

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

**Inferências filogeográficas e estruturação
populacional de *Sturnira lilium* (Phyllostomidae)
da Mata Atlântica**

Sílvia Ramira Lopes Pinto

Vitória, ES
Fevereiro, 2008

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

**Inferências filogeográficas e estruturação
populacional de *Sturnira liliium* (Phyllostomidae)
da Mata Atlântica**

Sílvia Ramira Lopes Pinto

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

Vitória, ES
Fevereiro, 2008



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

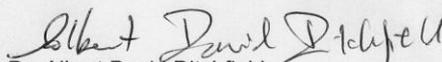
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Inferências filogeográficas e estruturação populacional de *Sturnira litium* (Phyllostomidae) de Mata Atlântica"

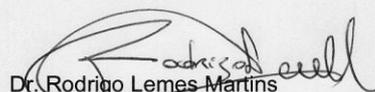
AUTORA: SÍLVIA RAMIRA LOPES PINTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Albert David Ditchfield

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:


Dr. Albert David Ditchfield
Orientador


Dr. Yuri Luiz Reis Leite
Membro Interno


Dr. Rodrigo Lemes Martins
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 29 de fevereiro de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Albert David Ditchfield

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P659i Pinto, Sílvia Ramira Lopes, 1981-
Inferências filogeográficas e estruturação populacional de
Sturnira lilium (Phyllostomidae) da Mata Atlântica brasileira / Sílvia
Ramira Lopes Pinto. – 2008.
56 f. : il.

Orientador: Albert David Ditchfield.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Genética de populações. 2. Diversidade biológica. 3.
Biologia molecular. 4. Morcego. 5. Mata Atlântica. I. Ditchfield,
Albert David. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

Agradecimentos

Ao meu orientador Albert David Ditchfield, pela paciência, confiança e generosidade por dividir comigo um pouco de sua grande sabedoria.

A minha mãe e aos meus irmãos por todo carinho e afeto, os quais foram indispensáveis para a concretização de mais um sonho. Mãe, sem você nada disso seria possível. Ao Vilacio, que me deu força e ânimo para continuar, que nunca me deixou desistir. Obrigada por puxar minha orelha, pela compreensão, carinho e por estar sempre do meu lado, nem sempre de corpo presente, mas sempre de coração e pensamento. “RO IME”.

Ao secretário da PPGBAN, Bruno Cola Greggio, pelos avisos de prazos, melhores datas para a retirada dos recursos e no meu caso, a melhor e mais correta forma de resolver problemas burocráticos. Aos colegas da turma de 2006 do PPGABAN, pelos momentos de descontração e por me fazer sentir cada dia mais no meio de cientistas importantes durante as discussões em sala. Em especial aos amigos Geovanni Ribeiro Loiola, Juçara Albina Gomes e Vilacio Caldara Junior, por estarem sempre dispostos a esclarecerem minhas dúvidas.

Aos que doaram tecidos hepáticos de *Sturnira liliium* para a realização dessa dissertação: Albert David Ditchfield (UFES), Carolina Aires (USP), Paulo Estefano (INPA), Poliana Mendes (UFES), Rafael Zerbini (UFES), Rodrigo Redondo (UFMG) e Yuri Luiz Reis Leite (UFES). Sem a colaboração de vocês a pesquisa ficaria muito mais difícil.

Ao Dr. João Stenghel Morgante, responsável pelo Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados – USP, que permitiu que eu usasse as dependências de seu laboratório para a realização da parte prática dessa dissertação. “Chefe”, obrigada por todo apoio financeiro e logístico. Obrigada também pelo carinho e preocupação em ir todos os dias ao LABEC saber como as minhas pesquisas andavam. Aos colegas do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados – USP obrigada por todo apoio, esclarecimento das dúvidas, ensinamentos e por me darem preferência nos PCRs. Vocês fizeram do LABEC minha segunda casa. Em especial, agradeço a Ana Carolina Pavan, por me hospedar e me aturar em seu pé por cinco meses.

As minhas amigas, Ana Carolina Pavan, Carla Zandonadi e Juçara Gomes. Meninas, obrigada pela amizade de ontem, hoje e sempre. Cada uma com seu jeito especial de ajudar, vocês estiveram comigo nos momentos mais difíceis, e mais alegres, suportando as crises de choros e gargalhadas. Compartilho com vocês essa vitória.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (Capes/MEC), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo recurso financeiro (PROAP) utilizado para a minha estadia em São Paulo. Ao Programa Taxonomia do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro que viabilizou minha estadia em São Paulo.

Sumário

Lista de Tabelas.....	8
Lista de Figuras.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Introdução.....	13
Materiais e Métodos.....	16
Resultados.....	22
Discussão.....	25
Referências Bibliográficas.....	37
Anexos.....	45
Apêndice.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), número de sítios polimórficos (s), diversidade nucleotídica (Pi), Fst, D de Tajima e Fs de Fu sobre cada população.....49

Tabela 2: Valores da Análise de Variância Molecular (AMOVA).....50

Tabela 3. Valores de Fst, representados na diagonal acima, e Nm representado na diagonal abaixo, comparando par- a-par as populações51

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição geográfica de *Sturnira liliium* na América do Norte, Central e do Sul.....45

Figura 2: Mapa com os pontos dos halótipos identificados de *S.lilium* envolvidas nesse estudo. Cada ponto no mapa representa uma localidade diferente de origem das amostras.....46

Figura 3: Representação esquemática das topologias das análises de agrupamento de vizinhos, máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Os valores nos clados indicam os valores de Bootstrap.....47

Figura 4: Rede de Haplótipos gerados pelo Network. Cada ponta da rede está relacionada com um dos clados gerados nas análises de máxima parcimônia, “neighbor-joining” e máxima verossimilhança.....48

Resumo

Na década de 1990, alguns pesquisadores propuseram que morcegos de distribuição continental apresentam baixos níveis de divergência gênica e pouca estruturação geográfica. Entretanto, estudos recentes demonstraram que algumas espécies de morcegos como *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus* possuem um alto nível de divergência de seqüência entre os indivíduos geograficamente distantes. Algumas espécies com baixa divergência de seqüência regionalmente, ainda assim mostraram estrutura geográfica em escalas maiores, como *Sturnira lilium*. Além disso, para algumas espécies que ocorrem na Mata Atlântica, foi proposta uma divisão filogenética de suas populações em dois clados: um nordeste e outro sudeste. Esse trabalho teve por objetivo descrever e analisar a estruturação filogeográfica das linhagens gênicas de populações de *S. lilium* em Mata Atlântica, analisar a diversidade gênica inter e intrapopulacional dessa espécie através de seqüências moleculares do gene citocromo b (DNAm_t) e relacionar filogeneticamente as amostras. A metodologia utilizada envolveu a extração de DNA a partir de tecido hepático, amplificação por PCR do gene citocromo b e seu seqüenciamento. As análises filogenéticas foram feitas usando os programas PAUP e GARLI. A rede de haplótipos foi gerada pelo NETWORK e as análises populacionais foram geradas pelos programas DNAsp e ARLEQUIN. As análises filogenéticas apontaram a existência de dois clados dentro da Mata Atlântica, que não estão estruturados geograficamente. Os clados formados condizem com o proposto em estudos anteriores, sendo que um deles está mais relacionado filogeneticamente com o grupo que

