



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

ESTUDOS EVOLUTIVOS EM MARSUPIAIS DIDELFÍDEOS DOS GÊNEROS
Cryptonanus, *Gracilinanus* e *Marmosa* (Didelphimorphia: Didelphidae) USANDO DADOS
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Autora: Daiane Chaves do Nascimento

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Genética e Biologia Molecular.**

ORIENTADOR: DR. NELSON JURANDI ROSA
FAGUNDES

CO-ORIENTADOR: DR. RENAN MAESTRI

Porto Alegre

Janeiro de 2023

O PRESENTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:

- UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
- PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR –
PPGBM

FONTES FINANCIADORAS:

- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO – CNPQ
- COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR –
CAPES

Dedico este trabalho a minha mãe (Maria Luísa) e ao meu filho (Washington Oscar), minhas fontes de inspiração e os motivos para persistir nesta conquista. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por permitir essa conquista. Por interseção de nossa Senhora, por seu terço e muitas orações pude seguir, e em meio a várias superações estou finalizando mais uma etapa da minha vida acadêmica. Agradeço imensamente a parceria do meu orientador, Nelson Fagundes, e também ao coorientador, Renan Maestri, os quais foram essenciais para edição dos trabalhos. Nelson foi um guerreiro por não desistir e me incentivar a ir mais longe. Agradeço à coordenação do curso, em especial a pessoa do Elmo, secretário do PPGBM, que me deu todo suporte ao longo do curso. Agradeço a parceria do Bruno Campos, que cedeu as amostras e com quem compartilho a autoria na publicação dos dois primeiros capítulos da tese e diversos conselhos. Ao amigo Mateus, integrante do mesmo laboratório, onde compartilhamos orientador, que me ajudou em algumas análises. Agradeço também aos curadores dos museus que visitei, sem eles não seria possível a realização desse trabalho.

Agradeço aos amigos que conquistei em Porto Alegre, em especial ao grupo de oração da renovação carismática, São José, que me deu uma força espiritual em muitos momentos de fraqueza, anjos que Deus mandou. Aos amigos que mesmo de longe estiveram sempre conversando comigo e me incentivando. A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Estudos evolutivos	10
1.2 Morfometria geométrica: caracteres morfológicos na complementação de dados genéticos	12
1.3 Marsupiais Neotropicais	14
1.3.1 <i>Cryptonanus</i> Voss, Lunde, and Jansa, 2005	16
1.3.2 <i>Gracilinanus</i> Gardner e Creighton, 1989	18
1.3.3 <i>Marmosa</i> (Linnaeus, 1758)	19
1.4 JUSTIFICATIVA	22
1.5 OBJETIVOS	23
1.5.1 Objetivo Geral	23
1.5.2 Objetivo Específicos	23
2. ARTIGO I	
New records and a new mtDNA lineage of <i>Cryptonanus agricolai</i> (Moojen, 1943) (Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil	24
3. ARTIGO II	
Biogeography of Mouse Opossums genus <i>Gracilinanus</i> (Didelphiomorpha: Didelphidae) and population dynamics of <i>G. agilis</i> and <i>G. microtarsus</i>	47
4. ARTIGO III	
Morfometria Geométrica Comparada de <i>Marmosa</i> e <i>Micoureus</i> (Didelphidae, <i>Marmosa</i>) em Diferentes Biomas Brasileiros	91
5. CONCLUSÃO GERAL	118
6. REFERÊNCIAS	123

RESUMO

Os marsupiais neotropicais formam uma comunidade de pequenos mamíferos de grande importância no equilíbrio dos ecossistemas sul-americanos. Sabe-se que algumas dessas espécies possuem uma marcada estrutura genética espacial, com diferentes linhagens genéticas ocorrendo em diferentes porções de suas distribuições. Assim, o presente estudo busca aprofundar o conhecimento sobre a variação genética e morfológica de espécies de marsupiais didelfídeos para entender sua origem, estrutura populacional, bem como avaliar a existência de novas linhagens genéticas em áreas pouco estudadas. A tese está composta por três manuscritos, cada um abordando um dos gêneros de marsupial investigado neste estudo: *Cryptonanus*, *Gracilinanus* e *Marmosa*. O objetivo geral do trabalho foi compreender os processos evolutivos responsáveis pela diversificação em nível genético e morfológico em marsupiais didelfídeos na América do Sul. Para *Cryptonanus* as árvores filogenéticas construídas a partir de dados moleculares de dois genes mitocondriais, *Cytb* e *COI*, foram essenciais para identificar de maneira não-ambígua os seis espécimes avaliados neste estudo, dois dos quais mostraram-se como uma nova linhagem mitocondrial de *Cryptonanus agricolai* para o Nordeste do Brasil, no cerrado maranhense, em uma localidade onde não havia registro da espécie. No caso de *Gracilinanus*, utilizamos ferramentas biogeográficas e de genética de populações para entender a distribuição geográfica dessas espécies ao longo dos últimos milhões de anos. A origem do gênero foi datada para o Mioceno médio, quando as espécies começaram a se diversificar para suas distribuições atuais. Uma abordagem comparativa entre *G. agilis* e *G. microtarsus* sugeriu evidências de expansão populacional recente (~21.300 anos atrás) para *G. agilis*, que habita florestas secas, mas não para *G. microtarsus*, que ocorre na Mata Atlântica brasileira. Esse resultado sugere que enquanto *G. microtarsus* foi mais resiliente à provável redução da cobertura florestal ocorrida durante os ciclos glaciais do

Pleistoceno, *G. agilis* foi exposta a uma maior instabilidade ecológica, principalmente no bioma Caatinga. Para o gênero *Marmosa*, analisamos dados craniométricos de *M. (M.) murina* e *M. (Micoureus)* spp. buscando identificar diferenças na forma craniana em diferentes contextos ecológicos (Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Diagonal aberta). Em geral, as análises de variação canônica para cada uma das vistas cranianas (dorsal, lateral e ventral) indicaram diferenças significativas entre grupos ecológicos para ambos os subgêneros, sendo as duas principais diferenças entre Floresta Amazônica vs. Mata Atlântica, e entre o sul vs. norte do rio São Francisco, na Mata Atlântica. Os resultados mostram que os padrões históricos de fragmentação ambiental parecem mais importantes para explicar a variação morfológica em *Marmosa* e *Micoureus* do que processos adaptativos associados às características ecológicas gerais de cada bioma.

ABSTRACT

Neotropical marsupials form a community of small mammals of greatest importance in maintaining ecological equilibrium in South-American ecosystems. It is known that some of these species show a marked spatial genetic structure, with different genetic lineages occurring in different parts of their distributions. The present study aspires to contribute to the knowledge about the genetic and morphological variation of didelphid marsupials in order to understand its origin, population structure, and to evaluate the occurrence of new genetic lineages in poorly studied regions. The thesis is composed of three manuscripts, each involving one of the marsupial genera investigated here: *Cryptonanus*, *Gracilinanus* and *Marmosa*. The general aim of the study was to understand the evolutionary processes causing genetic and morphological diversification of didelphid marsupials in South America. For *Cryptonanus*, phylogenetic trees build from two mitochondrial genes, *Cytb* and *COI*, were essential to identify unambiguously the six specimens evaluated in this study, two of which showed a new mitochondrial lineage for *C. agricolai* from Northeastern Brazil, in the savannah (Cerrado) of the Maranhão state, in a locality with no previous record for this species. For *Gracilinanus*, we used biogeographic and population genetic tools to understand the distribution of these species along the last million years. The origin of the genus dated from the Middle Miocene, since when the species started to diversify into their current distributions. A comparative analysis including *G. agilis* and *G. microtarsus* showed evidence of a recent (~21,300 years ago) population expansion for *G. agilis*, which occurs in dry forests, but not for *G. microtarsus*, which occurs in the Brazilian Atlantic Forest. This result suggests that the latter species was more resilient to the likely reduction in forest cover during the Pleistocene glacial cycles, *G. agilis* was exposed to higher ecological instability, especially in the Caatinga biome. For *Marmosa*, we analyzed craniometric data from *M. (M.) murina* and *M. (Micoureus) spp.*

aiming to identify differences in cranial form among different ecological settings (Amazon Forest, Atlantic Forest, Open Diagonal). In general, the canonical variation analysis for each of the cranial views (dorsal, lateral, ventral) indicated significant differences between ecological groups for both subgenera, the two major differences being between the Amazon and the Atlantic forests, and between the southern and northern margins of the São Francisco River, in the Atlantic Forest. These results show that the historical patterns of environment fragmentation seem more important in explaining morphological variation in *Marmosa* than adaptive processes associated to the different general ecological features of each biome.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Estudos evolutivos

Estudos biológicos têm usado as análises filogeográficas para avaliar os efeitos da história e do ambiente sobre os padrões de variação (genético e morfológico) de diferentes espécies, de modo comparativo (Hey e Machado, 2003; ver Gehara et al., 2017 para um exemplo envolvendo espécies Neotropicais de ocorrência na Caatinga). Estes estudos, revelam padrões de divergência genética e fluxo gênico que evidenciam os processos evolutivos associados às diferentes condições ambientais e ao isolamento geográfico, pois as populações carregam em sua história evolutiva marcas destes acontecimentos, sejam eles mais relacionados a processos de deriva ou seleção causada por diferentes contextos ecológicos (Hare e Avise, 1997; Schluter, 2009; Hickerson et al., 2010; Sexton et al., 2013).

Dentre as diferentes hipóteses evolutivas que podem ser avaliadas em estudos filogeográficos estão 1) processos de vicariância associados à tectônica de placas (Colley e Fischer, 2013), 2) surgimento de pontes de conexão entre áreas antes separadas (Hurt et al., 2009), 3) o efeito de barreiras ao fluxo gênico – rios ou refúgios climáticos – na diversificação de linhagens (Costa, 2003; Faria et al., 2013), entre outros. A compreensão dos processos associados à diversidade (e divergência) genética é útil para diagnosticar áreas importantes para conservação através da delimitação de unidades evolutivamente significantes (Crandall et al., 2000).

Dados moleculares constituem a base para estudos filogeográficos, pois utilizam as variações genéticas intraespecíficas e os dados ecológicos e geológicos de forma complementar para compreender como as espécies se distribuem no tempo e no espaço, gerando informações importantes na criação e monitoramento de estratégias de manejo das populações, além de, em casos específicos, ajudar a desvendar diversidade genética críptica, possibilitando a identificação

de novos táxons e linhagens evolutivas importantes (Centeno-Cuadros et al., 2017; Meireles e Manos, 2018; Garcia-Cisneros et al., 2018). Seus dados, em um contexto comparativo, podem revelar como uma comunidade inteira ou uma assembleia estão estruturadas por compartilhar respostas de passado comum e eventos históricos únicos espécie-específicos (Knowles, 2009).

Desde a sua fundação, com a integração dos dados filogenéticos com os dados de genética de populações por Avise et al. (1987), a filogeografia vem permitindo a integração de diferentes campos das ciências naturais. Essa configuração interdisciplinar é essencial para entender como o clima, a geografia e as interações ecológicas determinam e interagem com a composição e a evolução da comunidade (Hickerson et al., 2010). O uso de múltiplos loci, em geral mitocondrial e nuclear, mostram resultados mais informativos (Harlin-Cognato et al. 2007), úteis na identificação de espécies com filogenias conflitantes (Dolman and Moritz 2006). Ainda assim, o uso de marcadores únicos, em especial, genes do genoma mitocondrial, seguem sendo amplamente utilizados, sendo a base para a identificação taxonômica no contexto dos “códigos de barra” de DNA (p. ex. Hebert et al., 2003; Ivanova et al., 2012; Agrizzi et al., 2012), ou em contexto mais amplo, na determinação de espécies crípticas (p. ex. Liu et al., 2018; Fegies et al., 2021; Nascimento et al., 2022) e para avaliar o grau de estrutura populacional (p. ex. Nascimento et al., 2018; Kusnadi et al., 2022). O mtDNA tem algumas características interessantes, como a alta taxa evolutiva, o grande número de cópias por célula (o que é uma vantagem quando se trata de DNA antigo ou espécimes de museu), além do fato de que bancos de dados para sequências de mtDNA são muito mais extensos do que para marcadores autossômicos.

Nos estudos filogeográficos da última década, há um crescente interesse em associar dados moleculares aos padrões espaço-temporais de mudanças paleoclimáticas (p. ex. Werneck et al., 2012, 2015; Leite et al., 2016; Lanna et al., 2018). Nesse sentido, os dados moleculares devem ser

interpretados à luz do conhecimento produzido por diferentes áreas, como a botânica (Silveira et al., 2019), geologia (Auler e Smart 2001; Cruz et al., 2007), e paleopalinologia (Colinvaux et al., 1996; Behling et al., 2000; Sifeddine et al., 2003). Em termos metodológicos, inferências baseadas em modelos evolutivos explícitos, como por exemplo aquelas propiciadas pelo uso de computação Bayesiana aproximada (ABC) possibilitou, através de simulações coalescentes e da comparação de estatísticas sumárias entre as simulações e dados empíricos, avaliar quais cenários biogeográficos testados se ajustam melhor aos dados reais (Cornuet et al., 2010; Burr e Skurikhin, 2013), possibilitando também a inferência de parâmetros evolutivos relevantes como a datação de eventos de gargalos (Ony et al., 2021) ou expansões populacionais (Yang et al., 2016) e a divergência entre diferentes linhagens evolutivas (Bruschi et al., 2019).

1.2 Morfometria geométrica: caracteres morfológicos na complementação de dados genéticos

Tipicamente, os dados moleculares indicam um nível de variação que não é detectada em nível de fenótipo, sendo usado em situações em que a morfologia seria ineficiente para distinguir entre linhagens evolutivas (Dolman e Moritz, 2006). Contudo, a compreensão da própria definição dos táxons e de suas adaptações ao meio passa por critérios que não dependem exclusivamente de dados moleculares, mas também morfológicos e ecológicos. Assim, uma análise conjunta de dados morfológicos e moleculares permite uma maior robustez para as inferências taxonômicas e filogeográficas (ou biogeográficas) (Bueno-Silva, 2012). Nessa perspectiva, a morfometria geométrica tem permitido resultados fundamentais quando aliada a estudos genéticos, sendo uma ferramenta de grande importância para estudos evolutivos (Cordeiro-Estrela et al., 2006; Maestri et al., 2017a; 2017b).

