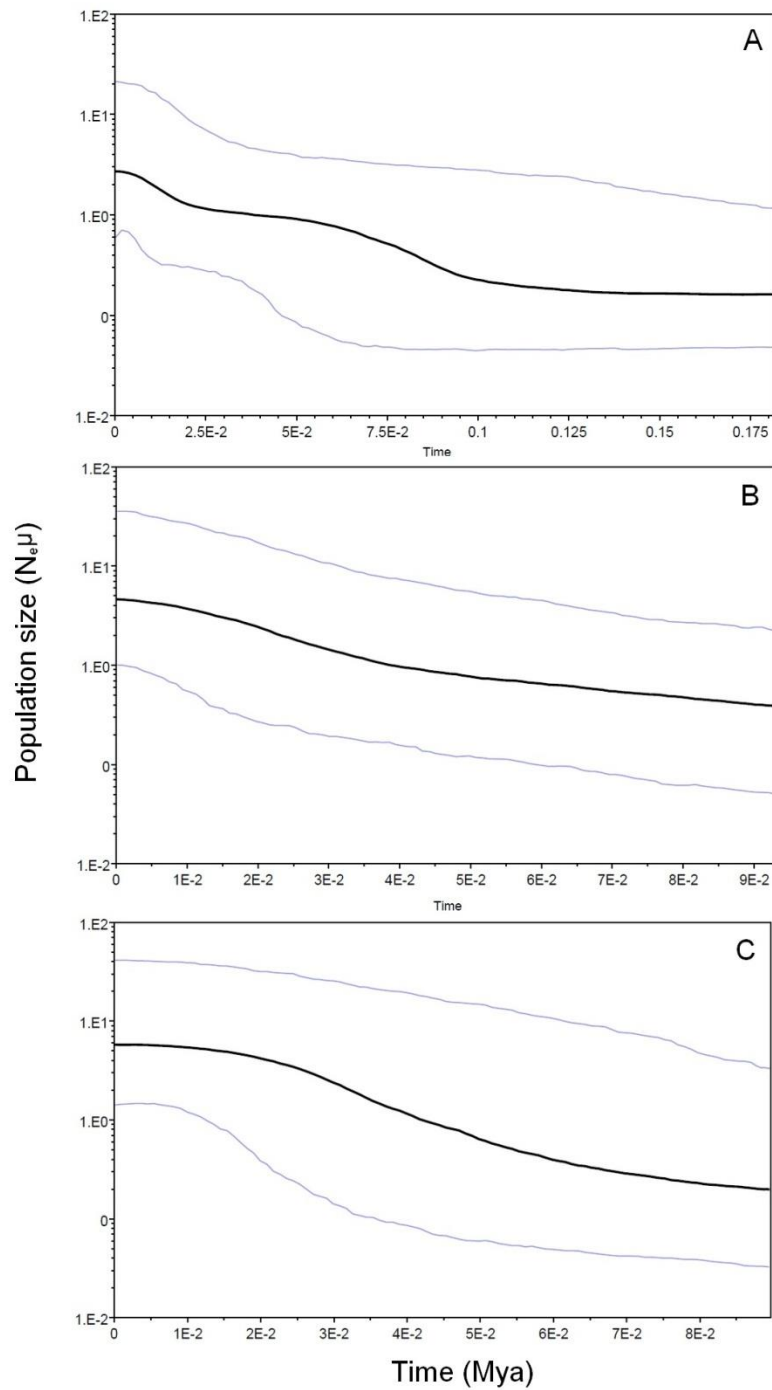


Figura 3. Análise Bayesiana Skyline Plot (BSP) mostrando a demografia histórica das linhagens de *Hylaeamys megacephalus*: (A) do Norte da Amazônia, (B) sul da Amazônia e (C) Cerrado. Eixo y representa o tamanho populacional e eixo x a escala de tempo em milhões de anos (Ma).