compreende amostras do Brasil e Guiana Francesa. A separação desses clados pode ser resultado da formação dos refúgios durante a última glaciação. No período que estiveram isoladas as linhagens do gene mitocondrial dentro das populações acabaram se divergindo, produzindo os clados característicos da Guiana Francesa e da América Central. Porém, este isolamento não foi suficiente para permitir a especiação. Neste caso, os haplótipos da Guiana Francesa encontrados no sudeste e nordeste brasileiro podem: 1- representar introgressão de haplótipos que lá se diferenciaram, mas que por fluxo gênico atingiram a Mata Atlântica; 2 – retenção de um haplótipo ancestral que se fixou nas Guianas Francesa, mas permaneceu em frequência baixa no sudeste e nordeste do Brasil; 3 – *S. liliium* como um complexo de espécies tanto na Guiana Francesa, como na Mata Atlântica brasileira. As análises populacionais indicaram que as populações dentro da Mata Atlântica não estão isoladas entre si. Algumas delas apresentaram desvio de neutralidade, sugerindo assim uma expansão populacional abrupta e recente. Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica sugerem que as populações estiveram isoladas e divergiram, apresentando um posterior contato, com a dispersão dos novos haplótipos formados entre si. Para se afirmar a história evolutiva da espécie, seria necessário um estudo envolvendo outros genes em conjunto com análises de dados morfológicos, para averiguar se a divergência gênica e a plasticidade fenotípica da espécie são simplesmente divergência gênica intra-específica com a possível retenção de caráter ancestral ou se há espécies crípticas dentro do grupo.

Abstract

Bats species exhibit degrees of genetic structure because they have a high potential for dispersal. Some scientist proposed that bats species with a continental distribution report low levels of genetic divergence and not much geographical structure. However, others researches shown that some bats species has high level of sequence divergence between geographical distances individuals. *Sturnira lilium* was characterized as a bat specie that presents low levels of sequence divergence within shared haplotypes and little geographic structure of the mtDNA clades. The objective of this study were to describe and analyze the possible geographical structure for genes lineages of *Sturnira lilium* populations; analyze intra and inter-population genetic diversity from *Sturnira lilium* in Atlantic rain forest and infer phylogenetics relation between the used samples. For this we used mitochondrial DNA gene cytochrome b. Either the phylogenetics analyses as the genetic population analyses indicate the same thing: *S.lilium* populations do not shown an evident geographical structure inside brazilian Atlantic rain forest., do not have isolated populations (high values of Nm and low values of Fst) and *S.lilium* populations maybe under a rapid expansion (stralike phylogeny and negative significant Tajima's D and Fu Fs). The higher levels of sequence divergence between the two clades pointed by phylogenetics analyses and the fact that this divergence aren't related with geographical structure guide us to question if brazilian Atlantic rain forest *S.lilium* might represents a home range expansion for the subspecie *Sturnira lilium pavidens* or if this divergence indicated *Sturnira lilium* as a criptical species complex.

Introdução

Filogeografia foi um termo introduzido por Avise *et al.* (1987), depois de observar que clones e clados de DNA mitocondrial (DNAMt) de diversas espécies tendem a ser geograficamente distintos. Avise (1994) definiu filogeografia como o estudo da distribuição geográfica das linhagens de genes dentro de uma espécie, ou em espécies próximas. Padrões filogeográficos semelhantes, potencialmente resultantes de eventos históricos comuns podem ser compartilhados por espécies diferentes ocupando uma mesma região.

Estudos realizados de forma independente apontam congruências no padrão de distribuição de linhagens de organismos dentro da Mata Atlântica, com localizações geográficas similares de clados de diferentes táxons. Uma divisão latitudinal da Mata Atlântica foi reconhecida para anfíbios (Muller, 1973; Lynch, 1979), répteis (Vanzolini, 1988), aves (Bates *et al.*, 1998) e até mesmo para opilionídeos (Pinto-da-Rocha *et al.*, 2005) por meio de uma análise parcimoniosa de endemismo e mais recentemente para répteis por meio de filogenias moleculares e citogenética (Pellegrino *et al.*, 2005). Alguns estudos filogeográficos realizados no bioma Mata Atlântica encontraram, para uma série de animais, que esta região comporta-se como uma área composta por pelo menos dois componentes: um norte e um sul. Normalmente a hipótese empregada para explicar o padrão implica na separação da Mata Atlântica em dois ou mais refúgios durante as mudanças climáticas do Pleistoceno (Whitmore e Prance, 1987). Porém, os componentes nem sempre se comportam como grupos irmãos quando comparados com espécies amazônicas, representando invasões distintas de clados amazônicos

(Mustrangi e Patton, 1997) e a complexidade deste assunto é discutida em Costa (2003).

Qual é o padrão encontrado para morcegos? Existe estruturação geográfica para morcegos na Mata Atlântica? Em geral, diferentes capacidades de dispersão parecem exercer importante influência nos padrões filogeográficos de DNAm (Awise, 1989). Morcegos exibem diferentes graus de estrutura gênica devido ao alto potencial de dispersão (Castella *et al.*, 2001). Patterson *et al.* (1992) propuseram que morcegos de distribuição continental apresentam baixos níveis de divergência gênica e pouca estruturação geográfica, talvez devido ao fluxo gênico alto. Espécies migratórias como *Tadarida brasilienses* apresentam uma baixa diferenciação gênica, com compartilhamento de haplótipos e baixos valores de F_{st} entre as colônias, sugerindo alto fluxo gênico entre as populações dessa espécie dentro de sua distribuição geográfica (Sinclair *et al.*, 1996, McCracken *et al.*, 1994, Wilkinson e Fleming, 1996). Esse padrão também foi observado para morcegos da família Phyllostomidae não migratórios (Ditchfield, 2000). Entretanto, Ditchfield (2000) demonstrou que algumas espécies de morcegos como *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata*, possuem um alto nível de divergência de seqüência entre os indivíduos geograficamente distantes e Martins *et al.* (2007) encontrou o mesmo para o morcego *Desmodus rotundus*. Ditchfield (2000) também identificou que algumas espécies com baixa divergência de seqüência e com compartilhamento de haplótipos, mostraram estrutura geográfica em escalas maiores, como por exemplo, o morcego frugívoro *Sturnira lilium*.

Para compreender o padrão de estrutura geográfica de morcegos na Mata Atlântica é necessário um estudo mais profundo de populações de localidades tanto próximas quanto distantes geograficamente, amostrando um número maior de indivíduos que nos estudos supracitados e uma quantidade maior de seqüências de DNA. Para *S. liliium*, Ditchfield (2000) encontrou uma separação de três clados distintos: O primeiro - composto por indivíduos da Mata Atlântica brasileira e Paraguai; o segundo - composto por indivíduos da Guiana Francesa e algumas amostras do sudeste brasileiro (Cajuru – SP e Itatiaia – RJ); o terceiro- composto por indivíduos da América Central. Os clados encontrados por Ditchfield (2000) possuíam pouca divergência de seqüência entre as amostras e um compartilhamento de haplótipos entre localidades distintas. É necessário averiguar se este padrão permanece o mesmo ampliando-se a amostragem na Mata Atlântica e a quantidade de seqüência amplificada.