O diferencial da morfometria geométrica é que as medidas obtidas por marcos anatômicos preservam a geometria da forma, permitindo avaliar adequadamente tamanho e forma de maneira independente (Breno et al., 2011; Márquez et al., 2012). Junto com as modificações morfológicas, estão as variações direcionadas pelos processos ecológicos, ou seja, aquelas modificações corporais que respondem aos diferentes nichos ecológicos e que são importantes no processo de seleção natural. A morfometria geométrica usa análises estatísticas multivariadas para dados quantitativos variáveis, tais como largura, comprimento e altura, e quando aliado a estudos ecológicos são importantes na identificação de mudanças fenotípicas decisivas para a adaptação das espécies ao ambiente (Adams e Rohlf, 2004; Kulemeyer et al., 2009; Eads et al., 2012; Evin et al., 2011). Assim, estudos de morfometria geométrica e ecológicos incrementam análises evolutivas e podem ser essenciais na diferenciação de grupos morfologicamente adaptados aos diferentes habitats (Antonucci et al., 2009; Hepp et al., 2012).

Os estudos usando morfometria geométrica ganharam mais espaço à medida que se inter-relacionam com dados moleculares, pois estes se somam e completam informações em vários grupos de espécies, incluindo animais (Cardini et al., 2004; Cooper et al., 2010; Freitas et al., 2012) e plantas (Maestri et al., 2013). Para o grupo de pequenos mamíferos, esses estudos mostram-se conclusivos na delimitação de espécies próximas (Cordeiro-Estrela et al., 2006; 2008). Astúa (2009; 2010), através das medidas morfológicas da forma, analisou crânio e escápula de marsupiais neotropicais, o que possibilitou de modo conclusivo a diferenciação das três ordens existentes para o novo mundo, e mostrou também a variação que há entre cada espécie de marsupiais didelfídeos. Ainda usando morfometria geométrica, (Damasceno e Astúa (2016) verificaram diferenças significantes entre as subespécies do marsupial semi-aquático, *Chironectis minimus*, indicando a necessidade de uma revisão bibliográfica da espécie por meio de análises filogenéticas. Assim,

estudos com morfometria geométrica aliados com outras análises evolutivas moleculares podem fornecer subsídios completos para a avaliação das variações geográficas populacionais e taxonômicas para diversos grupos de espécies.

1.3 Marsupiais Neotropicais

Os marsupiais representam um grupo de espécies de grande valor ecológico, pois compõem uma comunidade vital no equilíbrio dos ecossistemas sul-americanos, sendo considerados também como indicadores da qualidade ambiental (Bonvicino et al., 2002; Almeida et al., 2008; Quintela et al., 2013; Cerboncini et al., 2014). Essas espécies podem possuir grande diversidade genética, o que, somado à sua ampla distribuição geográfica, pode resultar em populações estruturadas, indicativas de diferenciação intraespecífica - um primeiro passo no surgimento de novas linhagens ou táxons (Costa, 2003).

Em termos taxonômicos, há três ordens de marsupiais neotropicais: Microbiotheria, Paucituberculata e Didelphimorphia, sendo que esta última é a mais diversificada, com pelo menos 18 gêneros e 91 espécies em uma única família, Didelphidae (Gardner, 2008) e segue aumentando ao longo dos anos (Semedo et al., 2015; Voss et al., 2021; Fegies et al., 2021). Seus representantes são conhecidos como didelfídeos e compõem um grupo de pequenos mamíferos não-voadores cuja sistemática e filogenia ainda não estão completamente elucidadas (Gardner, 2008; Voss e Jansa, 2009; Semedo et al., 2015). Gardner (2008), utilizando caracteres morfológicos, divide a família em duas subfamílias: Caluromyinae, sem divisão em tribos e incluindo: *Caluromys*, *Caluromysiops* e *Glironia*; e Didelphinae dividida em três tribos: Didelphini (*Chironectes*, *Didelphis*, *Lutreolina*, *Philander*) Metachirini (*Metachirus*) e Monodelphini (*Chacodelphys*, *Cryptonanus*, *Gracilinanus*, *Hyladelphys*, *Lestodelphys*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Micoureus*,

Monodelphis e *Thylamys*). Voss e Jansa (2009), com base em caracteres morfológicos e moleculares, fizeram algumas modificações nessa classificação e definiram quatro subfamílias, corroboradas por análises filogenéticas: Glironiinae (*Glironia*), Caluromyinae (*Caluromys* e *Caluromysiops*), Hyladelphinae (*Hyladelphys*) e Didelphinae (Marmosini, Metachirini, Didelphini e Thylamyini). As quatro tribos de Didelphinae são compostas pelos seguintes gêneros: **Marmosini** - *Marmosa*, *Monodelphis* e *Tlacuatzin*; **Metachirini** - *Metachirus*; **Didelphini** - *Chironectes*, *Didelphis*, *Lutreolina* e *Philander*; e **Thylamyini** - *Chacodelphys*, *Cryptonanus*, *Gracilinanus*, *Lestodelphys*, *Marmosops* e *Thylamys*.

A filogenia dos didelfídeos ainda não está totalmente bem resolvida, já que Glironiinae pode representar o clado mais divergente dentro da família, seguido por Caluromyinae, ou formar junto com esse último o grupo irmão do clado (Hyladelphinae, Didelphinae) (Voos e Jansa, 2009). Outra relação controversa envolve Marmosini, para a qual há três formas possíveis de organização filogenética dos três gêneros: I, ((*Marmosa* + *Tlacuatzin*) + *Monodelphis*); II, (*Marmosa* + *Monodelphis*) + *Tlacuatzin*; III, ((*Marmosa*) + (*Tlacuatzin* + *Monodelphis*)). Em todo caso, a monofilia da tribo e do gênero *Marmosa* sempre tem recebido alto suporte (Voos e Jansa, 2009). Suas inconsistências estão sendo detectadas em nível de gênero, com um aumento considerável no número de subgêneros e de novas espécies descritos com base em dados moleculares na última década (Voss et al., 2014; Silva et al., 2019; Voss et al., 2021).

Os didelfídeos compõem uma ordem amplamente distribuída e bastante diversificada, podendo ser encontrada desde a América do Norte, onde estão em menor número de espécies, passando pela América Central e do Sul, onde a diversidade é significativamente maior (Gardner 2008). Estudos filogenéticos e de estruturação populacional das espécies de marsupiais neotropicais, podem, então, fornecer importantes meios para entender melhor a dinâmica evolutiva

nos domínios de Florestas tropicais e a diagonal de formação aberta da América do Sul. Ao mesmo tempo, podem indicar se há populações diferentes, com estoques genéticos relevantes para a conservação de suas diversidades, uma vez que processos antrópicos estão ocorrendo constantemente e destruindo os habitats dessas populações.

1.3.1 *Cryptonanus* Voss, Lunde, and Jansa, 2005

O gênero *Cryptonanus* foi descrito por Voss, Lunde e Jansa, (2005) a partir de amostras de thylamyídeos identificados como *Gracilinanus*. Ambos *Gracilinanus* e *Cryptonanus* pertencem à tribo Thylamyini, caracterizada pela presença de um carácter apomórfico que os separa dos outros didelfídeos: uma fenestra na sutura entre os ossos parietal e squamosal (Voss et al., 2005). Porém, *Cryptonanus* diferencia-se de *Gracilinanus* por não apresentar: fenestração maxilar, forame oval secundário, e processo rostral do pré-maxilar (Figura 1; Voss e Jansa, 2009). Após uma grande revisão taxonômica que envolveu dados morfológicos e moleculares, foi estabelecido que o gênero contém quatro espécies válidas distribuídas pela América do Sul, cada uma apresentando até quatro novas linhagens, as quais foram indicadas por letras: *C. agricolai* (A, B e C), *C. chacoensis* (A, B, C e D), *C. unduaviensis* e *C. guahybae* (A e B); apenas *C. unduaviensis* permaneceu sem alterações (Fegies et al., 2021). São espécimes de pequeno porte, com massa corporal em torno de 18g, cuícas graciosas aparentemente escansoriais, usando o solo e a vegetação para forragear (Voss et al., 2005; Reis et al., 2006).

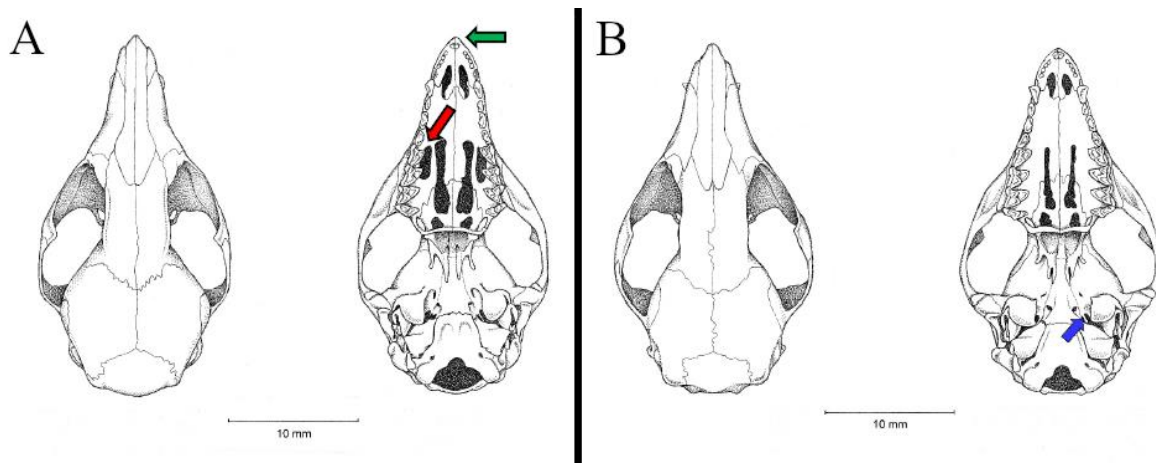


Figura 1. *Gracilinanus agilis* (A) e *Cryptonanus unduaviensis* (B). A seta vermelha indica a fenestração maxilar, a seta azul indica o forame oval secundário, e a seta verde indica o processo rostral do pré-maxilar, caracteres diagnósticos, ausentes ou presentes, dos gêneros *Cryptonanus* e *Gracilinanus*.

Cryptonanus é conhecido principalmente em biomas tropicais e subtropicais não florestado ao sul do Rio Amazonas e leste dos Andes, incluindo Caatinga, Cerrado, Chaco, e norte dos Pampas, as localidades até então disponíveis inclui Paraguai, Uruguai, oeste da Bolívia, norte da Argentina, e centro e leste do Brasil (Voss e Jansa, 2009). A espécie *C. unduaviensis* antes registrada apenas para Bolívia atualmente já foi encontrada no extremo oeste do estado do Mato Grosso, no centro-oeste do Brasil, e no Paraguai, onde foi encontrada em simpatria com *C. chacoensis* (Fegies et al., 2021). *C. chacoensis* ocorre na Argentina, Brasil e Paraguai, enquanto *C. guahybae* distribui-se apenas pela região sul do Brasil, já *C. agricolai* embora também seja restrita ao território brasileiro, tem uma distribuição bem mais extensa, ocorrendo em uma ampla área que engloba toda a diagonal aberta do Brasil, nos biomas Cerrado e Caatinga, podendo ser encontrado também em regiões de Mata Atlântica, no sudeste brasileiro (Guerra e Costa 2019; Fegies et al., 2021).

1.3.2 *Gracilinanus* Gardner e Creighton, 1989

O gênero *Gracilinanus* contém seis espécies: *G. aceramacae*, *G. agilis*, *G. dryas*, *G. marica*, e *G. microtarsus*, distribuídas desde a Colômbia até o norte da Argentina em zonas tropicais e subtropicais a oeste da Cordilheira dos Andes à cerca de 3.000 m (Creighton e Gardner, 2008). Espécies deste gênero apresentam porte pequeno com massa corporal variando entre 10 e 50g e tem alimentação onívoro, típico de muitos marsupiais didelfídeos (Reis et al., 2006). Entre as características diagnósticas do crânio, em *Gracilinanus* há uma ampla fenestração palatina (seta vermelha), e um forame oval secundário formado por um processo anteromedial da asa timpânica do alisfenóide (seta azul) (Figura 1; Voss et al., 2005; Pires et al., 2010).

G. agilis apresenta uma ampla distribuição geográfica ocorrendo na Argentina, Uruguai, Bolívia, Peru, Paraguai e Brasil, no qual pode ser encontrado em florestas secas e matas de galeria do Cerrado, Caatinga e Pantanal, havendo registro para as bacias dos rios Araguaia e Paraná (Cáceres et al., 2008; Creighton e Gardner, 2008; Ribeiro, 2011; Paglia et al., 2012). As espécies *G. microtarsus* e *G. emiliae* ocorrem também em outros países Sul Americanos e no Brasil são restritos à Mata Atlântica e à Amazônia, respectivamente (Creighton e Gardner, 2008; Paglia et al., 2012).

As duas espécies mais amplamente distribuídas no Brasil são *G. agilis* e *G. microtarsus*, que podem ser facilmente diagnosticados através de dados morfológicos e moleculares (Costa et al., 2003). Costa et al., (2003) indicaram a existência de ampla variação molecular intraespecífica para os dois táxons, com três clados mitocondriais para *G. agilis* e dois clados mitocondriais para *G. microtarsus*. Faria et al., (2013), indica a presença de uma estrutura populacional com três clados dentro de *G. agilis* ao longo da Diagonal aberta Sul Americana, e Loss et al., (2011) indicam a existência de três distintas linhagens para *G. microtarsus*, apontadas por dados moleculares e

morfológicos. Todos esses achados mostram a volatilidade das classificações quando se verifica intimamente os pequenos mamíferos neotropicais, e incentivam a investigação de indivíduos de mais áreas amostrais.

1.3.3 *Marmosa* (Linnaeus, 1758)

Espécies de marsupiais didelfídeos do gênero *Marmosa* distribuem-se desde vegetações tropicais e subtropicais do México ao Norte da Argentina, até habitats variados como vegetações xerófilas espinhosas, savanas, florestas tropicais e florestas úmidas em montanhas a cerca 3.000 metros acima do nível do mar, apresentando, portanto, uma ampla tolerância de temperatura e umidade (Creighton e Gardner, 2008). Gardner (2008), descreveu 15 espécies para o gênero, e Voss et al. (2014) através de informações morfológicas, moleculares do gene mitocondrial citocromo b (mt-Cytb) e de genes nucleares (BRCA1, OGT e SLC38), descrevendo agora 19 espécies, concluíram que o gênero *Marmosa* é composto por cinco subgêneros: dois novos descritos por eles (*Exulomarmosa* e *Eomarmosa*), *Stegnomarmosa* redescrito por Solari e Pine (2008), e elevaram *Marmosa* e *Micoureus* ao nível de subgênero. Esses dois últimos são mais amplamente distribuídos pelos biomas brasileiros e serão tratados no presente estudo.