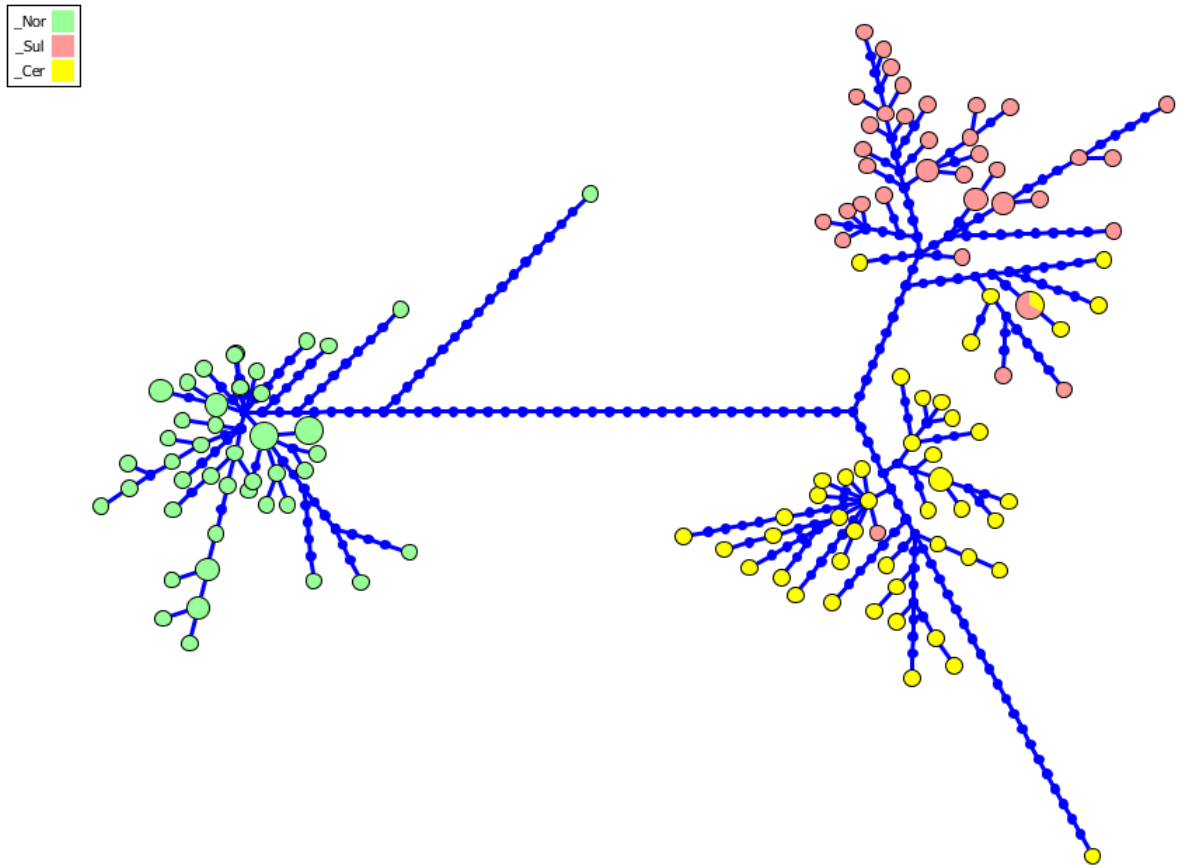


Figura 4. Rede de haplótipos de *Hylaeamys megacephalus*. Em verde, linhagem do norte da Amazônia. Em vermelho e amarelo, linhagens do sul da Amazônia e Cerrado, respectivamente. Círculo vermelho com 1/3 amarelo representa compartilhamento de um haplótipo entre as linhagens do sul da Amazônia e do Cerrado. Tamanho dos círculos representa o número de haplótipos compartilhado variando de 1 a 3.