Sturnira liliium apresenta ampla distribuição geográfica abrangendo desde o México, passando por toda América Central, até a América do Sul atingindo o norte da Argentina e Uruguai (figura 1) (Gannon *et al.*, 1989). Essa distribuição permite uma comparação de populações que abrangem uma grande área de Mata Atlântica. A observação dessa distribuição de linhagens dentro de populações de *S. liliium*, além de esclarecer hipóteses propostas anteriormente como a de Ditchfield (2000), pode acrescentar novos dados a esses estudos referentes a padrões filogeográficos de diferentes táxons dentro da Mata Atlântica.

Esse trabalho teve por objetivo: descrever e analisar a possível estruturação filogeográfica para as linhagens gênicas de populações de *S. liliium*; analisar a diversidade genética inter e intrapopulacional de *S. liliium* de Mata Atlântica através de seqüências moleculares de DNA mitocondrial do gene citocromo b e inferir relações filogenéticas entre as amostras.

Materiais e Métodos

I- Amostras

As amostras de *S. liliium* de tecido hepático utilizadas são provenientes do banco de tecidos da coleção do Laboratório de Estudos de Quirópteros da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do Laboratório de Mastozoologia (UFES), do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados da Universidade de São Paulo (USP) e do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Somam um total de 98 amostras em 9 estados brasileiros: Amazonas, Maranhão, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Mato Grosso. As amostras utilizadas e as respectivas localidades de coletas estão listadas no apêndice.

II- Extração de DNA a partir dos tecidos coletados

As amostras, que estavam conservadas em álcool, foram submetidas ao protocolo padrão de extração de DNA com NaCl/SDS/Proteinase K segundo Bruford *et al.* (1992). Após a extração os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para conferir as condições do DNA.

Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), para saber se o DNA encontrava-se íntegro (segundo, Maniatis *et al.*, 1989).

III- Amplificação do DNA extraído através da técnica de PCR

Foi realizada a amplificação do segmento de DNA mitocondrial de interesse através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A clonagem *in vitro* foi realizada em um termociclador (MJ Research Inc, CA, EUA). O marcador molecular utilizado para este estudo foi o gene codificador da enzima citocromo b (1140 pares de base), do DNA mitocondrial. Para as reações de PCR a partir de extratos de fígado, utilizou-se cinco primers obtidos a partir dos primers criados pelo Museum of Vertebrate Zoology (MZV – Berkley, CA, EUA): BAT 05A (5'-CGA CTA ATG ACA TGA AAA ATC ACC GTT G-3'), BAT 14A (5'-TAT TCC CTT TGC CGG TTT ACA AGA CC-3'), BAT 16A (5'-AAAAAGGAAGTATCATTCTGGCTTAAT-3'), BAT 17A (5' ACC TCC TAG GAG ACC CAG ACA ATT - 3') e BAT 04A (5' – GGA CTA TTC CTA CGT ATA CAT TAT - 3'). O perfil da reação de PCR consiste em 36 ciclos, cada ciclo envolvendo um período de desnaturação de 92°C por 60 segundos, um período de anelamento a 53°C por 60 segundos e um período de alongação da fita de DNA de 72°C por 90 segundos. Para conferir o sucesso da amplificação, o material amplificado foi submetido a uma corrente elétrica em gel de agarose 2,0% e o DNA. Depois o gel foi corado com um intercalante (solução de Brometo de etídio) segundo Maniatis *et al.* (1989) e visualizado sob incidência de luz UV em um transiluminador.

IV- Purificação do Produto de PCR

O produto amplificado foi purificado com enzimas purificadoras EXO/SAP na concentração de 1/1 a fim de se eliminar inibidores potenciais do passo seguinte – o seqüenciamento. As enzimas EXO/SAP foram aplicadas no produto de PCR, sendo o produto submetido ao termociclador por três passos: 37°C por 45 minutos, 80°C por 15 minutos e depois resfriado a 4°C. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% para quantificação do DNA em comparação com padrões de concentração previamente conhecidos do marcador molecular Low Ladder Mass (Invitrogen, Inc, CA, EUA) segundo Maniatis *et al.* (1989).

V- Reação de seqüenciamento

Com o produto de PCR purificado, foi aplicado em cada amostra uma solução contendo água, os primers que fizeram a reação de PCR do produto em questão, e um pré-mix do Kit de reação de seqüenciamento Dye Terminator (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing – GenomeLab). Depois, o produto com o mix de seqüenciamento foi submetido a uma PCR de 30 ciclos de três ciclos: 95°C por 20 segundos, 53°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

VI- Reação de Precipitação do Produto da reação de seqüenciamento

Para a precipitação do produto da reação de seqüenciamento foram adicionadas as amostras 80µl de isopropanol. As amostras com isopropanol descansaram no escuro por 20 minutos e depois foram submetidas à centrifuga de 13000 rpm por 45 minutos. Após essa primeira parte, o isopropanol foi

descartado por inversão do tubo e foram adicionados 200µl de etanol 70%. As amostras com etanol foram submetidas novamente à centrífuga por 23 minutos. Posteriormente, o etanol foi retirado e para finalizar o processo e as amostras foram secas no termociclador por 3 minutos a 95°C.

VII - Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA foi realizado seguindo um protocolo padrão de amplificação no qual o produto da amplificação do gene analisado serviu como o molde para gerar cadeias únicas numa amplificação assimétrica. O seqüenciamento foi feito nas duas direções para comparar as duas seqüências complementares e ter maior confiabilidade na seqüência final. A corrida do seqüenciamento foi feita no Instituto de Biociências no setor do Genoma Humano, na USP.

VIII - Análise das Seqüências

Com cada fragmento seqüenciado foi conduzida uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para verificar a ocorrência de contaminação e se o fragmento correspondem de fato ao citocromo b.

IX- Alinhamento

O alinhamento das seqüências de DNA foi realizado manualmente, concomitante à correção das seqüências no PhredPhrap (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998; Green, 1994) e comparado ao alinhamento automático produzido no programa MEGA desenvolvido por Kumar *et al.* (1994)

que lê o formato FASTA. As seqüências foram conferidas utilizando-se o programa BioEdit versão 7.0.90 (Hall, 1999) que, ao mostrar os picos das bases nitrogenadas lidas no seqüenciador, permitiu verificar erros no quadro de leitura. No caso de erros, as seqüências e os alinhamentos foram revisados.

X - Análise Filogenética

Para as inferências filogenéticas, a título de comparação, foram usadas três seqüências de grupo externo, *Artibeus liturartus* e *Chiroderma trinitatum* ambos retirados do GenBank (com os números de acesso: DQ 869393 e DQ 312413 respectivamente) e uma amostra de *S.tildae* da Amazônia (PEB806), doada pelo pesquisador Paulo Stefano do IMPA. Para a verificação do grau de saturação das bases nucleotídicas dentro das seqüências de DNA estudadas foi usado o programa DAMBE de Xia (2001). Para as análises que utilizaram o método de verossimilhança foi usado o programa MODELTEST de Posada e Crandall (1998) que sugeriu o modelo evolutivo TrN + G + I de substituições das bases nucleotídicas com diferentes freqüências para cada base e com um parâmetro alfa de 0.8244. As relações filogenéticas das seqüências de DNA obtidas foram determinadas por agrupamentos de "neighbor-joining" utilizando-se o programa PAUP* versão 4.0 desenvolvido por Swofford (2003) e máxima verossimilhança que foi feita utilizando-se o programa Garli (Zwickl, 2006). A validade das árvores foi testada via 1000 replicações de análises de "bootstrap" (Felsenstain, 1985). Também foi gerada uma rede de haplótipos através do programa Network e Tcs (versão 1.18, Clement *et al.*, 1993).