O subgênero *Marmosa* inclui quatro espécies: *M. (M.) murina*, *M. (M.) waterhousei*, *M. (M.) tyleriana* e *M. (M.) macrotarsus*. Esse subgênero está distribuído por países ao norte da América do Sul, como Colômbia, Venezuela, Trinidad e Tobago, Equador e Guianas, e também em grande parte do Brasil, chegando até Peru e Bolívia (Voss et al., 2014). No Brasil, o subgênero mostra uma ampla distribuição, ocorrendo tanto em florestas tropicais, como a Amazônia e a Mata Atlântica, quanto em áreas mais áridas em zonas de transição, como o Cerrado e a Caatinga (Creighton e Gardner, 2008). Seus tamanhos corporais variam de pequeno a médio e *M. (M.)*

murina pode atingir cerca de 100g; geralmente são insetívoros onívoros e possuem hábito escansorial (Reis et al., 2006).

Estudos morfológicos e moleculares desenvolvidos por Gutiérrez et al., (2010), Rossi (2010) e Voss et al., (2014) confirmam a monofilia de *M. (M.) murina*, Steiner e Catzefler (2003), entretanto, usando DNA mitocondrial e morfologia, verificaram indícios da possível variação entre grupos de indivíduos de *M. (M.) murina*, sugerindo a necessidade de estudos que comprovassem a existência de mais de uma espécie biológica ao longo da sua distribuição. Rocha et al., (2015), identificou sete clados de *M. (M.) murina* ao longo de sua distribuição, cinco desses foram bem suportados pelas análises filogenética, todos encontrados no Brasil, e dois foram polimórficos, ambos encontrados no Norte da Amazônia, distribuídos pelo Brasil e região das guianas. Os estudos para avaliar a diversidade da espécie ao longo de toda sua distribuição estão incompletos, por isso, trabalhos que busquem ampliar essa perspectiva, seja de maneira morfológica ou molecular, devem elucidar questões fundamentais para a taxonomia deste subgênero.

As espécies de *Micoureus* ocorrem em florestas baixas e montanhosas do sul de Belize até o Paraguai e norte da Argentina. Os espécimes costumam ser maiores que as outras espécies do gênero, atingindo cerca de 150g, possuem hábitos arborícolas e uma pelagem mais lanosa estendendo-se até a cauda (Reis et al., 2006). Na revisão do gênero *Marmosa*, Voss et al., (2014) propuseram tratar o então gênero *Micoureus* como subgênero, para resolver relações parafiléticas, nesta classificação, o subgênero é representado por seis espécies distribuídas alopaticamente nas Américas Central e do Sul. Quatro espécies têm distribuição cis-Andina: *M. (Mi.) constantiae*, *M. (Mi.) demerarae*, *M. (Mi.) paraguayana*, e *M. (Mi.) regina*, enquanto outras duas têm distribuição trans-Andina: *M. (Mi.) alstoni*, e *M. (Mi.) phaea* (Voss et al., 2014), refletindo uma colonização recente (Sancha et al., 2011).

Todas as espécies cis-Andinas são encontradas no Brasil (Gardner 2008; Voss et al., 2014). Uma recente revisão taxonômica do subgênero, porém, revela a existência de pelo menos 20 espécies de *Marmosa* (*Mi.*), suas conclusões elucidam alguns complexos de espécies, mas confirmam a morfologia bastante conservada do subgênero, e indicam apenas alguns poucos caracteres morfológicos usados na distinção das putativas espécies, sendo eles caracteres craniodentais não métricos (Voss et al., 2021). Nesta revisão, dados moleculares, no entanto, contribuem com bastante suporte para confirmação das novas espécies indicadas. Antes de Voss et al., (2021), Silva et al., (2019) considerou somente oito espécies putativas para o subgênero *Micoureus*, as divergências entre os estudos, em tão pouco tempo entre eles, mostram como as classificações morfológicas são dinâmicas, e à medida que novos espécimes e localidades são estudados novas reclassificações surgem.

Para os demais subgêneros de *Marmosa* houve poucas alterações taxonômicas após as classificações de Voss et al., (2014), porém, segundo Solari e Pine (2008), as espécies deste gênero são principalmente as sobras de arranjos taxonômicos anteriores, sendo que mesmo as revisões mais recentes e completas não resolveram completamente as relações entre *Marmosa* e os muitos táxons anteriormente incluídos em *Marmosa* ou listados como sinônimos dele. Percebe-se que o grande número de táxons recentemente revelados para *Micoureus* intensificam esse achado, e parece indicar a necessidade de uma revisão minuciosa para o gênero.

1.4 Justificativa

As espécies estudadas no presente estudo possuem amplas distribuições ao longo da América do Sul, percorrendo biomas variados, como: Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Amazônia, áreas com características ecológicas diferentes. Ao entender os processos de diversificação das populações busca-se também identificar a dinâmica das mudanças ambientais que culminou com a formação da paisagem em que estas estão adaptadas, por isso, a diferenciação morfológica interespecífica e intraespecíficas devem ser bem exploradas, por dados morfológicos e moleculares, afim de chegar a conclusões concretas sobre a diversidade populacional e dessa forma poderemos tomar decisões taxonômicas relevantes para a conservação das espécies.

Neste contexto, é imprescindível refinar o conhecimento sobre os biomas onde estas espécies estão distribuídas, em especial no Brasil, que possui dois *hotspots* de biodiversidade mundial (Mata Atlântica e Cerrado) (Ribeiro et al., 2011; Laste et al., 2019), além de três Grandes Regiões Naturais (Amazônia, Caatinga e Pantanal) (Cardoso et al., 2017; Teixeira et al., 2021; Flach et al., 2021). Processos antrópicos como: extração de recursos do solo, vegetais e animais, bem como a expansão da agricultura moderna, têm contribuído para a fragmentação da paisagem e levado a transformação, em curto prazo, das populações, além disso, o contínuo crescimento populacional humano tem conduzido a uma considerável supressão de áreas florestadas, essa perda compromete toda a biodiversidade, culminando em um retorno negativo para sociedade que é integrante desse meio. O desenvolvimento social deve estar ligado ao bom relacionamento com o meio ambiente, sendo a caracterização correta dos diferentes níveis da biodiversidade um passo fundamental para a tomada de decisões em políticas conservacionistas efetivas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é compreender os processos evolutivos responsáveis pela diversificação em nível genético e morfológico em marsupiais didelfídeos dos subgêneros do gênero *Cryptonanus*, *Gracilinanus* e *Marmosa* (Didelphimorphia; Didelphidae) na América do Sul.

1.5.2 Objetivo Específicos

Como objetivos específicos, a presente tese propõe:

- Construir árvores filogenéticas a partir de dados moleculares mitocondriais para espécies do gênero *Cryptonanus*, identificar suas relações de parentesco evolutivo, e, dessa forma, informar sobre a existência de novas linhagens em áreas de distribuição com escassez de amostragem;
- Realizar estudo filogenético e filogeográfico das espécies do gênero *Gracilinanus* identificando suas relações interespecíficas, e eventos históricos que explicam nas suas atuais distribuições pelo continente americano;
- Conhecer a estrutura populacional de duas espécies amplamente distribuídas do gênero *Gracilinanus*: *G. agilis* e *G. microtarsus* e identificar por meio de Análises de Computação Bayesiana (ABC), como os eventos pleistocênicos podem ter modificado a dinâmica de dispersão de suas populações;
- Caracterizar a diversidade morfológica nos subgêneros *Marmosa* e *Micoureus* através de morfometria geométrica do crânio, e avaliar a relação entre variação morfológica, a taxonomia do grupo e seus habitats.

2. ARTIGO I

New records and a new mtDNA lineage of *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943)
(Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil

Artigo publicado no periódico Check List - <https://checklist.pensoft.net/article/79320/>

Citação: Nascimento DC, Campos BATP, Fraga EC, Barros MC, Fagundes NJ (2022) New records and a new mtDNA lineage of *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) (Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil. Check List 18(3): 515-523. <https://doi.org/10.15560/18.3.515>

NGD 79320

Nascimento et al. | New records for *Cryptonanus agricolai*

New records and a new mtDNA lineage of *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) (Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil

Daiane Chaves do Nascimento^{1, 2*}, Bruno Augusto Torres Parahyba Campos³, Elmary da Costa Fraga^{2, 3}, Maria Claudene Barros^{2, 3}, Nelson Jurandi Rosa Fagundes^{1, 4}

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil • DCN: daianeccnas@yahoo.com.br
<https://orcid.org/0000-0003-3446-2548> • NJRF: nelson.fagundes@ufrgs.br
<https://orcid.org/0000-0003-0456-0323>

2 Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, MA, Brazil • ECF: elmaryfraga@yahoo.com.br
<https://orcid.org/0000-0001-8062-0338> • MCB: mbdene@yahoo.com.br <https://orcid.org/0000-0001-9055-1911>

3 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Ambiente e Saúde, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, MA, Brazil • BATPC: atpcampos@gmail.com <https://orcid.org/0000-0001-5586-2597>

4 Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author

Abstract

Cryptonanus agricolai (Moojen, 1943) is a small didelphid widely distributed across of central and northeastern Brazil and in the Brazilian Atlantic Forest. A recent phylogeographic study of this species identified three major mtDNA clades with strong geographic structure. Here, we present new records of *C. agricolai* in northeastern Brazil, including the first report for Maranhão state. We also identify a novel mtDNA lineage, sister to one of the three major clades, in some specimens from Maranhão, indicating that *C. agricolai* is morphologically and genetically more variable than previously recognized.

Keywords: Caatinga, Cerrado, genetic diversity, geographic distribution, marsupials, mitochondrial DNA

Academic editor: Terrence C. Demos

Citation: Nascimento DC, Campos B ATP, Fraga EC, Barros MC, Fagundes NJR (2022) New records and a new mtDNA lineage of *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) (Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil. Check List ...

Introduction

Cryptonanus Voss, Lunde & Jansa, 2005 is a genus of marsupial didelphids that contains four valid species distributed throughout South America: *C. agricolai* (Moojen, 1943), *C. chacoensis* (Tate, 1931), *C. guahybae* (Tate, 1931), and *C. unduaviensis* (Tate, 1931). A fifth species, *C. ignitus* (Díaz, Flores & Barquez, 2002), which was known from a single specimen and considered extinct by the IUCN, has been synonymized with *C. chacoensis* by Teta and Díaz-Nieto (2019). Until the revision by Voss et al. (2005), specimens belonging to *Cryptonanus* were assigned to *Gracilinanus* Gardner & Creighton, 1989. This represents a challenge for retrieving

records of *Cryptonanus* species from museum specimens, which must undergo a detailed investigation for a correct identification. *Cryptonanus* is distinguished from *Gracilinanus* by some craniodental characters, including: the lack of maxillary palatal vacuities, the presence of a secondary foramen ovale and a rostral process on the premaxillae, a P3 that is taller than P2, and accessory cusps that are often present on C1 (Voss et al. 2005). Despite previously having been allocated together, specimens from both genera belong to non-sister monophyletic clades with high support in the molecular phylogeny of Voss and Jansa (2009).

Cryptonanus is mostly known from tropical and subtropical biomes south of the Amazon River and east of the Andes (Fig. 1), including the Caatinga, Cerrado, Chaco, the northern Pampas, and the Brazilian Atlantic Forest (in the Parana dominion; sensu Morrone 2014) (Voss et al. 2005; Voss and Jansa 2009; De La Sancha and D’Eliá 2015). Two species have relatively small geographical distributions: *C. guahybae*, which occurs in the Brazilian state of Rio Grande Sul in the boundary region between the Pampas province and the Parana dominion towards Santa Catarina and Paraná states (Dias et al. 2016; Fegies et al. 2021), and *C. unduaviensis*, which is restricted to relatively close localities in Bolivia, Paraguay, and Brazil (De La Sancha and D’Eliá 2015; Fegies et al. 2021). On the other hand, *C. chacoensis* and *C. agricolai*, are widely distributed in a region with considerable ecologic diversity. In particular, *C. agricolai*, which presents the most equatorial distribution of the genus, has been reported exclusively from Brazil. This species seems to be more widely distributed in the open areas of central Brazil, but recently it has been recorded in the Brazilian Atlantic Forest in the Brazilian Southeast (Bezerra et al. 2009, 2014; Souza et al. 2010; Carmignotto and Aires 2011; Bonvicino et al. 2012; Gomes et al. 2015; Fegies et al. 2021; Guerra and Costa 2021).

Traditionally, discrete craniodental characters, measurements, and skin color patterns have been used for identification of *Cryptonanus* species (Voss et al. 2005). However, some of these characters, such as color patterns, may be subjective, especially when it is not possible to compare specimens side-by-side (Voss et al. 2005). Indeed, studies reporting new records of *Cryptonanus*, including the unexpected find of this genus in the Amazon region of French Guiana (Kocher et al. 2016), have failed to provide definitive taxonomic identifications to species (Garcia et al. 2010; Lóss et al. 2011; Vivo 2011; Carmignotto and Bezerra 2014). These taxonomic issues are a challenge for the better understanding of the natural history and ecology of *Cryptonanus* and, in particular, for the correct interpretation of new geographical records (e.g., Garcia et al. 2010; Vivo 2011; Delciellos et al. 2016; Dias et al. 2016; Fegies et al. 2021) that may represent new taxa or novel phylogeographic lineages.

A recent study using molecular markers has shown a clear separation among *Cryptonanus* species (Fegies et al. 2021), reinforcing the usefulness of these markers for the identification of species (De La Sancha and D’Eliá 2015; Dias et al. 2016; Guerra and Costa 2021). Fegies et al. (2021) were able to identify two major lineages for *C. guahybae*, four lineages of *C. chacoensis*, and three lineages for *C. agricolai*. Here, we present new records of *C. agricolai*, including the first report from Maranhão state, in addition to other locations, in northeastern Brazil. Importantly, we also identify a novel mtDNA lineage in two specimens from Maranhão, indicating that *C. agricolai* is morphologically and genetically more variable than previously recognized.