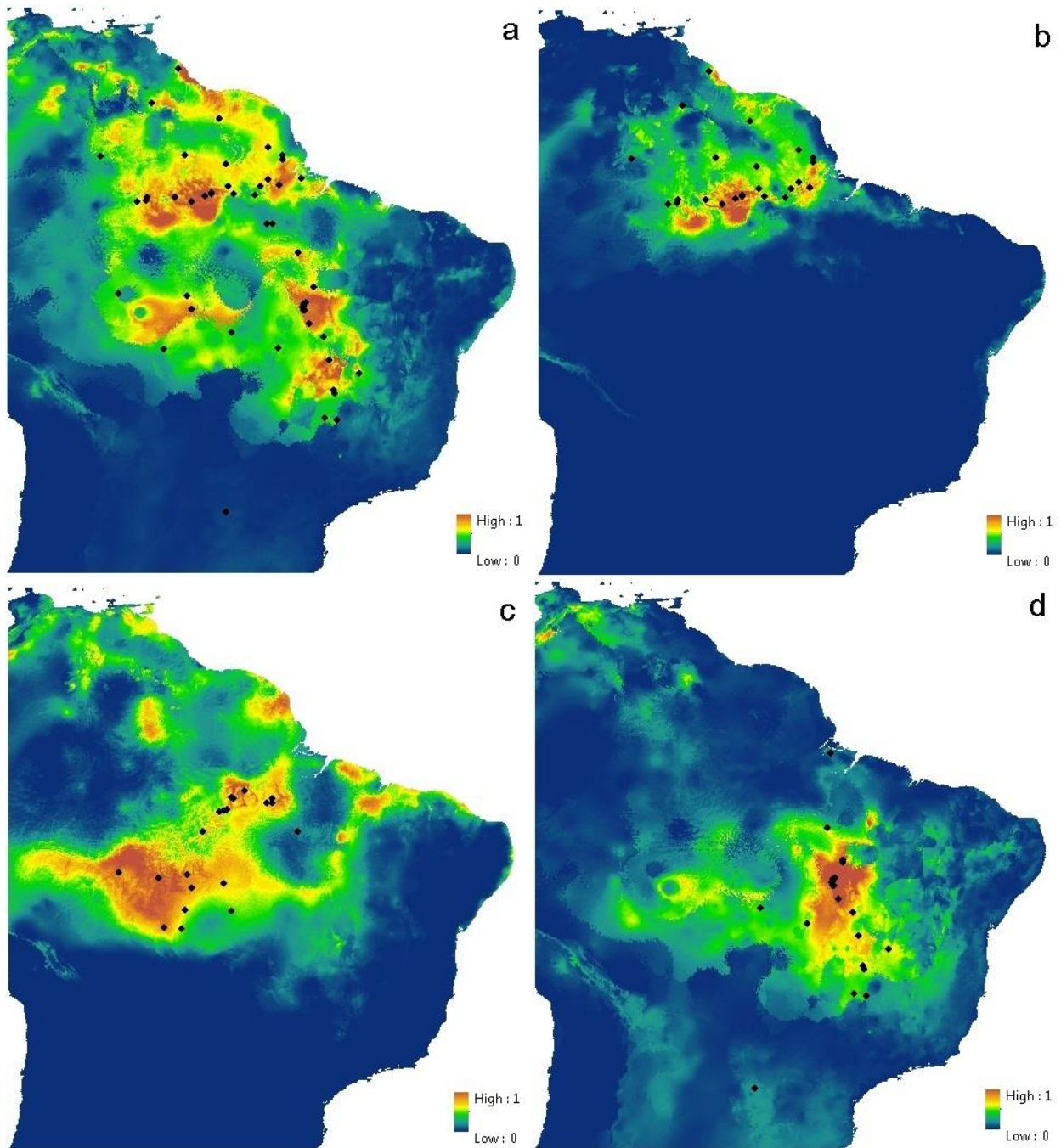


Figura 5. Modelos de nicho ecológico de: a) *Hylaeamys megacephalus*, b) linhagem do norte da Amazônia (N=23), c) linhagem do sul da Amazônia (N=20) e d) linhagem do Cerrado (N=21). A escala indica a probabilidade de condições adequadas para ocorrência, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