XI - Análise Populacional

As populações foram estabelecidas por distâncias geográficas, levando em consideração o bioma e a vegetação somando um total de 10 populações, são elas: Entre Rios- BA, Unai (Unai, Doresópolis, Furnas – MG), Cajuru – SP, Foz (Foz do Iguaçu, Sta Terezinha do Itaipu – PR), BH (Belo Horizonte, Ouro Preto – MG), Cubatão (Cubatão, Embu Guaçu, Moji das Cruzes, Salesópolis – SP), Águia Branca (Águia Branca, Ibirapu, Linhares, Aracruz, Domingos Martins, - ES), Morretes (Morretes, Guaratuba-PR), Cunha (Cunha, Ubatuba, Ilha Bela – SP; Itatiaia – RJ; Lima Duarte – MG), Sete Barras (Sete Barras e Ribeirão Grande -SP).

A estrutura genética da população foi estudada utilizando os algoritmos implementados no pacote estatístico ARLEQUIN™ versão 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) e o programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003). Foram estimados parâmetros inter-populacionais como: frequência dos haplótipos, análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), média de divergência par-a-par entre as populações e divergência genética (F_{st}) e número de migrantes por geração (N_m); parâmetros intra-populacionais como diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (H_d), número de sítios polimórficos (S). Foram realizados testes de neutralidade (Tajima, 1989; Fu 1996) para hipótese de crescimento populacional. Também foi gerada uma rede de haplótipos através do programa Network e TCS (versão 1.18) (Clement *et al.*, 1993).

Resultados

I - Análises Filogenéticas

Das 98 amostras, foram seqüenciados 1140 pares de base (bp) do gene mitocondrial citocromo b, com 428 sítios variáveis e 78 haplótipos sendo 14 haplótipos compartilhados por indivíduos de mesma localidade. As localidades geográficas dos haplótipos encontrados podem ser visualizadas na figura 2. As análises realizadas no programa DAMBE deram negativas para saturação.

A partir da análise de agrupamento de vizinhos, foi feita a análise de verossimilhança, que foi testada com 1000 replicações de “*bootstrap*”. Tanto as análises de “*neighbor-joining*”, e máxima verossimilhança apresentaram basicamente a mesma topologia, variando apenas na formação de mais ou menos politomias dentro de um dos clados gerados. Os haplótipos foram divididos em três clados e não houve um compartilhamento dos haplótipos entre as áreas geográficas envolvidas no estudo. Algumas amostras que foram doadas como *S.lilium*, ao serem analisadas junto das demais amostras e dos grupos externos, acabaram se agrupando com a amostra de *S.tildae*. Ao serem analisadas com outras amostras previamente seqüenciadas por Ditchfield (2000) também caíram junto do clado que envolvia *S.tildae*. Dessa forma as amostras AD858 (Amazonas), IP137 e IP138 (São Paulo) e AR134 (Mato Grosso) foram identificadas erradas e as análises de suas seqüências revelaram que essas amostras são na verdade *S.tildae*, fato que explica a grande divergência encontrada (9%) entre essas amostras e as demais estudadas.

Nas análises fica claro que não há separação de clados bem definidos geograficamente e existem clados que englobam haplótipos de diversas regiões que se distanciam até 3 301 km (Paraná a Maranhão). Isso pode ser observado na figura 3, que apresenta de forma resumida a topologia do “*bootstrap*” da análise de máxima verossimilhança. As análises do Network geraram uma rede de haplótipos, que pode ser observada na figura 4, similar as árvores filogenéticas, onde os ramos da redes correspondem aos clados das análises filogenéticas. As análises de TCS geraram seis redes que correspondem em parte com os filogrupos gerados nas análises de parcimônia, verossimilhança, “*neighbor-joining*” e a rede de haplótipos gerada pelo Network. Devido à alta divergência gênica entre os haplótipos, as redes geradas pelo TCS não puderam se conectar sob o princípio da parcimônia estatística usada pelo programa (Templeton *et al.*, 1987; Templeton e Sing, 1993) mesmo quando o intervalo de confiança foi abaixado para 90%.

Dentro dos clados gerados, a divergência gênica, que a título de comparação com outros trabalhos foi baseada no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, variou entre 0.02% a 2.5%, mas entre os clados a divergência chegou a 6% entre *S. liliium* e até 9% entre *S. liliium* e *S. tilda*.

II - Análise Populacional

Para cada população, foi calculado o número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd), o número de sítios polimórficos (S), a diversidade nucleotídica (Pi), a média de diferenças nucleotídicas (K), e o Fst. Além desses dados de estrutura populacional, foram feitos testes de neutralidade, como D de Tajima,

Fs de Fu, (Tajima, 1989; Fu 1996). Os valores dos parâmetros citados acima encontram-se listados na tabela 1. Todas as populações apresentaram altos valores de diversidade haplotípica ($H_d > 0,5$) (Grant e Bowen, 1998). As populações que apresentaram a maior diversidade haplotípicas foram as populações de Cunha ($H_d = 0,97$), Águia Branca ($H_d = 0,97$) e Cubatão ($H_d = 0,96$) e as que apresentaram os menores valores foram as populações de Unai ($H_d = 0,83$), Morretes ($H_d = 0,83$) e BH ($H_d = 0,73$). Todas as populações também apresentaram altos valores de diversidade nucleotídica ($P_i > 0,005$) (Grant e Bowen, 1998). As populações que apresentaram os maiores valores de diversidade nucleotídica foram: Sete Barras ($P_i = 0,048904$), Cajuru ($P_i = 0,04789$) e Unai ($P_i = 0,037135$) já as que apresentaram os menores valores foram: Foz ($P_i = 0,009113$), Águia Branca ($P_i = 0,011789$) e BH ($P_i = 0,014035$). As populações que apresentaram significância para o teste de desvio de neutralidade de Tajima (Tajima, 1989) foram as populações de Águia Branca ($D = 1,68$) e Cunha ($D = 1,92$). Os resultados da Análise de Variação molecular encontram-se na tabela 2, onde a variação dentro das populações (73.73) é maior do que a variação entre elas (26.27). E os valores de F_{st} e N_m par-a-par entre as populações estão descritos na tabela 3. As populações que apresentaram os maiores valores significativos ($p < 0,05$) de F_{st} entre si foram: Águia Branca e Cajuru ($F_{st} = 0,33371$), Cajuru e Foz ($F_{st} = 0,031108$) e Unai e Foz ($F_{st} = 0,024165$). As populações que apresentaram os menores valores significativos de F_{st} interpopulacional foram as populações de Águia Branca e Cunha ($F_{st} = 0,03077$), Entre Rios e Cunha ($F_{st} = 0,011284$) e Águia Branca e Cubatão ($F_{st} = 0,01163$). Os maiores valores encontrados para número de migrantes por geração entre as populações foram para as populações de Unai

e BH ($N_m = \text{infinito}$), Cajuru e Unai ($N_m = 46.30027$) e Águia Branca e Cunha ($N_m = 15.7500$), já os menores valores encontrados para esse parâmetro foram das relações entre as populações de: Cajuru e Águia Branca ($N_m = 0,99830$), Cajuru e Foz ($N_m = 1,10732$) e Foz e BH ($N_m = 1,40931$). A população que troca um maior número de migrantes com as outras populações é a população de Cunha. Isso provavelmente ocorre, pois essa população agrupa amostras de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, áreas que estão na região central da Mata Atlântica, estando assim em contato próximo com outras populações, fato que facilita a migração interpopulacional.