Methods

Data collection and morphological analysis. We analyzed six specimens of *Cryptonanus* from four states in northeastern Brazil (Table 1). The material is deposited in the Mammal Collection

of the Federal University of Paraíba (UFPB). Craniodental and skin characters were analyzed following Voss et al. (2005) and Voss and Jansa (2009). The diagnostic characters for *Cryptonanus* species were compared with Voss et al.'s (2005) descriptions and figures. For the morphological analysis, two specimens of the genus *Gracilinanus* were included for comparison (Table 1).

Molecular analysis. DNA extraction was performed using Promega's Wizard Genomic DNA Purification Kit. We sequenced a fragment of the cytochrome b (Cytb) and cytochrome oxidase I (COI) genes in the mtDNA. Cytb was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers MVZ5 and MVZ16 (Smith and Patton 1993) with an initial denaturation at 94 °C for 3 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 45 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min, followed by a final extension of 72 °C for 10 min. The COI gene was amplified using the primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer et al. 1994) with an initial denaturation (94 °C for 3 min), 40 cycles of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (48 °C for 45 s), and extension (72 °C for 1 min and 30 s), and a final extension at 72 °C for 3 min. PCR products were checked in agarose gel, purified enzymatically using the kit ExoProStar 1-Step (GE Healthcare), and sequenced using the BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) following the manufacturers' protocols. We used primers MVZ5 (Cytb) and HCO2198 (COI) for sequencing. The sequences were obtained using an ABI 3500 Automatic DNA sequencer with Associated Sequencing Analysis software (Applied Biosystems).

Data analysis. All chromatograms were checked in Bioedit v. 7.0.8.0 (Hall 1999), and the regions of low quality were manually removed from the final sequence. For the complete dataset, we included in the analysis 92 Cytb (MW208219–MW208298, KT334295, KM188469, KM188470–KM188476, KM188479–KM188481, KM188484, KR190438, KF313984) and 68 COI (MW208149–MW208216) sequences previously reported for *Cryptonanus* (Fegies et al. 2021),

which were concatenated totaling 108 individuals and 67 different haplotypes. We also included sequences from other species as outgroups, including *Chacodelphys formosa* (KU171186), *Gracilinanus agilis* (AJ508401), and *Thylamys velutinus* (NC054268).

The sequences were aligned using the ClustalW (Thompson et al. 1994) algorithm implemented in Bioedit v. 7.0.8.0 (Hall 1999) using standard parameters, and then converted into the fasta format. We used DAMBE (Xia 2013) to evaluate the saturation curve of base replacements and DNASP v. 5.10.01 (Rozas et al. 2017) to identify the different haplotypes. The median-joining network (Bandelt et al. 1999) was separately estimated in Network v. 10.2.0 (fluxus-engineering.com) for each gene. The phylogenetic relationship among *Cryptonanus* genetic lineages were reconstructed for the concatenated Cytb/COI alignment using the maximum-likelihood (ML) method in IQTree v. 1.6.12 (Nguyen et al. 2015). For estimating the best molecular evolutionary model we created different partitions for each gene and used IQTree to select the best partitioning scheme and the best model for each partition using the Akaike information criterion (AIC). The best partition scheme merged the two genes in the same partition, and the best evolutionary model was TIM2+F+I+G4. We used the default settings for the tree search and 1,000 ultrafast bootstrap replicates to evaluate node support. The trees were visualized and edited in Figtree v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/fig-tree/>).

Results

Cryptonanus agricolai (Moojen, 1943)

New records. BRAZIL – Maranhão • Caxias, Área de Proteção Ambiental (APA) Municipal do Inhamum; -04.88, -043.4; 66 m alt.; 7.III.2011; D.C. Nascimento leg.; Genbank OM223076 and OM236542; ♂; UFPB9082 • Caxias, APA Municipal do Inhamum; -04.88, -043.4; 66 m alt.;

10.IV.2011; D.C. Nascimento leg.; Genbank OM223077 and OM236543; undetermined sex; DCN18 • Caxias, APA Municipal do Inhamum; -04.88, -043.4; 66 m alt.; 16.VII.2011; D.C. Nascimento leg.; Genbank OM236544; ♂; UFPB 9047 – **Ceará** • Quixadá; -04.95, -039.01; 189 m alt.; 23.VII.2009; G. Toledo leg.; Genbank OM223079; undetermined sex, UFPB10943 – **Pernambuco** • Arcoverde; -08.42, -037.05; 663 m alt.; 30.VI.2009; B.A.T.P. Campos; Genbank OM223080; ♀, BC397 – **Piauí** • Guadalupe; -06.85, -043.50; 177 m alt.; 21.III.2015; G. Toledo; Genbank OM223078; undetermined sex, TG09.

Identification. The four specimens for which morphological data were available (BC 397 and UFPB9082) were identified as *Cryptonanus* because, in comparison with *Gracilinanus* specimens, we observed narrower circular masks, smaller ears, shorter mystical vibrissas, and less dense and woolly dorsal hairs (Table 1). A short, dark midrostral band was present in both *Cryptonanus* specimens. Although Voss et al. (2005) considered this character absent in *Cryptonanus*, Dias et al. (2016) found the same pattern in *C. guahybae*. The cranial data from UFPB9082 corroborate this specimen's assignment to *Cryptonanus*, as it shows an absence of maxillary fenestration, the presence of both the secondary oval foramen, formed by a fine antero-medial process of the alisphenoid tympanic wing, and accessory cusps in the canines, characters that distinguish *Cryptonanus* from *Gracilinanus* (Fig. 2).

The dorsal fur pattern of BC 397, UFPB9047, UFPB9082, and UFPB10943 varies from brown to grayish, differing from *C. guahybae* which has distinctly reddish dorsal fur (Voss et al. 2005) (Fig. 3). However, the ventral portion of the fur was variable in our samples; while UFPB9082 had a grey-based fur color pattern, BC 397 had a more whitish color, without difference between the base and apex of the hair. Specimens UFPB 9047 and UFPB10943 were observed only in photographs, and therefore it was not possible to determine the color of the base of the

ventral fur. A grey-based ventral color pattern is considered typical of *C. guahybae*, while in *C. agricolai* most specimens show a more whitish pattern (with the exception of a grey-based ventral fur sample of *C. agricolai* from Lagoa Santa, Minas Gerais) (Voss et al. 2005). Therefore, these four specimens are consistent with *C. agricolai*, in agreement to specimens from collection site in the northeastern Brazil.

Molecular Identification. We obtained an 801-bp and 659-bp fragment of Cytb and COI, respectively, totaling 1524-bp for the six specimens collected in our study. We did not find any evidence of substitution saturation in the dataset (Fig. 4). The phylogeny of mtDNA lineages revealed that *Cryptonanus* formed a moderately supported clade (86% bootstrap support; BS) (Fig. 5). In agreement with the phylogeny of Fegies et al. (2021), we retrieved all major lineages for all species of *Cryptonanus*. Four specimens from this study, all from northeastern Brazil, fell within *C. agricolai* A (sensu Fegies et al. 2021), with high support (96% BS). However, two specimens from this study, all from Maranhão state, were retrieved as the most divergent within the *C. agricolai* clade A (98% BS). The haplotype network for both genes (H30 for Cytb; H22 for COI) corroborate the high differentiation of this lineage within *C. agricolai* clade A (Fig. 6).

Discussion

Based on the morphological data, we were able to clearly discriminate between *Cryptonanus* and *Gracilinanus*. However, the precise species identifications were difficult due to the lack of craniodental characters which could be used to distinguish all species (Voss et al. 2005) and due to the polymorphic fur color pattern in *C. agricolai*, as shown by this and other studies (Voss et al. 2005; Dias et al. 2016). In our study, both analyzed specimens had the canonical patterns of *C. agricolai* in the dorsal region, but not in the ventral region, for which the specimen

from Maranhão (UFPB9082) showed a gray-based pattern that has been associated with *C. guahybae* (contrary to the whitish pattern typical of *C. agricolai*; Gurgel-Filho et al. 2015). Dias et al. (2016) reported that fur color variation in *C. guahybae* may be due to age, but it is not clear if this could also be the case in *C. agricolai*, as both individuals were adults.

In contrast, the molecular analysis was conclusive in identifying these specimens as *C. agricolai* (Fig. 5). Interestingly, two specimens from Maranhão state showed a new mitochondrial lineage, which is sister to all previously reported lineages of *C. agricolai* clade A (sensu Fegies et al. 2021), while another individual collected from the same site showed a canonical *C. agricolai* clade A lineage. This finding highlights the phylogenetic diversity at a single site, and that indicates that genetic diversity in *Cryptonanus* may be underestimated in spite of recent and comprehensive studies (e.g., Fegies et al. 2021). An important caveat of this study is that we only used mtDNA markers for species (and lineage) identification. Because of its exclusive maternal inheritance, and because it represents a single genealogical event, it is not possible to evaluate how much of an independent evolutionary lineage this novel mtDNA lineage represents. Nonetheless, the novel lineage was identified in an ecotone between the Cerrado and Caatinga biomes, and other findings seem to suggest that ecotone regions in the area are associated with increased biodiversity, including the co-occurrence of two genetic populations of *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Nascimento et al. 2018), the first record of the rodent *Wiedomys cerradensis* Gonçalves, Almeida & Bonvicino, 2005 (Olímpio et al. 2014), and the occurrence of rare species of herpetofauna (Barros et al. 2008).

In summary, we expand the distribution of *C. agricolai* northward by 4° latitude, from -09.15 (Estação Ecológica de Uruçuí-Una, Piauí) to -04.88 (APA Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão), or 480 km. The new records of *C. agricolai* clade A are within the expected range for

the species, as they mainly occur in the South American “dry diagonal” (Vanzolini 1963), where this species is already known. However, our findings indicate that genetic diversity in the Brazilian Northeast, and especially in Cerrado–Caatinga ecotones, may be higher than previously anticipated.

Acknowledgements

We are grateful to the development agencies that contributed to this work: Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) financed the field project for the collection of specimens at the APA Municipal of Inhamum; and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) provided a doctoral scholarship to the first author. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; finance code 001(BATPC)). This work was supported by the collection of Mastozoology at the Universidade Federal da Paraíba, which is curated by Prof. Pedro Cordeiro Estrela, which also provided us with the photographs, to whom we are very grateful. We are also thankful for an anonymous reviewer for the suggestions in a previous version of the manuscript.

References

Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Barros MC (2012) Biodiversidade na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum. Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias, MA, Brazil, 142 pp.

Bezerra AMR, Carmignotto AP, Rodrigues FHG (2009) Small non-volant mammals of an ecotone region between the Cerrado hotspot and the Amazonian rainforest, with comments on their

taxonomy and distribution. *Zoological Studies* 48 (6): 861–874.

Bezerra AMR, Lazar A, Bonvicino CR, Cunha AS (2014) Subsidies for a poorly known endemic semiarid biome of Brazil: non-volant mammals of an eastern region of Caatinga. *Zoological Studies* 53 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/1810-522x-53-16>

Bonvicino CR, Lindbergh SM, Faria MB, Bezerra AMR (2012) The eastern boundary of the Brazilian cerrado: a hotspot region. *Zoological Studies* 51 (7): 1207–1218.

Carmignotto AP, Aires CC (2011) Mamíferos não voadores (Mammalia) da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins. *Biota Neotropica* 11 (1): 313–328. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000100029>

Carmignotto AP, Bezerra AMR (2014) Nonvolant small mammals from a southwestern area of Brazilian Cerrado: diversity, habitat use, seasonality, and biogeography. *Therya* 5 (2): 535–558. <https://doi.org/10.12933/therya-14-197>

de la Sancha NU, D'Elia G (2015) Additions to the Paraguayan mammal fauna: the first records of two marsupials (Didelphimorphia, Didelphidae) with comments on the alpha taxonomy of *Cryptonanus* and *Philander*. *Mammalia* 79 (3): 343–356. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0176>

Delciellos AC, Viana MC, Aguiéiras M, Chiaradia F, Gaspar DA (2016) First record of genus *Cryptonanus* (Didelphimorphia) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 12 (1): 1827. <https://doi.org/10.15560/12.1.1827>

Dias D, Fonseca C, Cherem JJ, Graipel ME, Christoff AU, Rocha RG (2016) New records of *Cryptonanus guahybae* (Tate, 1931) in southern Brazil inferred from molecular and morphological data. *Mammalia* 80 (2): 211–219. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2014-0071>

Díaz MM, Flores DA, Bárquez RM (2002) A new species of gracile mouse opossum, genus *Gracilinanus* (Didelphimorphia: Didelphidae), from Argentina. *Journal of Mammalogy* 83: 824–833. <https://www.jstor.org/stable/1383546>

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294–299.

Fegies AC, Carmignotto AP, Perez MF, Guillard MD, Lessinger AC (2021) Molecular phylogeny of *Cryptonanus* (Didelphidae: Thylamyini): evidence for a recent and complex diversification in South American open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 162: 107213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107213>

Garcia JP, Oliveira JA, Corrêa MMO, Pessôa LM (2010) Morphometrics and cytogenetics of *Gracilinanus agilis* and *Cryptonanus* spp. (Didelphimorphia: Didelphidae) from central and northeastern Brazil. *Mastozoologia Neotropical* 17 (1): 53–60.

Gardner AL, Creighton GK (1989) A new generic name for Tate's microtarsus group of South American mouse opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 102: 3–7.

Gomes L de P, Rocha CR, Brandão RA, Marinho-Filho J (2015) Mammal richness and diversity in Serra do Facão region, southeastern Goiás state, central Brazil. *Biota Neotropica* 15 (4): e0033. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2015-0033>

Guerra EB, Costa LP (2021) Range extension of *Cryptonanus agricolai* (Didelphimorphia, Didelphidae) and first record in the atlantic forest core: occurrence of a xeric associated species in a tropical forest biome. *Mastozoología Neotropical* 28 (1): e0524. <http://doi.org/10.31687/saremmn.21.28.1.0.17>

Gurgel-Filho NM, Feijó A, Langguth A (2015) Pequenos mamíferos do Ceará (Marsupiais, Morcegos e Roedores Sigmodontíneos) com discussão taxonômica de algumas espécies. *Revista Nordestina de Biologia* 23 (2): 3–150.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95–98.