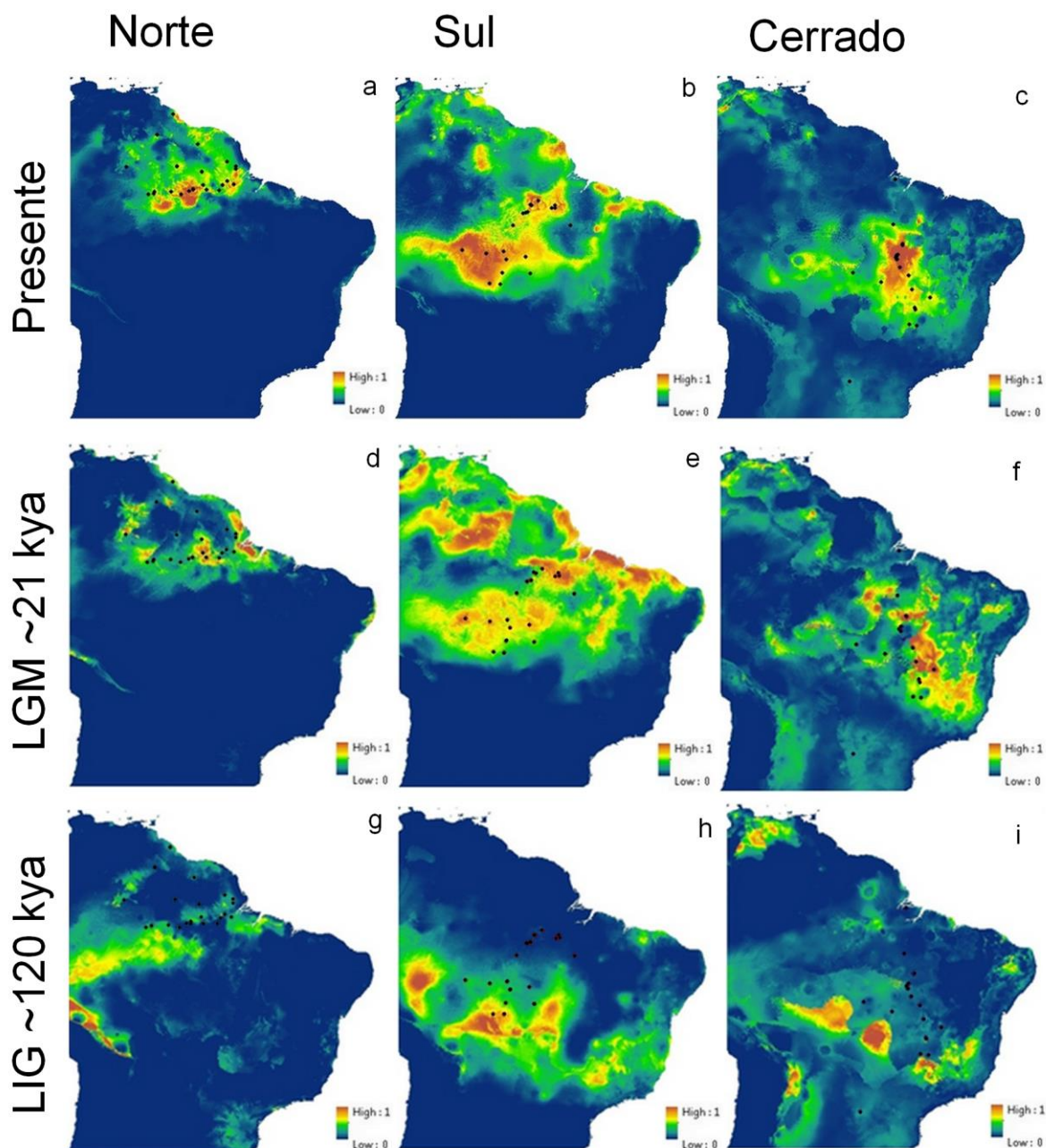


Figura 6. Modelos de nicho ecológico das linhagens de *Hylaeamys megacephalus* para o presente (a. linhagem do norte da Amazônia; b. sul da Amazônia; c. Cerrado) projetados para períodos do tempo passado: Último Máximo Glacial (LGM) (d. linhagem do norte da Amazônia; e. sul da Amazônia; f. Cerrado) e Último Máximo Interglacial (LIG) (g. linhagem do norte da Amazônia; h. sul da Amazônia; i. Cerrado). A escala indica a probabilidade de condições adequadas para a ocorrência, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