Discussão

As análises mostraram que para *S.lilium* existem vários lotes de haplótipos dentro de cada população, ou seja, existe uma diversidade haplotípica grande ao nível local, não há um compartilhamento amplo de haplótipos entre as localidades distantes de Mata Atlântica, como sugerido por Ditchfield (2000). Os haplótipos de fato compartilhados neste estudo são de localidades com menos de 100km entre si e não ultrapassam os limites dos estados. Ou seja, os haplótipos encontrados no estado do Espírito Santo só são encontrados nesse estado, mas houve o compartilhamento de um haplótipo entre os municípios de Linhares e Aracruz. Provavelmente essa divergência quanto ao compartilhamento de haplótipos se deve ao fato do corrente trabalho ter ampliado o tamanho do fragmento analisado, assim, amostras que antes foram considerados os mesmos haplótipos puderam ser diferenciadas. Mesmo assim, haplótipos muito semelhantes foram encontrados em localidades distantes, e numa dada localidade haplótipos relativamente distintos ocorriam

juntos. Este resultado corrobora o encontrado por Ditchfield 2000. De fato, esta diversidade haplotípica intrapopulacional é refletida nos valores intrapopulacionais de F_{st} , que dentro de cada população são relativamente altos e indicam que as populações englobam seqüências divergentes entre si.

Nas análises filogenéticas, houve a formação de dois clados envolvendo amostras de *S.lilium* que não apresentaram estruturação geográfica evidente e demonstraram-se muito divergentes entre si. O primeiro clado agrupa haplótipos de localidades geograficamente distantes, englobando diversas áreas da Mata Atlântica, incluindo amostras do Maranhão com amostras do Paraná, separadas por até 3 301 km. Esse clado também foi identificado por Ditchfield (2000), onde além de englobar amostras da Mata Atlântica também agrupava amostras do Paraguai. Ditchfield (2000) encontrou cerca 1,5% de divergência de média entre as seqüências desse clado, já o corrente estudo identificou 2% de divergência de média entre as seqüências. Provavelmente essa diferença se deve a uma maior amostragem de indivíduos para Mata Atlântica neste estudo (ampliando de 36 para 96) além de um aumento no número de pares de bases analisados nesse estudo (1140 pares de base) em relação ao estudo anterior (402 pares de base).

O segundo clado encontrado para as amostras de *S.lilium* agrupou algumas amostras da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Esse segundo clado também foi retratado por Ditchfield (2000), onde o autor identificou um clado composto por amostras do Panamá e a Guiana Francesa e dois haplótipos vindo do sudeste brasileiro (Cajuru – SP e Itatiaia – RJ). Este clado foi confirmado no presente estudo e adicionalmente foram identificadas mais 11

amostras cujas seqüências se agrupam com as amostras do Panamá e da Guiana Francesa. Estas amostras são provenientes do estado da Bahia (AD183 – Entre Rios), do estado de São Paulo (AD407 e AD408 – Cajuru; CA050 e CA085 – Cubatão), do estado de Minas Gerais (QUE05 – Unai) e do estado do Rio de Janeiro (AD267 e AD269 – Itatiaia). Estas amostras são encontradas em baixa freqüência na Mata Atlântica (11 seqüências de 98).

Ditchfield (2000) levantou três hipóteses para explicar a presença em baixa freqüência de haplótipos característicos da Guiana na Mata Atlântica. A primeira hipótese utiliza o conceito de vicariância e propõem a diferenciação de clados talvez em refúgios pleistocênicos sem que tivesse ocorrido especiação. Neste caso, os haplótipos da Guiana encontrados no Sudeste representam introgressão de haplótipos que se diferenciaram nas Guianas. Outra explicação possível seria a retenção de haplótipos ancestrais numa população grande. Finalmente, os haplótipos distintos podem ser evidência da existência de espécies crípticas de *S.lilium* e simpatria destas no sudeste do Brasil.

Haffer (1969) propôs que durante as variações climáticas do Pleistoceno a Floresta Amazônica foi dividida em pequenos fragmentos de floresta que ficaram isolados entre si e por sua vez da Mata Atlântica por áreas abertas sem vegetação fechada característica de floresta. Esses fragmentos funcionaram como refúgios para populações de várias espécies. Com o fim do ciclo glacial, a cobertura florestal se tornaria novamente contínua e essas populações expandiriam sua área de ocorrência até se encontrar estabelecendo um contato secundário (Haffer, 1997). Estas mesmas alterações climáticas globais também explicariam a fragmentação florestal na Mata Atlântica, que foi

entrecortada por áreas abertas, de acordo com estudos palinológicos (Behling e Lichte, 1997), em dois ou mais refúgios durante as mudanças climáticas do Pleistoceno (Whitmore e Prance, 1987). Conforme esses estudos, regiões que eram cobertas por florestas no quaternário possuíam formações completamente abertas no Pleistoceno (Behling e Lichte, 1997). Como o clima é sempre mais severo nas latitudes mais altas, provavelmente o efeito das mudanças climáticas foi mais dramático no sul do Brasil que no norte e nordeste. Assim, os fragmentos florestais na região do Estado de São Paulo, por exemplo, deveriam possuir uma área muito inferior que aqueles localizados mais ao norte, estando restritos a regiões como a Serra do Mar, cuja umidade teria permanecido alta mesmo nas épocas mais secas (Behling e Lichte, 1997). Menores fragmentos e populações menores acelerariam o processo de “*lineage sorting*” e, portanto, dado o tempo necessário, viabilizariam o surgimento de uma linhagem monofilética. Baseados nas hipóteses de refúgios vários pesquisadores propuseram uma divisão latitudinal da Mata Atlântica para diversos taxons (Muller, 1973; Lynch, 1979; Vanzolini, 1988; Bates *et al.*, 1998; Costa, 2003; Pinto-da-Rocha *et al.*, 2005; e Pellegrino *et al.*, 2005). Ditchfield (2000) também sugeriu que morcegos da família Phyllostomidae característicos de mata tenham um forte padrão de diferenciação geográfica quando comparado a outros morcegos. Sugeriu também uma divisão latitudinal para a distribuição de linhagens de morcego *Artibeus obscurus*, *Trachops cirrhosus* e *Carollia perspicillata* onde o autor reconheceu dois clados de morcegos distintos para a Mata Atlântica e atribuiu essa divisão a uma possível fragmentação pleistocênica. Pavan e Ditchfield (2006) encontraram para a espécie *Carollia perspicillata* um padrão filogeográfico composto por um clado

mitocondrial para o sudeste do Brasil como grupo-irmão de um clado norte amplo, que abrange indivíduos distribuídos em inúmeras localidades da América Latina. Este padrão filogeográfico é idêntico ao encontrado para a espécie *Myotis nigricans* (Aires *et al.*, dados não publicados), incluindo o sinal de expansão populacional para o grupo sul. Martins *et al.* (2007) propuseram a mesma divisão latitudinal da Mata Atlântica para o morcego hematófago *Desmodus rotundus* onde foram descritos quatro clados dentro da espécie, com um forte apoio estatístico para monofilia dos indivíduos da Mata Atlântica, sendo este o grupo mais derivado e formado por clados norte e sul.