Kocher A, Thoisy BD, Catzeflis F, Huguin M, Valiere S, Muriene J (2017) Evaluation of short mitochondrial metabarcodes for the identification of Amazonian mammals. *Methods in Ecology*

and Evolution 8: 1276–1283. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12729>

Lóss S, Costa LP, Leite YLR (2011) Geographic variation, phylogeny and systematic status of *Gracilinanus microtarsus* (Mammalia: Didelphimorphia: Didelphidae). Zootaxa 2761 (1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2761.1.1>

Moojen J (1943) Alguns mamíferos colecionados no nordeste do Brasil com a descrição de duas espécies novas e notas de campo. Boletim do Museu Nacional de Rio de Janeiro, Nova Série, Zoologia 5: 1–14.

Morrone JJ (2014) Biogeographical regionalisation of the neotropical region. Zootaxa 3782 (1): 001–110. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3782.1.1>

Nascimento DC, Campos B ATP, Fraga EC, Barros MC (2019) Genetic variability of populations of the White-eared Opossum, *Didelphis albiventris* Lund 1840 (Didelphimorphia; Didelphidae) in Brazil. Brazilian Journal of Biology 79 (4): 594–602. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.184842>

Nguyen L, Schmidt H. A, Haeseler A. Von, Minh BQ (2015) IQ-TREE : a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution 32 (1): 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Olímpio APM, Costa JF, Nascimento DC, Campos B ATP, Fraga EC, Barros MC (2016) *Wiedomys cerradensis* (Gonçalves, Almeida, Bonvicino, 2003) (Rodentia, Cricetidae): first record from the state of Maranhão, Brazil. Mammalia 80 (1): 97–101. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2014-0036>

Rozas J, Ferrer–Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Gracia A (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. Molecular Biology and Evolution 34 (12): 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Smith MF, Patton JL (1993) The diversification of South American murid rodents. Biological Journal of the Linnean Society 50: 149–177. <https://doi.org/10.1006/bijl.1993.1052>

Souza DP, Asfora PH, Lira TC, Astúa D (2010) Small mammals in Barn Owl (*Tyto alba* – Aves, Strigiformes) pellets from northeastern Brazil, with new records of *Gracilinanus* and *Cryptonanus*

(Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalian Biology* 75: 370–374.
<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.08.003>

Tate GHH (1931) Brief diagnoses of twenty-six apparently new forms of *Marmosa* (Marsupialia) from South America. *The American Museum of Natural History* 493: 1–14.
<http://hdl.handle.net/2246/3835>

Teta P, Díaz-Nieto JF (2019) How integrative taxonomy can save a species from extinction: the supposedly extinct Mouse Opossum *Cryptonanus ignitus* (Díaz, Flores and Barquez, 2000) is a synonym of the living *C. chacoensis* (Tate, 1931). *Mammalian Biology* 96: 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2019.04.004>

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673–4680.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Vanzolini PE (1963) Problemas faunísticos do cerrado. In: Simpósio sobre o Cerrado I. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 305–322.

Vivo M (2011) Checklist dos mamíferos do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11: 1–21. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500007>

Voss RS, Lunde DP, Jansa SA (2005) On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates* 2005 (3482): 1–36. [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2005\)482\[0001:OTCOGG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2005)482[0001:OTCOGG]2.0.CO;2)

Voss RS, Jansa SA (2009) Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2009 (322): 1–177. <https://doi.org/10.1206/322.1>

Xia X (2013) Dambe5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30 (7): 1720–1728.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst064>

Appendix

Table A1. The background data for generating the distributional map and additional information about the specimens analyzed in the present study. Institutions: UFPB = State Universities of Maranhão; MZUSP = USP Museum of Zoology; UFPE = Federal University of Pernambuco; UNB = National University of Brasília; UFMT = Federal University of Mato Grosso; IBUSP = Institute of Biosciences of São Paulo. Locality number refers to the map (Fig. 1). Brazilian states: PE = Pernambuco; CE = Ceará; PI = Piauí; MA = Maranhão; Al = Alagoas; BA = Bahia; SE = Sergipe; TO = Tocantins; MT = Mato Grosso; MG = Minas Gerais; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo.

<i>C. agricolai</i> mtDNA lineages	Field/tissue number	Voucher number/institution	Hap Cytb	Hap COI	Locality number	Locality	State	Genbank CYTB	Genbank COI
A	BC397		H33		1	Arcoverde	PE	OM223080	
A	T35	UFPB10943	H32		2	Quixadá	CE	OM223079	
A	TG09		H31		3	Guadalupe	PI	OM223078	
A	DCN18		H29	H23	4	Caxias / APA Municipal do Inhamum	MA	OM223077	OM236543
A	DCN14	UFPB 9082	H30	H22	4	Caxias / APA Municipal do Inhamum	MA	OM223076	OM236542
A	DCN30	UFPB 9047		H22	4	Caxias / APA Municipal do Inhamum	MA		OM236544
A	PCM 02	MZUSP	H20	H14	5	Barra do Camaragipe	AL	MW208246	MW208203
A	MTR 13508	MZUSP	H15	H12	6	Trancoso	BA	MW208241	MW208195
A	MTR 13510	MZUSP	H14	H11	6	Trancoso	BA	MW208240	MW208198
A	AP 889	UFPE 3014	H21	H13	7	REBIO Guaribas	PB	MW208247	MW208201
A	AP 919	UFPE 3016	H22	H14	7	REBIO Guaribas	PB	MW208248	MW208202
A	DAM 141	UFPE 2403	H23	H15	8	Igarassú	PE	MW208249	MW208200
A	UU 178	MZUSP 30516	H25	H17	9	ESEC Uruçuí-Una	PI	MW208251	MW208206
A	UUPI 134	MZUSP 30509	H27	H19	9	ESEC Uruçuí-Una	PI	MW208253	MW208207
A	UUPI 167	MZUSP 30511	H29	H21	9	ESEC Uruçuí-Una	PI	MW208255	MW208208
A	UUPI 419	MZUSP 30513	H28	H20	9	ESEC Uruçuí-Una	PI	MW208254	MW208205
A	UUPI 440	MZUSP 30514	H26	H18	9	ESEC Uruçuí-Una	PI	MW208252	MW208204
A	ARB 819	UFPB	H18	H11	10	Monte Alegre do Sergipe	SE	MW208244	MW208196
A	ARB 820	UFPB	H16	H13	10	Monte Alegre do Sergipe	SE	MW208242	MW208194
A	ARB 821	UFPB	H19	H11	10	Monte Alegre do Sergipe	SE	MW208245	MW208199

A	ARB 832	UFPB	H17	H11	11	Porto da Folha	SE	MW208243	MW208197
A	ARB 473	UNB 2588		H16	12	Paraná	TO		MW208193
A	APC 1351	MZUSP	H24	H16	13	ESEC Serra Geral do Tocantins	TO	MW208250	MW208192
B	MN7-09	MZUSP	H6	H6	14	Campo Verde / São Vicente - LT Madeira	MT	MW208232	MW208176
B	LAB061	UFMT 4023	H10	H9	15	Cuiabá	MT	MW208236	MW208179
B	M 111	MZUSP	H9	H8	16	Gaúcha do Norte	MT	MW208235	MW208178
B	MN6-42	MZUSP	H12	H10	17	Jangada / Rosário d'Oeste - LT Madeira	MT	MW208238	MW208184
B	ECO 1	MZUSP	H11	H7	18	Nova Xavantina	MT	MW208237	MW208180
B	ECO 11	MZUSP	H8	H7	18	Nova Xavantina	MT	MW208234	MW208182
B	ECO 9	MZUSP		H7	18	Nova Xavantina	MT		MW208181
B	RMM 220	MZUSP	H7	H16	19	Novo São Joaquim	MT	MW208233	MW208177
B	RMM 224	MZUSP	H13	H17	19	Novo São Joaquim	MT	MW208239	MW208183
C	CAP 033	MZUSP	H4	H4	20	Poços de Caldas	MG	MW208228	MW208187
C	DQM 013	MZUSP	H1	H1	21	PARNA Serra da Canastra	MG	MW208225	MW208185
C		MZUSP 35409	H5		22	Piraí	RJ	KT334295	
C	APC 1165	MZUSP	H5	H3	23	ESEC Santa Bárbara	SP	MW208229	MW208189
C	FU 60/30	IBUSP	H5	H5	24	Caucaia do Alto	SP	MW208231	MW208186
C	FB 103	IBUSP	H2	H2	25	Tapiraí	SP	MW208226	MW208188
C	FB 982	IBUSP	H5	H3	25	Tapiraí	SP	MW208230	MW208191
C	ITM 165	MZUSP 30767	H3	H3	26	Riacho Grande	SP	MW208227	MW208190

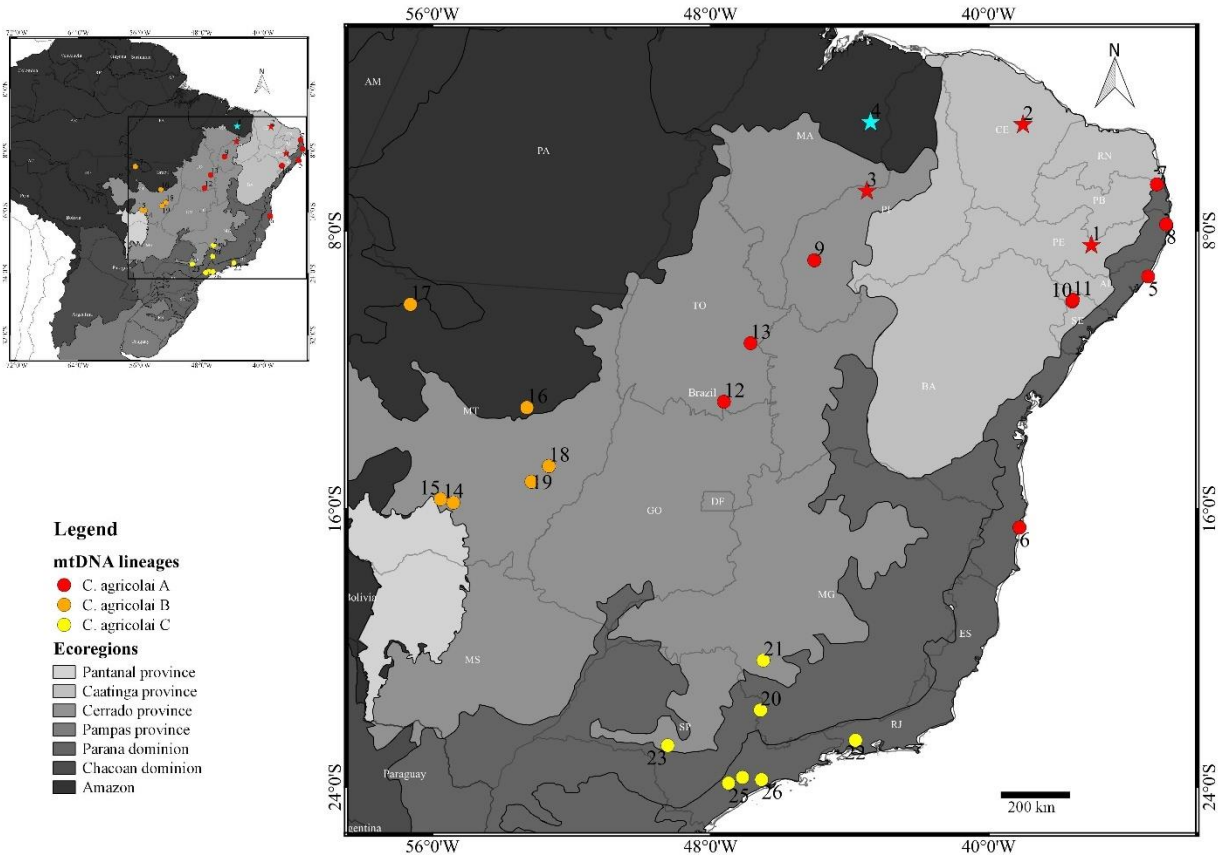


Figure 1. Species distribution for the genus *Cryptonanus agricolai*. The numbers refer to all localities detailed in Appendix Table A1. New records from this study are represented with a star (northeastern Brazil), and the location showing the new mtDNA lineage is shown in light blue. The ecoregions follow the patterns described by Morrone (2014). For the Amazon ecoregion we group the Boreal and South Brazilian domains and Xingu-Tapajós Province. Note: although the point located in the state of Maranhão is defined on the map within the Amazon ecoregion, this location does not belong to the Amazon biome, but to the Cerrado biome, within the Pará province by Morrone (2014).

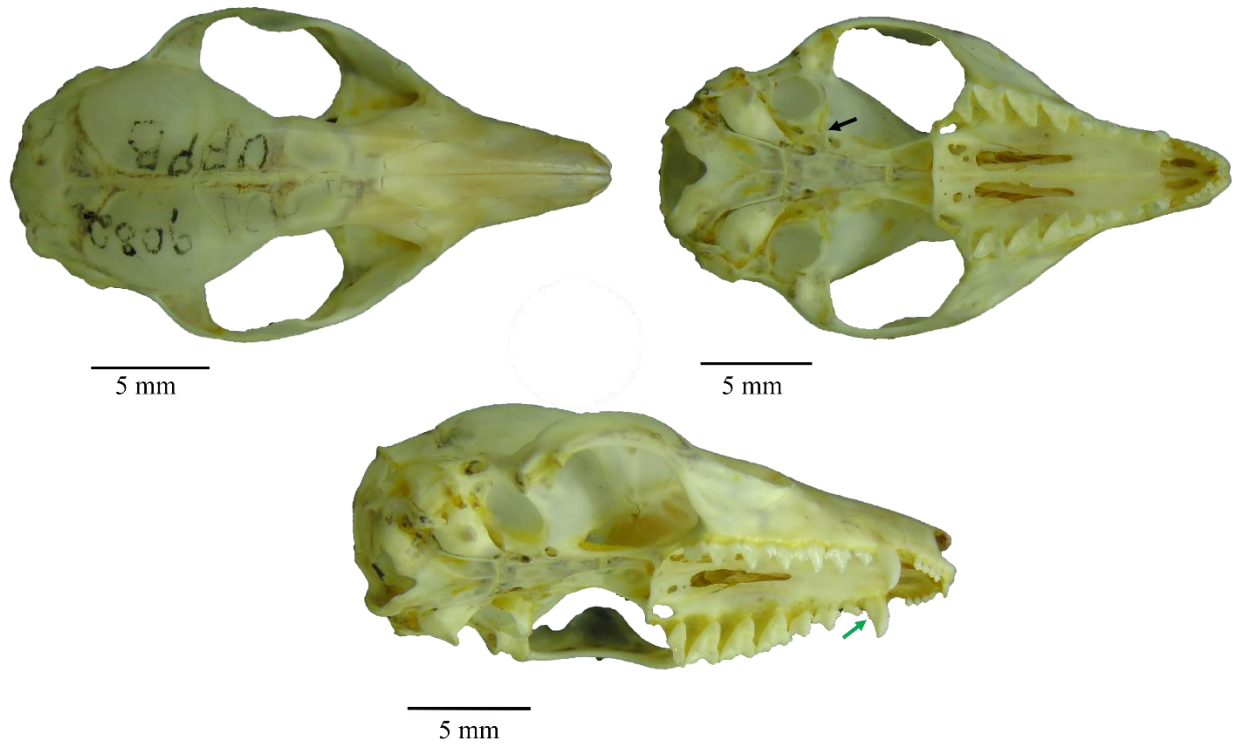


Figure 2. Cranium of *C. agricolai*, UFPB 9082, an adult male from Caxias, Maranhão, Brazil. The black arrow points to the antero-medial tympanic wing alisphenoid process; the green arrow points to accessory cusps in the canines.