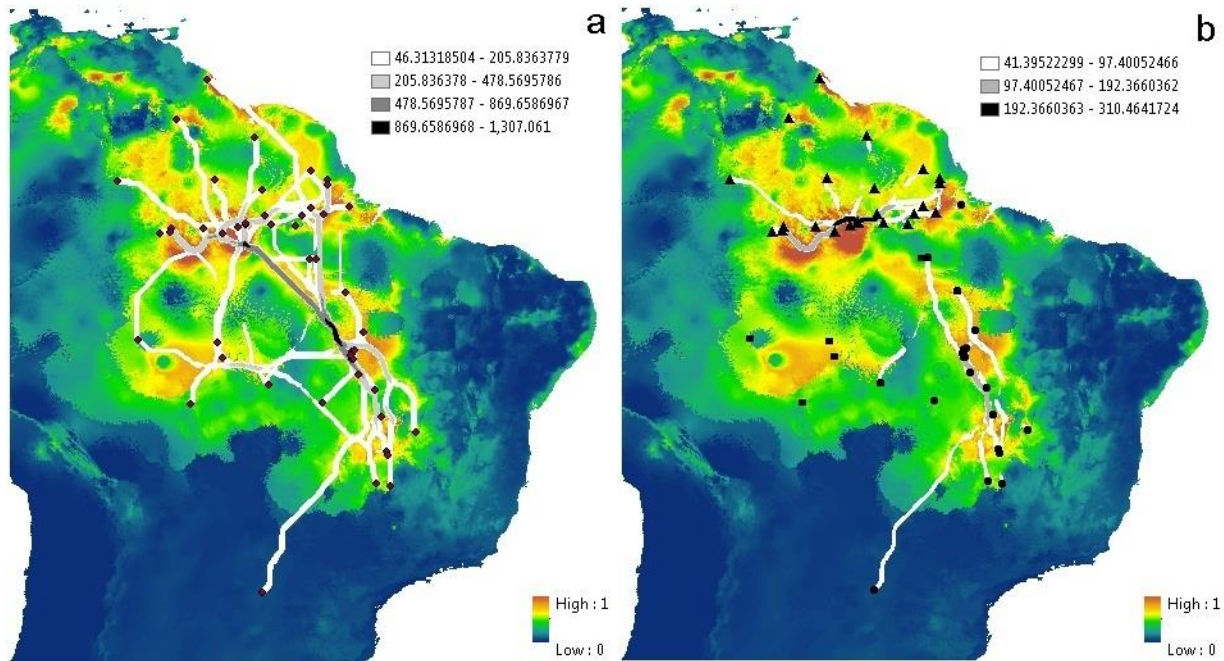


Figura 7. Corredores de menor custo (LCCP) baseado no modelo de nicho ecológico de *Hylaeamys megacephalus* a) entre localidades e b) entre haplótipos. (▲) Linhagem do norte da Amazônia, (■) sul da Amazônia e (●) do Cerrado. Linhas em escala branco, cinza e preto representam a densidade dos corredores detalhada na legenda. A escala no canto inferior direito indica a probabilidade de condições adequadas para a ocorrência da espécie, variando de 0 a 1 (0 = azul, 1 = vermelho).

AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER

Aluno(a): ARIELLI FABRICIO MACHADO
Curso: ECOLOGIA
Nível: Mestrado
Orientador(a): Dra. Marina Anciães (INPA)
Co-orientador (a): Dr. Maria Nazareth (INPA)

Título

"BIOGEOGRAFIA DE *HYLAEAMYS MEGACEPHALUS* (RODENTIA: SIGMODONTINAE): INTEGRAÇÃO ENTRE MODELOS DE NICHO ECOLÓGICO E FILOGEOGRAFIA"

BANCA JULGADORA

TITULARES:

FERNANDA DE PINHO WERNECK (INPA)
JOSÉ ANTÔNIO ALVES GOMES (INPA)
IGOR LUIS KAEFER (UFAM)

SUPLENTE:

TOMAS HRBEK (UFAM)
CAMILA RIBAS (INPA)

PARECER

ASSINATURA

FERNANDA DE PINHO WERNECK (INPA)	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado	<i>Fernanda Werneck</i>
JOSÉ ANTÔNIO ALVES GOMES (INPA)	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado	<i>Jose Alves Gomes</i>
IGOR LUIS KAEFER (UFAM)	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado	<i>Igor Luis Kaefer</i>
TOMAS HRBEK (UFAM)	() Aprovado () Reprovado	_____
CAMILA RIBAS (INPA)	() Aprovado () Reprovado	_____

Manaus/AM, 27 de fevereiro de 2014

OBS: _____



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL
DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.

Aos 21 dias do mês de agosto do ano de 2015, às 8h30min, no Auditório do PPG ATU-ECO Campus III, INPA/V8. Reuniu-se a Comissão Examinadora de Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: o(a) Prof(a). Dr(a). **Rafael do Nascimento Leite**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia - INPA, o(a) Prof(a). Dr(a). **Igor Luis Kaefer**, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e o(a) Prof(a). Dr(a). **Fabricio Beggiano Baccaro**, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, tendo como suplentes o(a) Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo de Araujo, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, e o(a) Prof(a). Dr(a). Paulo Estefano Dineli Bobrowiec, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, sob a presidência do(a) primeiro(a), a fim de proceder a arguição pública do trabalho de **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ARIELLI FABRÍCIO MACHADO**, intitulado: **"Biogeografia de Hylaeamys megacephalus (Rodentia: Sigmodontidae): integração entre modelos de nicho ecológico e filogeografia"** Orientado pelo(a) Prof(a). Dr(a). Marina Anciães do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, e Coorientado pelo(a). Prof(a). Dr (a). Maria Nazareth Ferreira da Silva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

Após a exposição, o(a) discente foi arguido(a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

POR UNANIMIDADE

POR MAIORIA

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof(a).Dr(a). Rafael do Nascimento Leite

Prof(a).Dr(a). Igor Luis Kaefer

Prof(a).Dr(a). Fabricio Beggiano Baccaro

Prof(a).Dr(a). Carlos Eduardo de Araujo

Prof(a).Dr(a). Paulo Estefano Dineli Bobrowiec

Rosalee A. Coelho Netto
p/ Coordenação PPG-ECO/INPA