Nos casos exemplificados acima, a estruturação geográfica é clara e ocorre uma divisão de clados que coincide com os possíveis refúgios do quaternário descritos para a Mata Atlântica. Porém, dentro da Mata Atlântica, *S. liliium* não apresenta estruturação geográfica. Como não há nenhuma estrutura geográfica evidente para *S. liliium* dentro da Mata Atlântica, ou a diferenciação de haplótipos entre os refúgios dentro da Mata Atlântica não ocorreu (talvez por que o isolamento entre refúgios não foi suficiente para permitir a diferenciação local), ou houve diferenciação sim, mas com o final do Pleistoceno os novos haplótipos formados localmente se dispersaram amplamente por toda a Mata Atlântica sendo encontrados em todas as populações. O fluxo gênico entre refúgios durante o Pleistoceno ou resultante da expansão e mistura ampla de populações no Holoceno ou algum outro interglacial anterior talvez explique a divergência gênica baixa (2% com a exclusão do clado relacionado com a Guiana Francesa) e a diversidade local alta de haplótipos, distribuídos de forma aleatória entre localidades geográficas. Ou ainda, durante a última glaciação a

maioria das populações de *S.lilium* podem ter se extinguido e uma única população foi mantida. Com a expansão da vegetação essa população teria sofrido uma abrupta expansão populacional, que caracteriza populações com uma diversidade alta de haplótipos pouco divergentes entre si.

O conceito de vicariância pode ser utilizado para explicar forte estruturação geográfica encontrado entre Mata Atlântica e Guiana Francesa e a América Central. Como mencionado anteriormente, durante as variações climáticas do Pleistoceno a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica ficaram isoladas. Esse isolamento pode ter permitido a diferenciação entre clados numa escala geográfica maior do que encontramos entre os fragmentos da Mata Atlântica. Com o fim da glaciação, a vegetação voltou a se expandir e subseqüentemente, com a expansão de florestas as populações puderam ampliar seus limites geográficos e deixaram de estar geograficamente isoladas. No período que estiveram isoladas as populações as linhagens do gene mitocondrial acabaram se divergindo, produzindo os clados característicos da Guiana e da América Central. Porém, este isolamento não foi suficiente para permitir a especiação. Neste caso, os haplótipos da Guiana encontrados no Sudeste representam introgressão de haplótipos que se diferenciaram nas Guianas, mas foram levados para a Mata Atlântica através de fluxo gênico. Potencialmente uma amostragem ampla nas Guianas encontrará haplótipos do Brasil em baixa freqüência. Ou, após a expansão do cerrado (Haffer, 1969), essas populações que antes tinham contato acabaram se isolando e apesar de não terem mais contato, mantiveram um haplótipo ancestral que se fixou nas Guianas, que permanece em freqüência baixa no Sudeste e Nordeste do

Brasil. A primeira hipótese é mais provável que a segunda, pois morcegos com populações maiores ou iguais a de *S. liliium* não apresentam a retenção de haplótipos tão distintos dentro de uma dada localidade em suas populações Neotropicais.

Para compreender melhor a distribuição geográfica dos haplótipos encontrados em *S. liliium* seria interessante uma ampliação da amostragem geográfica, principalmente na região do cerrado e da Amazônia, assim poder-se-ia verificar a frequência dos haplótipos nas populações ao longo de um transecto entre Guiana Francesa/América Central e Brasil. A forma da clina seria importante para determinar qual dos modelos discutidos é o mais apropriado.

Nas análises intra-populacionais, a população de Águia Branca (que engloba indivíduos do Espírito Santo) e Cunha (que agrupa indivíduos de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), apresentaram valores negativos e significativos para os testes de neutralidade, tanto para o teste de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu 1996). Quando uma mutação ocorre em uma linhagem ancestral, ela aparece como um sítio polimórfico que separa a amostra em dois grupos: um que apresenta o nucleotídeo ancestral, e outro com o nucleotídeo mutante. No caso de crescimento exponencial, será observado um excesso de sítios mutantes que aparecem em apenas uma seqüência, ou seja, estão na frequência $1/n$ em uma amostra de n seqüências (Wakeley e Hey, 1997). Tais sítios, denominados “*singletons*”, apesar de serem exclusivos de um ou poucos indivíduos, são considerados polimorfismos. Um D' Tajima negativo, reflete um possível excesso de “*singletons*” na população (Wakeley e Hey, 1997), sugerindo que essas populações vivenciaram um crescimento populacional

intenso e relativamente recente em sua história. Um sinal de crescimento populacional exponencial para um determinado grupo é evidência de que este ampliou seus limites de distribuição em um tempo recente, como postulam diversas teorias biogeográficas. A confirmação do evento biológico de expansão demográfica de maneira independente para diferentes táxons, principalmente vertebrados, tem sido cada vez mais freqüente no campo da biogeografia, onde se busca por um padrão comum de evolução da fauna e flora que possa explicar a diversidade de espécies numa determinada região (Lessa *et al.*, 2003). A alta diversidade haplotípica com haplótipos distintos por uma ou duas bases nitrogenadas o alto valor de diversidade nucleotídica encontrada nas populações também podem ser consideradas evidencia de recente expansão populacional e /ou de um número pequeno de ancestrais (Grant e Bowen, 1998). Todas as populações aqui estudadas apresentaram altos valores de diversidade haplotípica ($H_d > 0.5$) e de diversidade nucleotídica ($P_i > 0.005$). Grant e Bowen (1998) levantaram duas hipóteses para isso: a primeira que esses altos valores refletem uma grande estabilidade populacional, com longa historia evolutiva e a segunda hipótese sugere um contato secundário entre linhagens diferentes. Como a população de Águia Branca (que engloba indivíduos do Espírito Santo) e Cunha (que agrupa indivíduos de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), apresentaram valores negativos pra o teste de neutralidade, estas populações provavelmente sofreram expansão populacional recente. Assim, nesses casos o mais cabível é a aplicação dessa segunda hipótese proposta por Grant e Bowen, onde as linhagens previamente diferenciadas passaram a ter um contato secundário.