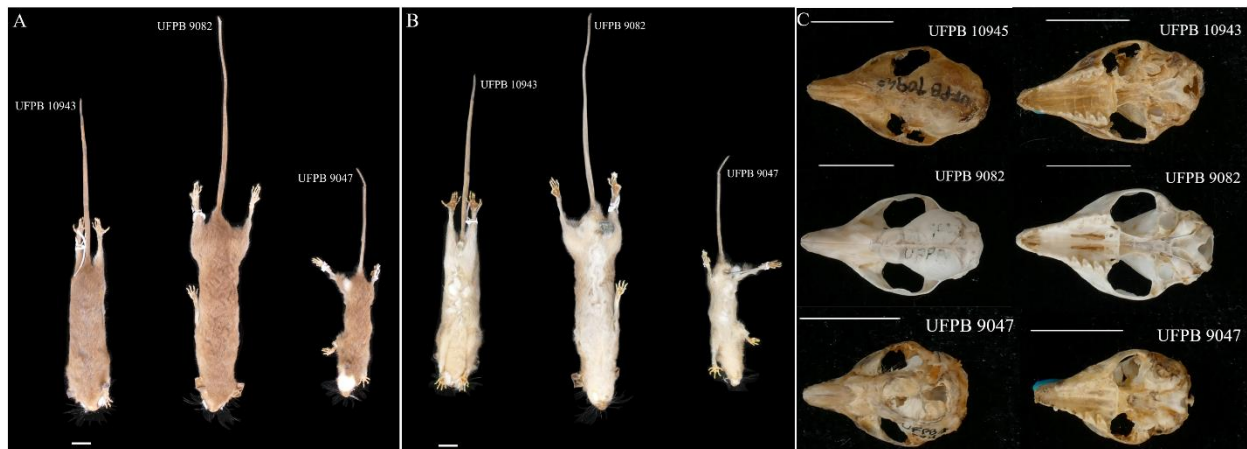


Figure 3. *Cryptonanus agricolai* from this study in dorsal and ventral view. **A, B.** Fur. **C.** Skull. Scale bar = 1 cm.

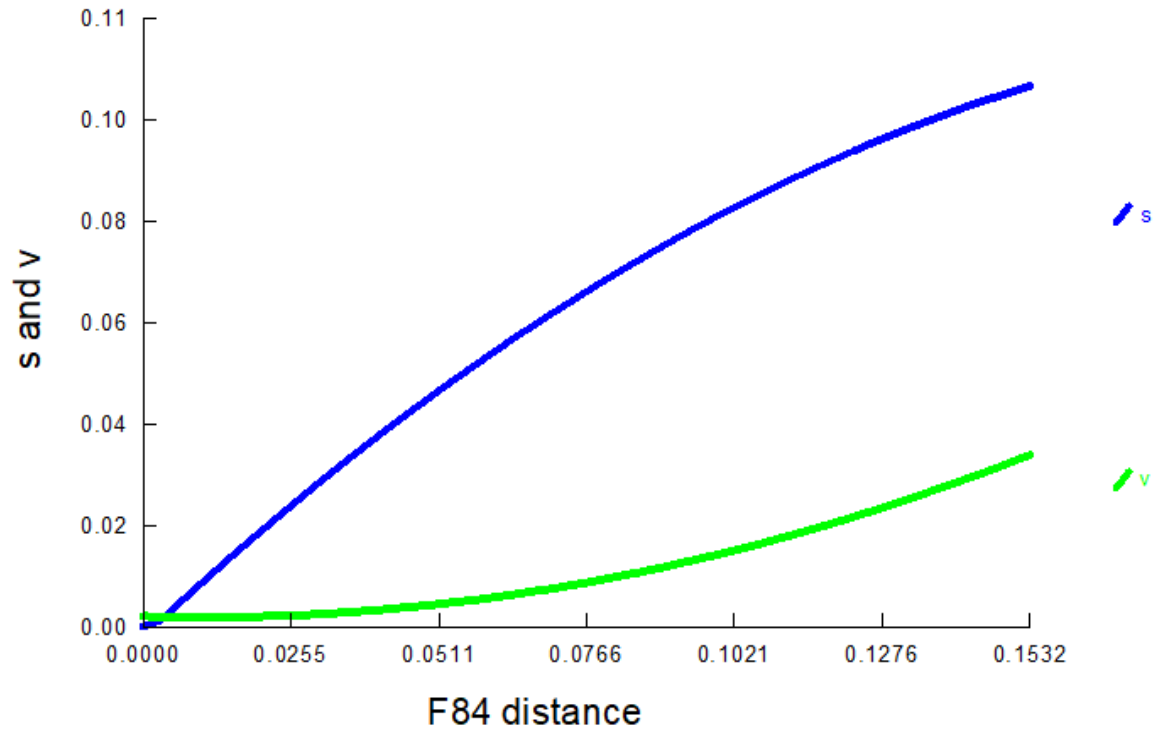


Figure 4. Saturation plot for the mtDNA data analyzed here considering both transitions (s) and transversions (v).

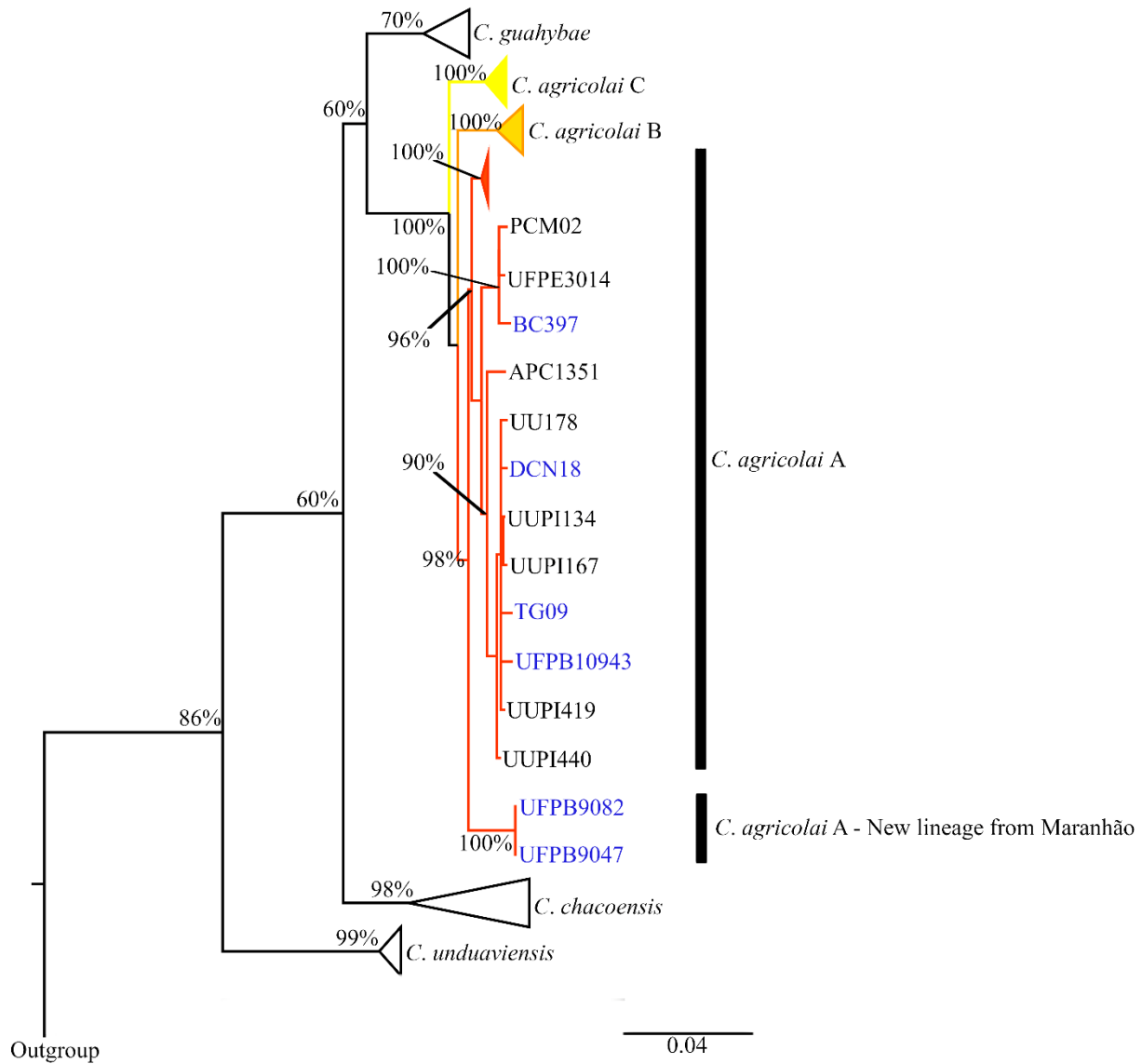


Figure 5. Maximum-likelihood phylogenetic tree for *Cryptonanus* specimens based on Cytb + COI. Numbers on branches correspond to bootstrap support values. Each terminal is identified by an alphanumeric specimen identifier and species as in Fegies et al. (2021) (see Table 1). New records are shown in blue.

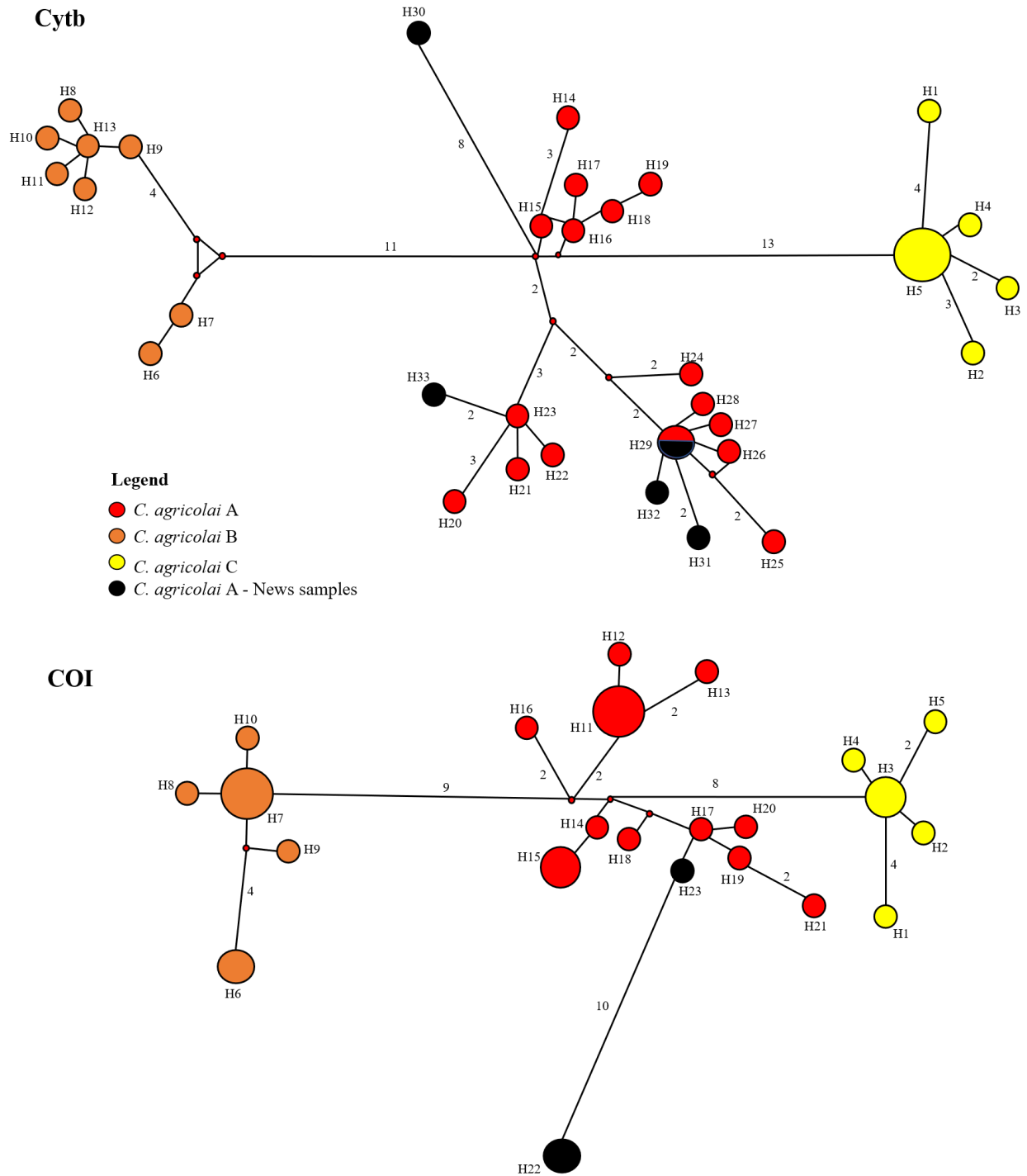


Figure 6. Haplotype network generated using the Cytb and COI genes for *Cryptonanus agricolai*. The number represents the mutational sites between the haplotypes (spaces without numbers corresponds to a mutation), while the size of the circles is proportional to the frequency of occurrence of the haplotypes.

Table 1. Details of the *Cryptonanus agricolai* and *Gracilinanus agilis* specimen analyzed in the present study.