A maior divergência gênica encontrada por Ditchfield (2000) foi de 4% entre os clado do México, o clado Panamá / Guiana Francesa, e o clado do Brasil/Paraguai. Entretanto, no corrente estudo foi encontrado em média 6% de divergência gênica entre os clados de *S.lilium* de Mata Atlântica. Essa divergência de 6% é uma das mais altas encontradas para morcegos neotropicais (Martins *et al.*, 2007) e esses resultados divergem dos encontrados para outras espécies de morcegos phylostomídeos, onde a divergência gênica encontrada variou entre 1.5% a 2.5% (Ditchfield, 2000). Bradley e Baker (2001) ao analisarem o gene mitocondrial citocromo b de quatro gêneros de roedores (*Neotoma*, *Reithrodontomys*, *Peromyscus*, e *Sigmodon*) e 7 gêneros de morcegos (*Artibeus*, *Carolia*, *Chirodrema*, *Dermanura*, *Glossophaga*, *Rhinophylla*, e *Uroderma*) e baseando-se no conceito genético de espécie (sensu Dobzansky, 1950; Mayr, 1969; Simpson, 1943) sugeriram que divergências gênicas entre 2 a 11% tem alta probabilidade de indicarem populações coespecíficas ou espécies válidas, e essas espécies merecem um estudo adicional sobre seu status específico. Além disso, o gênero *Sturnira* possui muitos problemas taxômicos, já que não há congruência entre os dados morfológicos e genéticos. Pacheco e Patterson (1991) ao relacionarem os dados morfológicos e genéticos do gênero *Sturnira* dividiram o mesmo em dois grupos: um que agrupa *S.magna* e *S.erithronus* e outro que agrupa as outras 12 espécies do gênero, não ficando clara a relação existente entre elas. *S.lilium* possui uma alta plasticidade fenotípica, com sua coloração variando de acordo com a idade, sexo e localização geográfica fatos que já levaram alguns autores a descreverem *S.lilium* como sendo mais de uma espécie distinta (Husson, 1962). Essa não resolução dentro do gênero

junto com a plasticidade fenotípica de *S.lilium* podem levar a dificuldade de identificação dos animais em campo, ocorrendo, também na Mata Atlântica confusão de identificação entre as espécies *S.lilium* e *S.tildae*, como ocorreu, por exemplo, com as amostras vindas da Amazônia e Mato Grosso, que antes tinham sido identificadas como *S.lilium* mas ao serem comparadas com seqüências de citocromo b de *S.tildae* e feito as análises filogenéticas, foram re-identificadas como *S.tildae*

É importante ressaltar, que valores significativos em tais estatísticas também podem ser gerados por outros processos evolutivos, tais como 'efeito carona' (*genetic hitchhiking*) e seleção, que podem produzir genealogias similares. Conseqüentemente, análises adicionais sempre são necessárias no intuito de se refutar a hipótese alternativa em questão. No caso do chamado efeito carona, que seria a ocorrência de seleção em um marcador neutro devido à sua proximidade com um gene sob seleção (ausência de recombinação entre eles), uma alternativa é a utilização de dois ou mais marcadores de regiões distintas do genoma no teste da hipótese nula, pois isso reduz a possibilidade de influência da recombinação sob o teste.

As populações que mais trocam migrantes por geração com as demais populações são as populações de Cunha (que engloba amostras de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Sete Barras (São Paulo). Provavelmente isso se deve ao fato delas estarem no meio da Mata Atlântica e com contato com mais de uma população. Slatikin (1987) sugeriu que um número de migrantes por geração igual a um já é suficiente para superar a deriva genética entre as populações. Entretanto, estudos mais recentes (Mills e Allendorf, 1996;

Vucetich e Waite, 2000) sugerem que um número de migrantes maior que um é necessário para a manutenção da diversidade gênica dentro da população e que o um número de migrantes entre 3 e 10 é o ideal para a manutenção da coesão entre as populações, o que favoreceria a manutenção da diversidade gênica. A maioria das populações possuem um baixo valor de F_{st} (menor que 0.2) e um valor entre 3 e 10 de número de migrantes por geração, o que indica que as populações não estão isoladas entre si. As populações que apresentam baixos valores de número de migrantes e altos valores de F_{st} são aquelas que agrupam as amostras mais divergentes, que talvez incluam em suas populações subespécies ou espécies distintas, o que explicaria o valor de F_{st} mais elevado. Os altos valores de N_m (cerca de 15) e baixos valores de F_{st} (0.03) entre as populações de Águia Branca e Foz, sugerem que a influência do fluxo gênico na homogeneização dos haplótipos entre essas áreas é maior que os efeitos diversificadores da deriva genética (Birky *et al.*, 1983). O problema é que esses valores podem indicar tanto um fluxo gênico atual nessas populações, quanto uma história recente de associação com zero de fluxo no presente, ou ainda as duas possibilidades (Templeton e Georgiadis, 1996).

É importante salientar que essas divergências também podem ser resultado apenas da alta taxa mutacional do gene citocromo b, que se tornou muito divergente dentro de *S.lilium* além da possibilidade de erro de identificação na coleta dos tecidos. Também é necessário lembrar que existem algumas espécies que divergem em todo o seu genoma cerca de 1% entre si e são consideradas espécies distintas, como por exemplo, *Homo sapiens* e *Pan*

trogodytes (Cáceres *et al.*, 2003). Por esses motivos não se pode afirmar ainda que *S.lilium* realmente possui espécies crípticas pois estamos baseando tal afirmação na divergência gênica de um único gene – o gene mitocondrial citocromo b.

O presente estudo confirmou que *S.lilium* não apresenta uma estruturação geográfica evidente dentro da Mata Atlântica. A Mata Atlântica apresentou-se dividida em dois clados, que agruparam amostras de lugares muito distantes e separaram amostras de mesma localidade, que confirmam o trabalho de Ditchfield (2000). Além disso, os valores de F_{st} e N_m sugerem que as populações de Mata Atlântica não estão isoladas entre si. Para se afirmar a história evolutiva da espécie seria necessário um maior estudo, envolvendo outros genes preferencialmente nucleares em conjunto com análises de dados morfológicos, para averiguar se a divergência gênica e a plasticidade fenotípica da espécie são simplesmente divergência gênica intra-específica com retenção de caráter ancestral ou se há espécies crípticas dentro do grupo.

Referências Bibliográficas

Avise, J.C, Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T. e Neigel, J.E. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review Ecology and Systematics*. 18: 489-522.

Avise, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*. 43 (6): 1192-1208.

Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York, Chapman e Hall.

Bates, J.M., Hackett, S.J. and Cracraft, J. 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands:an hypotheses based on raw distribution of passerine birds. *Jornal of Biogeography*, vol 25, pp 783-93.

Behling, H. & Lichte, M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*. 48: 348-58.

Birky,C. W.,Jr., T. Maruyama and P. A. Fuerst. 1983. An approach ti population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts and some results. *Genetics* 103:513-527.

Bradley, R.D. and Baker, R.J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82 (4): 960-973.

Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. and Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Em: Molecular genetic analyses of populations. A practical Approach. A.R. Hoelzel (Ed.). IRL Press, Oxford, pp. 225-269.

Cáceres M, Lachuer J, Zapala MA, Redmond JC, Kudo L, Geschwind DH, Lockhart DJ, Preuss TM, Barlow C.2003. Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100, 13030-13035.

Castella, V., Ruedi, M., Excoffier, L. 2001. Contrasted patters of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. Journal of Evolutionary Biology. 14: 708-720.

Costa, L.P. 2003. The historical brigde between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. Journal of Biogeography. 30:71-86.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 1993. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology. 9: 1657-1659.

Ditchfield, A.D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraespecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. Molecular Ecology. Vol. 9, pp. 1307-1318.

Dobzhansky, T. 1950. Mendelian populations and their evolution. The American Naturalist. 74:312-321.

Ewing, B. and Green, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research* 8, pp.c186-194.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 144: 2001-2014.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147:915–925.

Gannon, M.R., Willig, M.R. and Knox Jones, J. Jr. 1989. *Sturnira lilium*. *Mammalian Species*. 333: 1-5.

Gordon, D.; Abajian, C. and Green, P. 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing *Genome Research* 8, pp. 195-202.