Species	Field Number	Voucher	Locality	Latitude	Longitude	Morphological data	Cytb	COI	HB	TL	EL	HL	Sex
<i>C. agricolai</i>	BC397		BR: PE/Arcoverde	-08.41	-037.05	Skin	H33	—	95	105	16	14/14.5	F
<i>C. agricolai</i>	T35	UFPB10943	BR: CE/Quixadá	-04.95	-039.01	Skin, skull	H32	—	76	96	16	13/13	M
<i>C. agricolai</i>	TG09	—	BR: PI/Guadalupe	-06.85	-043.50	—	H31	—					
<i>C. agricolai</i>	DCN18	—	BR: MA/Caxias	-04.88	-043.40	—	H29	H23					
<i>C. agricolai</i>	DCN14	UFPB9082	BR: MA/Caxias	-04.88	-043.40	Skin, skull	H30	H22	85	107	15	13	M
<i>C. agricolai</i>	DCN30	UFPB9047	BR: MA/Caxias	-04.88	-043.40	Skin, skull	—	H22		67	11	10	M
<i>G. agilis</i>	—	UFPB9343	BR: MS/Corumbá	—	—	Skin	—	—	120	93	19	17/16	M
<i>G. agilis</i>	—	UFPB9373	BR: MS/Corumbá	—	—	Skin	—	—	139	108	21	12/12	F

BR = Brazil; PE = Pernambuco; CE = Ceará; PI = Piauí; MA = Maranhão; HB = head-to-body length; TL = tail length; EL = ear length; HL = hindfoot length.

5. CONCLUSÃO GERAL

Para o gênero *Cryptonanus* usamos dois genes mitocondriais, COI e *Cyt b*, os dois genes concatenados trouxeram como novidade a indicação de uma nova linhagem mitocondrial para o cerrado brasileiro, no estado do Maranhão, em uma localidade em que ainda não havia registro para a espécie *Cryptonanus agricolai*. Esta diversidade críptica em áreas pouco amostradas indicam a grande variedade de ambientes que existe nos biomas neotropicais, o que pode ser relevante na identificação de linhagens de especial interesse para conservação.

Para o gênero *Gracilinanus* foi usado cerca de 800 pares de bases do gene “padrão” para estudos com mamíferos, o *Cytb*, o qual tem uma ampla quantidade de sequências nos bancos de dados. Numa abordagem mais ampla, em relação a *Cryptonanus*, pudemos identificar as relações filogenéticas do gênero, o qual tem como grupo irmão o clado formado pelos gêneros *Thylamys* e *Lestodelphys*, vimos também suas relações filogenéticas inter e intraespecíficas, além disso pudemos detectar os processos históricos de mudanças das áreas onde o gênero *Gracilinanus* está distribuído. A filogenia do gênero foi composta por dois clados, um formado por *G. marica* + *G. microtarsus* apresentou baixo suporte filogenético, o que pode indicar alguma lacuna no processo coalescente do gene analisado, a falta de sequência de uma espécie do gênero (*G. dryas*) nas nossas análises, uma espécie também de floresta, pode estar levando a essa instabilidade; o outro clado incluiu as demais espécies do gênero, os qual foi agrupado da seguinte forma com altos suportes: ((*G. emiliae* + *G. aceramarcae*) + (*G. agilis* + *G. peruanus*)).

A biogeografia histórica do gênero mostrou que as espécies de *Gracilinanus* sofreram grande influência dos processos orogênicos sul americanos, em especial os ocorridos em virtude do soergimento da cordilheira dos Andes, a oeste do continente, desde o Mioceno médio, quando as seis espécies divergiram, até o Pleistoceno quando as diversificações populacionais devem ter

ocorrido dentro de *G. agilis*, na diagonal aberta, e *G. microtarsus*, na Mata Atlântica. O clado composto por espécies totalmente de floresta, *G. marica* + *G. microtarsus* iniciaram a diversificação do gênero, por volta de 7.3 Ma. atrás, tendo como possíveis condicionantes o soerguimento das serras na Mata Atlântica brasileira, porém não ficou claro como essas duas espécies hoje estão distribuídas em dois extremos do continente, norte da Amazônia (*G. marica*) e Mata Atlântica (*G. microtarsus*). Uma delas está bem distante do local onde o ancestral em comum estava distribuído, sugerido pelos nossos estudos como sendo Mata Atlântica e Cerrado, o que nos levou a concluir que essas duas espécies surgiram de forma independente, mais análises podem elucidar essas incertezas. O segundo clado a divergir foi o representado por espécies com adaptações para áreas mistas, florestais e secas, *G. emiliae* + *G. aceramarcae* por volta de 7.0 Ma. atrás e *G. agilis* + *G. peruanus*, por volta de 6.0 Ma. atrás, respectivamente, estas espécies tem distribuições adjacentes corroborando nosso achado. Nesse período surgiu também a diagonal seca sul-americana, indícios que esse período marca a origem do *Gracilinanus* de “mata seca”.

Dentre as espécies do gênero, *G. agilis* e *G. microtarsus* contam com números maiores sequências, o que nos permitiu fazer conclusões mais precisas sobre suas histórias de vida por meio da Análise de Computação Bayesiana. As populações das duas espécies, quatro para *G. agilis* (EC, NC, NMW e SMW) e três para *G. microtarsus* (SdMC, EMC e WMC), apresentam fortes indícios de estruturação populacional (Φ_{ST} variando de 0,27 à 0,77), estes altos índices é resultado das barreiras que separam cada uma delas, para *G. agilis*: Rio São Francisco e o planalto central foram os principais processos responsáveis pela formação dos clados observados. Nesta espécie eventos pleistocênicos do Último Máximo Glacial, por volta de 21.300 ya. podem ter impulsionado a expansão detectada na população originária da região Nordeste do Brasil (NC), a única que

evidenciou essa expansão. A presença de estrato vertical, com as expansões de florestas mais úmidas nos enclaves da Caatinga deu condições para a população se expandir.

Para *G. microtarsus* as origens das populações são mais antigas, o que se reflete na grande diversidade genética entre as populações mitocondriais identificadas, as quais apresentam um padrão de distribuição onde cada população se distribui por uma ecorregião da Mata Atlântica: Floresta Costal da Serra do Mar (SdMC), Floresta interior da Bahia (EMC) e Floresta Costal da Bahia (WMC), um dado pouco explorado, o qual pode também ser explicado através de eventos geológicos com papel fundamental sobre os condutores bióticos da ocorrência, abundância e capacidade de dispersão das espécies. Nenhuma dessas populações mostraram expansão, o que foi inesperado visto esta espécie ter uma indicação em outros trabalhos. Nas análises de modelagem de nicho ecológico essa espécie parece ser mais resiliente à instabilidade climática, o que a torna mais capaz de manter populações relativamente grandes mesmo em áreas não refugiadas, dando suporte aos nossos dados. Em virtude dos altos índices de diversidade, essa espécie é propensa a representar mais de um táxon, tornando-a ainda mais intrigante.

O gênero *Marmosa* foi estudado somente do ponto de vista morfológico, porém através de um método ainda não utilizado para suas espécies, as quais estão passando por um processo de mudanças taxonômicas de grande relevância das suas nomenclaturas. Foram feitas fotografias de espécimes distribuídos em uma ampla área de ocorrências das espécies de *Marmosa*, o que nos permitiu chegar a uma conclusão importante sobre as adaptações ambientais das espécies deste gênero. Por meio das comparações feitas através das variantes ecológicas (Floresta Amazônica, Mata Atlântica Norte e Sul do rio São Francisco e Diagonal Aberta), identificou-se diferenças significativas entre grupos ecológicos para ambos os subgêneros, sendo as duas principais

diferenças entre Floresta Amazônica vs. Mata Atlântica e sul vs. norte do rio São Francisco na Mata Atlântica.

No primeiro caso, podemos constatar algo bem explorado na literatura, e esperado, pois as duas florestas tropicais sul-americanas divididas por amplo corredor de matas secas contêm uma diversidade que se complementam, a olho nu já esperamos encontrar essa variação, os processos orogenéticos e climáticos propiciaram o isolamento desses dois biomas que se reflete nas populações que lá se encontram. O segundo caso é parecido, mas muito pouco explorado e identificado no que diz respeito às questões morfológicas, porém dados moleculares estão em abundância na literatura, nosso achado, então fornece subsídios para futuras comparações morfológicas de populações encontradas nas duas margens do rio São Francisco no norte da Mata Atlântica.

Nos dados havia tanto espécimes de florestas (Amazonia e Mata Atlântica) como de áreas secas (Diagonal aberta), o resultado poderia ter levado a união dos grupos das áreas pela suas características ecológicas, contudo, foi marcante a segregação desses por meio dos padrões históricos de fragmentação ambiental, no primeiro a separação das Florestas e no segundo a divisão vicariante da Mata Atlântica pelo rio São Francisco; assim, processos adaptativos associados a cada ambiente foram pouco decisivos nas separações observadas nas nossas análises. Quanto à taxonomia dos espécimes, alguns detalhes taxonômicos devem ser checados, em eventuais novas classificações do grupo, mas independente do subgênero, é notório que a separação observada não se restringe às espécies, mas sim aos ambientes em que estão inseridos, ou seja, as diferenças morfológicas parecem corresponder à variações entre grupos ecológicos, e não à variação taxonômica. Uma avaliação com espécies de outros gêneros de marsupiais didelfídeos com essas mesmas distribuições geográficas, como os didelfídeos de grande porte *Didelphis marsupialis*

(Floresta Amazônica) vs. *Didelphis albiventris* (Diagonal aberta) vs. *Didelphis aurita* (Mata Atlântica) e os de pequeno porte *Gracilinanus aceramarcae* e *G. marica* (Floresta Amazônica) vs. *G. agilis* (Diagonal aberta) vs. *Gracilinanus microtarsus* (Mata Atlântica), podem ajudar a elucidar essas indagações.

De modo geral, nossos estudos trazem diversas novidades para os pequenos marsupiais neotropicais, contudo, vale ressaltar que muito falta fazer para conhecer de maneira plena a dinâmica evolutiva desses pequenos mamíferos de grande valor ecológico para as matas brasileiras.

6. REFERÊNCIAS

- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 16: 5-16.
- Antonucci F, Costa C, Aguzzi J, Cataudella S (2009) Ecomorphology of morpho-functional relationships in the family of sparidae: A quantitative statistic approach. *Journal of Morphology*, 270(7): 843-855. <https://doi.org/10.1002/jmor.10725>
- Astúa D (2009) Evolution of scapula size and shape in didelphid marsupials (Didelphimorphia: Didelphidae). *Evolution*, 63(9): 2438-2456. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00720.x>
- Astúa D (2010) Cranial sexual dimorphism in New World marsupials and a test of Rensch's rule in Didelphidae. *Journal of Mammalogy*, 91(4): 1011-1024. <https://doi.org/10.1644/09-MAMM-A-018.1>
- Auler AS, Smart PL (2001) Late Quaternary Paleoclimate in Semiarid Northeastern Brazil from U-Series Dating of Travertine and Water-Table Speleothems. *Quaternary Research*, 55: 159-167. <https://doi.org/10.1006/qres.2000.2213>
- Awise JC, Arnold J, Ball RM, Lambt T, Neigel JE, Carol A, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18: 489-522.
- Behling H, Arz HW, Wefer G (2000) Late Quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil inferences from marine core GeoB 3104-1. *Pergamon*, 19: 981-994.
- Bonvicino CR, Lindbergh SM, Maroja LS (2002) Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potencial use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4B): 765-774. [10.1590/S1519-69842002000500005](https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000500005)
- Breno M, Leirs H, Dongen SV (2011) Traditional and geometric morphometrics for studying skull morphology during growth in *Mastomys natalensis* (Rodentia:Muridae). *Journal of Mammalogy*, 92(6): 1395-1406. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-A-331.1>
- Bueno-Silva M (2012) Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições

- e desafios. *Estudos de Biologia*, 4(83): 157-163. <https://doi.org/10.7213/estud.biol.7329>
- Burr T, Skurikhin A (2013) Selecting Summary Statistics in Approximate Bayesian Computation for Calibrating Stochastic Models. *BioMed Research International*, 2013: 210646. 10.1155/2013/210646
- Bruschi DP, Peres EA, Lourenço LB, Bartoletti LFM, Sobral-Souza T, Recco-Pimentel SM (2019) Signature of the paleo-course changes in the São Francisco River as source of genetic structure in neotropical *Pithecopus nordestinus* (Phyllomedusinae, Anura) treefrog. *Frontiers in Genetics*, 10 (728): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00728>
- Cardini A, Higgins PO, Road C (2004) Patterns of morphological evolution in Marmota (Rodentia: Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny ecology and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(3): 385-407. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00367.x>
- Cardoso D, Särkinen T, Alexander S, et al. (2017) Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *PNAS*, 114 (40). <https://doi.org/10.1073/pnas.1706756114>
- Centeno-Cuadros A, Hulva P, Romportl D, Santoro S, Stríbná T, Shohami D, Evin A, Tsoar A, Benda P, Horáček I, Nathan R (2017) Habitat use but not gene flow is influenced by human activities in two ecotypes of Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *Molecular Ecology*, 26: 6224-6237. <https://doi.org/10.1111/mec.14365>
- Cerboncini RAS, Rubio MBG, Bernardi IP, Braga TV, Roper JJ, Passos FC (2014) Small mammal community structure and vertical space use preferences in nonfragmented Atlantic Forest. *Mammalia*, 78(4): 429-436. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0128>
- Colinvaux PA, Oliveira PE, Moreno JE, Miller MC, Bush MB (1996) A Long Pollen Record from Lowland Amazonia: Forest and Cooling in Glacial Times. *Science*, 274(5284): 85-88. [10.1126/science.274.5284.85](https://doi.org/10.1126/science.274.5284.85)
- Colley E, Fischer ML (2013) Especiação e seus mecanismos: histórico conceitual e avanços recentes. *História, Ciências, Saúde*, 20(4): 1671-1694. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104->

- Conesa MÀ, Mus M, Rosselló JA (2012) Leaf shape variation and taxonomic boundaries in two sympatric rupicolous species of *Helichrysum* (Asteraceae: Gnaphalieae) assessed by linear measurements and geometric morphometry. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106(3): 498-513. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01889.x>
- Cooper WJ, Parsons K, McIntyre A, Kern B, McGee-Moore A, Albertson RC (2010) Benthopelagic divergence of cichlid feeding architecture was prodigious and consistent during multiple adaptive radiations within African Rift-Lakes. *PLoS ONE* 5(3): e9551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009551>
- Cordeiro-Estrela P, Baylac M, Denys C, Marinho-Filho J (2006) Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: Geometric morphometrics assessment. *Journal of Mammalogy*, 87(6): 1270-1279. <https://doi.org/10.1644/05-MAMM-A-293R3.1>
- Cordeiro-Estrela P, Baylac M, Denys C, Polop J (2008) Combining geometric morphometrics and pattern recognition to identify interspecific patterns of skull variation: Case study in sympatric Argentinian species of the genus *Calomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) *Biological Journal of the Linnean Society*, 94(2): 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.00982.x>
- Cornuet JM, Ravigné V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics*, 11(401). <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/401>
- Costa LP (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.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*, 15 (7): 290-295.
- Cruz FW, Burns SJ, Jercinovic M, Karmann I, Sharp WD, Vuille M (2007) Evidence of rainfall variations in Southern Brazil from trace element ratios (Mg/Ca and Sr/Ca) in a Late Pleistocene stalagmite. *Science Direct*, 71: 2250-2263.

<https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.02.005>

- Damasceno EM, Astúa D (2016) Geographic variation in cranial morphology of the Water Opossum *Chironectes minimus* (Didelphimorphia Didelphidae). *Mammalian Biology*. 81 (4): 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.02.001>
- Almeida AJ, Torquetti CG, Talamoni SA (2008) Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in an urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(2): 214-219. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752008000200008>
- Freitas TRO, Fernandes FA, Fornel R, Roratto PA (2012) An endemic new species of tuco-tuco genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) with a restricted geographic distribution in southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 93(5): 1355-1367. <https://doi.org/10.1644/12-MAMM-A-007.1>
- Fegies AC, Carmignotto AP, Perez MF, Guilardi MD, Lessinger AC (2021) Molecular Phylogeny of *Cryptonanus* (Didelphidae: Thylamyini): Evidence for a recent and complex diversification in South American open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162: 107213.
- Dolman G, Moritz C (2006) A multilocus perspective on refugial isolation and divergence in rainforest skinks (*Carlia*). *Evolution*, 60(3): 573-582.
- Eads AR, Mitchell NJ, Evans JP (2012) Patterns of genetic variation in desiccation tolerance in embryos of the terrestrial-breeding frog *Pseudophryne guentheri*. *Evolution* 66(9): 2865-2877. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01616.x>
- Evin A, Horáček I, Hulva P (2011) Phenotypic diversification and island evolution of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus* group) in the Mediterranean region inferred from geometric morphometrics and molecular phylogenetics *Journal of Biogeography* 38: 2091-2105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02556.x>
- Faria MB, Nascimento FF, Oliveira JA, Bonvicino CR (2013b) Biogeographic Determinants of Genetic Diversification in the Mouse Opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity*, 104(5): 613-626. <https://doi.org/10.1093/jhered/est039>
- Flach R, Abrahão G, Bryant B, Scarabello M, Soterroni AC., Ramos FM, Valin H, Obersteiner M, Cohn AS (2021) Conserving the Cerrado and Amazon biomes of Brazil protects the soy

- economy from damaging warming. *World Development*, 146(105582).
<https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2021.105582>
- Garcia-Cisneros A, Palacín C, Ventura CRR, Feital B, Paiva PC, Pérez-Portela R (2018) Intraspecific genetic structure divergence and high rates of clonality in an amphi-Atlantic starfish. *Molecular Ecology*, 27: 752-772. <https://doi.org/10.1111/mec.14454>
- Gardner (2008) Mammals of South America, Volume 1 Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats, pp. 51-61. *The University of Chicago Press*, Chicago and London.
- Gehara M, Garda AA, Werneck FP, Oliveira EF, Emanuel M, Felipe F, Magalh FDM, Lanna M, Sites JW, Ricardo J, Vin RS, Gabriel GRC, Burbrink CCFT (2017) Estimating synchronous demographic changes across populations using hABC and its application for a herpetological community from northeastern Brazil. *Molecular Ecology*, 26: 4756-4771.
<https://doi.org/10.1111/mec.14239>
- Gutiérrez EE, Jansa SA, Voss RS (2010) Molecular Systematics of Mouse Opossums (Didelphidae: Marmosa): Assessing Species Limits using Mitochondrial DNA Sequences, with Comments on Phylogenetic Relationships and Biogeography. *American Museum of Natural History*, 55108 (3692): pp. 22.
- Guerra EB, Costa LP (2021) Range extension of *Cryptonanus agricolai* (Didelphimorphia, Didelphidae) and first record in the atlantic forest core: occurrence of a xeric associated species in a tropical forest biome. *Mastozoología Neotropical*, 28 (1): e0524.
<http://doi.org/10.31687/saremmn.21.28.1.0.17>
- Hare MP, Avise JC (1997) Population Structure in the American Oyster as Inferred by Nuclear Gene Genealogies. *Nuclear Genealogies*, 15(2): 119-128.
- Harlin-cognato AD, Markowitz T, Würsig B, Honeycutt RL (2007) Multi-locus phylogeography of the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*): passive dispersal via the west-wind drift or response to prey species and climate change? *BMC Evolution Biology*, 7(131): 1-17.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-131>
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512): 313-21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218

- Ivanova NV, Clare EL, Borisenko AV (2012) DNA Barcoding in Mammals. In: Kress, W., Erickson, D. (eds) DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology, vol. 858. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_8
- Agrizzi JA, Loss C, Farro APC, Duda R, Costa LP, Leite YLR (2012) Molecular diagnosis of atlantic forest mammals using mitochondrial DNA sequences: Didelphid Marsupials. *The Open Zoology Journal*, 5(1): 2-9. <http://dx.doi.org/10.2174/1874336601205010002>.
- Hepp LU, Fornel R, Restello RM, Trevisan A, Santos S (2012) Intraspecific morphological variation in a freshwater crustacean *aegla plana* in Southern Brazil: Effects of geographical isolation on carapace shape. *Journal of Crustacean Biology* 32(4): 511-518. <https://doi.org/10.1163/193724012X630660>
- Hey J, Machado CA (2003) The study of structured populations — new hope for a difficult and divided science. *Genetics* 4: 535-543. <https://doi.org/10.1038/nrg1112>
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD (2010) Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeography's past present and future: 10 years after Avise 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (1): 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.016>
- Hurt C, Anker A, Knowlton N (2009) A multilocus test of simultaneous divergence across the Isthmus of Panama using snapping shrimp in the genus *Alpheus*. *Evolution*, 63(2): 514-530. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00566.x>
- Knowles LL (2009) Statistical Phylogeography. *Annual Review Of Ecology Evolution and Systematics*, 40: 593-612. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095702>
- Kulemeyer C, Asbahr K, Gunz P, Frahnert S, Bairlein F (2009) Functional morphology and integration of corvid skulls a 3D geometric morphometric approach. *Frontiers in Zoology*, 6(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-2>
- Kusnadi A, Kurnianto D, Madduppa H, Zamani NP, Ibrahim PS, Hernawan UE, Utami RT, Triandiza T (2022) Genetic diversity and population structure of the boring giant clam (*Tridacna crocea*) in Kei Islands, Maluku, Indonesia. *Biodiversitas*, 23(3): 1273-1282. 10.13057/biodiv/d230311

- Lanna FM, Werneck FP, Gehara M, Fonseca EM, Colli GR, Sites JW, Rodrigues MT, Garda AA (2018) Molecular Phylogenetics and Evolution The evolutionary history of Lygodactylus lizards in the South American open diagonal. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 638-645. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.010>
- Laste KCD, Durigan G, Andersen AN (2018) Biodiversity responses to land-use and restoration in a global biodiversity hotspot: Ant communities in Brazilian Cerrado. *Austral Ecology* 44(2): 313-326. <https://doi.org/10.1111/aec.12676>
- Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M, Pardini R (2016) Neotropical Forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113: 1008-1013.
- Liu Z, Chen G, Zhu T, Zeng Z, Lyu Z, Wang J, Messenger K, Greenberg AJ, Guo Z, Yang Z, Shi S, Wang Y (2018) Prevalence of cryptic species in morphologically uniform taxa – Fast speciation and evolutionary radiation in Asian frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127: 723-731. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.020>
- Lóss S, Costa LP, Leite YLR (2011) Geographic variation, phylogeny and systematic status of *Gracilinanus microtarsus* (Mammalia: Didelphimorphia: Didelphidae). *Zootaxa* 2761 (1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2761.1.1>
- Maestri R, Ranghetti AL, Amaral EC, Dariva G (2013) Área foliar de *Merostachys skvortzovii* Sendulsky. (Poaceae) em diferentes estratos de altura da planta. *Erechim*, 37: 49-56.
- Maestri R, Monteiro LR, Fornel R, Freitas TROde & Patterson BD (2017a) Geometric morphometrics meets metacommunity ecology: environment and lineage distribution affects spatial variation in shape. *Ecography*, 40: 1-10. <https://doi.org/10.1111/ecog.03001>
- Maestri R, Monteiro LR, Fornel R, Upham NS, Patterson BD, de Freitas TRO (2017b) The ecology of a continental evolutionary radiation: Is the radiation of sigmodontine rodents adaptive? *Evolution*, 71(3): 610-632. <https://doi.org/10.1111/evo.13155>
- Márquez EJ, Cabeen R, Woods RP, Houle D (2012) The Measurement of Local Variation in Shape. *Evolutionary Biology*, 39(3): 419-439. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9159-6>
- Meireles E, Manos PS (2018) Pervasive migration across rainforest and sandy coastal plain

- Aechmea nudicaulis (Bromeliaceae) populations despite contrasting environmental conditions. *Molecular Ecology*, 27: 1261-1272. <https://doi.org/10.1111/mec.14512>
- Nascimento DC, Campos B ATP, Fraga EC, Barros MC (2018) Genetic variability of populations of the white-eared opossum, *Didelphis albiventris* Lund 1840 (Didelphimorphia; Didelphidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 79(4): 594-602. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.184842>
- Nascimento DC, Campos B ATP, Fraga EC, Barros MC, Fagundes NJR (2022) New records and a new mtDNA lineage of *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) (Didelphimorphia, Didelphidae) from Maranhão state, northeastern Brazil. *Check List*, 18(3): 515-523. <https://doi.org/10.15560/18.3.515>
- Ony M, Klingeman WE, Zobel J, Trigiano RN, Ginzl M, Nowicki M, Boggess SL, Everhart S, Hadziabdic D (2021) Genetic diversity in North American *Cercis Canadensis* reveals an ancient population bottleneck that originated after the last glacial maximum *Scientific Reports* 11(21803). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01020-z>
- Quintela FM, Gonçalves BI, Trindade GE, Santos MB, Tozetti AM (2013) Pequenos mamíferos não-voadores (Didelphimorphia Rodentia) em campos litorâneos do extremo sul do Brasil. *Biota Neotropica*, 13(4). <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000400025>
- Ribeiro MC, Martensen AC, Metzger JP, Tabarelli M, Scarano F, Fortin M (2011) *The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot*. In: Zachos, F., Habel, J. (eds) *Biodiversity Hotspots*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 405–434. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_21
- Semedo TFB, Brandão MV, Carmignotto AP, Nunes SM, Farias IP, Ferreira MN, Rossi RV (2015) Taxonomic status and phylogenetic relationships of *Marmosa agilis* peruana Tate 1931 (Didelphimorphia: Didelphidae) with comments on the morphological variation of *Gracilinanus* from central - western Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173: 190-216. <https://doi.org/10.1111/zoj.12203>
- Schluter D (2009) Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323 (5915): 737-741. <https://doi.org/10.1126/science.1160006>

- Sexton JP, Hangartner SB, Hoffmann AA (2013) Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common? *Evolution*, 68 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1111/evo.12258>
- Sifeddine A, Luiza A, Albuquerque S, Ledru M, Turcq B, Knoppers B, Martin L, Zamboni W, Mello D, Passenau H, Landim M, Campello R (2003) A 21 000 cal years paleoclimatic record from Lake northern Brazil: Caçó o evidence from sedimentary and pollen analyses. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 189 (1-2): 25-34. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00591-6](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00591-6)
- Silva LGDL, Ferreira DC, Rossi RV (2019) Species diversity of *Marmosa* subgenus *Micoureus* (Didelphimorphia, Didelphidae) and taxonomic evaluation of the white-bellied woolly mouse opossum, *Marmosa constantiae*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 187(1): 240-277. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlz023>
- Silveira MHB, Mascarenhas R, Cardoso D (2019) Pleistocene climatic instability drove the historical distribution of forest islands in the northeastern Brazilian Atlantic Forest. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 527 (1): 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.04.028>
- Teixeira M, Venticinque E, Lion M, Pinto M (2021) The Brazilian Caatinga protected areas: An extremely unbalanced conservation system. *Environmental Conservation*, 48(4): 287-294. doi:10.1017/S0376892921000308
- Voss RS, Lunde DP, Jansa SA (2005) On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates*, 2005 (3482): 1-36. [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2005\)482\[0001:OTCOGG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2005)482[0001:OTCOGG]2.0.CO;2)
- Voss RS, Jansa SA (2009) Phylogenetic Relationships and Classification of Didelphid Marsupials an Extant Radiation of New World Metatherian Mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 322: 177.
- Voss RS, Gutiérrez EE, Solari S, Rossi RV, Jansa SA (2014) Phylogenetic Relationships of Mouse Opossums (Didelphidae, *Marmosa*) with a Revised Subgeneric. *American Museum Novitates*, 2014 (3817): 27. <http://dx.doi.org/10.1206/3817.1>

- Voss RS, Giarla TC, Jansa SA (2021) A Revision of the Didelphid Marsupial Genus *Marmosa* Part 4. Species of the Alstoni Group (Subgenus *Micoureus*). *American Museum Novitates*, 2021 (3983): 31. <https://doi.org/10.1206/3983.1>
- Werneck FP, Gamble T, Colli GR, Rodrigues MT, Sites JW (2012) Deep diversification and long-term persistence in the South American ‘Dry Diagonal’: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution* 66(10): 3014-3034. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01682.x>
- Werneck FP, Leite RN, Geurgas SR, Rodrigues MT (2015) Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *Evolutionary Biology*, 15(94): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0368-3>
- Yang JQ, Hsu, KC, Liu, ZZ, Su L, Kuo P, Tang W, Zhou Z, Liu D, Bao B, Lin H (2016) The population history of *Garra orientalis* (Teleostei: Cyprinidae) using mitochondrial DNA and microsatellite data with approximate Bayesian computation. *BMC Evolution Biology* 16:73. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0645-9>