Grant, W.S. and Bowen, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Genetics*. 89:415-426.

Green, P. 1994. Phrap: www.genome.washington.edu

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*. 165: 131-137.

Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation*. 6: 451-76.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

Husson, A. M. 1962. The bats of Suriname. *Zoologische Verhandelingen Museum of Natural History*. Leiden, 58: 1-282.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences* 10(9): 189-191.

Lessa, E.P., Cook, J.A and Patton, J.L. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 100: 10331-10334.

Lynch, J.D. 1979. The amphibians of the lowland tropical forests. *In*: Duellman WE (ed.). *The south american Herpetofauna: Its origin, evolution and dispersal*. Museum of Natural History, University of Kansas.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Martins, F.M., Ditchfield, A.D., Meyer, D., Morgante, J.S. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 45, p. 372-378.

- Mayr, E. 1969. Principles of systematic zoology, McGraw-Hill. New York.
- McCracken, G.F., McCracken, M.K., Vawter, A.T. 1994. Genetic structure in migratory populations of the bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. Journal of Mammalogy. 75: 500-514.
- Mills, L. S. and Allendorf, F. W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. Conservation Biology. 10:1509-1518
- Muller, P. 1973. Dispersal centers of terrestrial vertebrates in the Neotropical realm. Biogeographica 2, Junk, The Hague, 244p.
- Mustrangi, M. A. and J. L. Patton. 1997. Phylogeography and systematics of the Slender Mouse Opossum *Marmosops* (Marsupialia, Didelphidae). University of California Publications, Zoology 130:1-86.
- Pacheco, V. and Bruce, D.P. 2001. Phylogenetic relationships of the New World bat genus *Sturnira* (Chiroptera: Phyllostomidae). 206: 101-121.
- Pavan A.C. and Ditchfield A.D. 2006. O uso de RFLP na filogeografia de *Carollia perspicillata*, Linnaeus 1758 (Chiroptera: Phyllostomidae). Chiroptera Neotropical 12(1): 244-249.
- Pellegrino, K.C.M.; Rodrigues M.T.; Waite N.A.; Morando M.; Yassuda Y.Y. e Sites J.W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. Biological Journal of the Linnean Society, vol 85 (1), pp. 13-26.

Pinto-da-Rocha, R., da-Silva, M. B., and BRAGAGNOLO, C. 2005. Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic Rain Forest of Brazil.. *Journal of Arachnology*, v. 33 (2): 290-299.

Posada, D. and Crandall, K. A 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.

Rozas, J. J. C; Sánchez-DelBarrio, X.; Messeguer e R. Rozas. 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.

Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. Arlequin ver 2.000: A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Simpson, G.G. 1943. Criteria for genera, species, and subspecies in zoology and paleontology. *Annals of the New York Academy of Science*. 44: 145-178.

Sinclair, E.A., Webb, N.J., Marchant, A.D., Tidemann, C.R. 1996. Genetic variation in the little red flying-fox *Pteropus scapulatus* (Chiroptera: Pteropodidae): implications for management. *Biological Conservation*. 76: 45-50.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585–595.

Templeton, A.R., and N. J. Georgiadis. 1996. A landscape approach to conservation genetics: Conserving evolutionary processes in the African Bovidae. In *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*, J. C. Avise and J. L. Hamrick (eds). New York: Chapman & Hall, pp. 398-430.

Templeton, A.R., Boerwinkle, E., Sing, C.F. 1987. A cladistic analyses of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and analysis of Alcohol Dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*. 117: 343-351.

Templeton, A.R., Sing, C.F. 1993. A cladistic analyses of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*. 134: 659-669.

Vanzolini, P.E. 1988. Distributional Patterns of South American lizards. *In*: Vanzolini PE & Hayer Wr (eds.) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Vucetich, J.A. and Waite, T.A. 2000. Is one-migrant-per-generation sufficient for the genetic management of fluctuating population? *Animal Conservation*. 3: 261-266.

Wakeley, J. and Hey, J. 1997. Estimating ancestral population parameters. *Genetics*. 145:847–55.

Whitmore, T.C. & Prance, G.T. 1987. *Biogeography and quaternary History in Tropical America*. Clarendon Press. Oxford.

Wilkinson, G.S., Fleming, T.H. 1996. Migrations and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. 5: 329-339.

Xia, X., and Xie. Z. 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.

Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation. The University of Texas at Austin. Software disponível em: www.bio.utexas.edu/faculty/garli/Garli.html

Anexos

I – Figuras

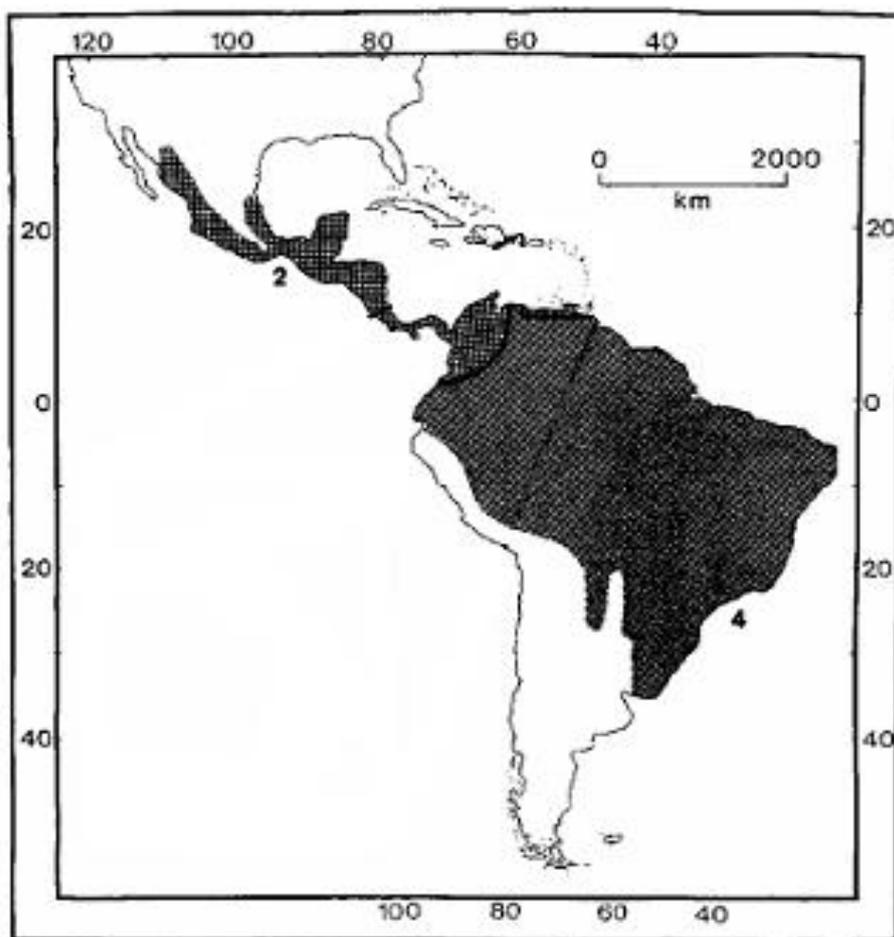


Figura 1: Distribuição geográfica de *Sturnira lilium* na América do Norte, Central e do Sul.

Distribuição geográfica dos haplótipos de *Sturnira lilium*

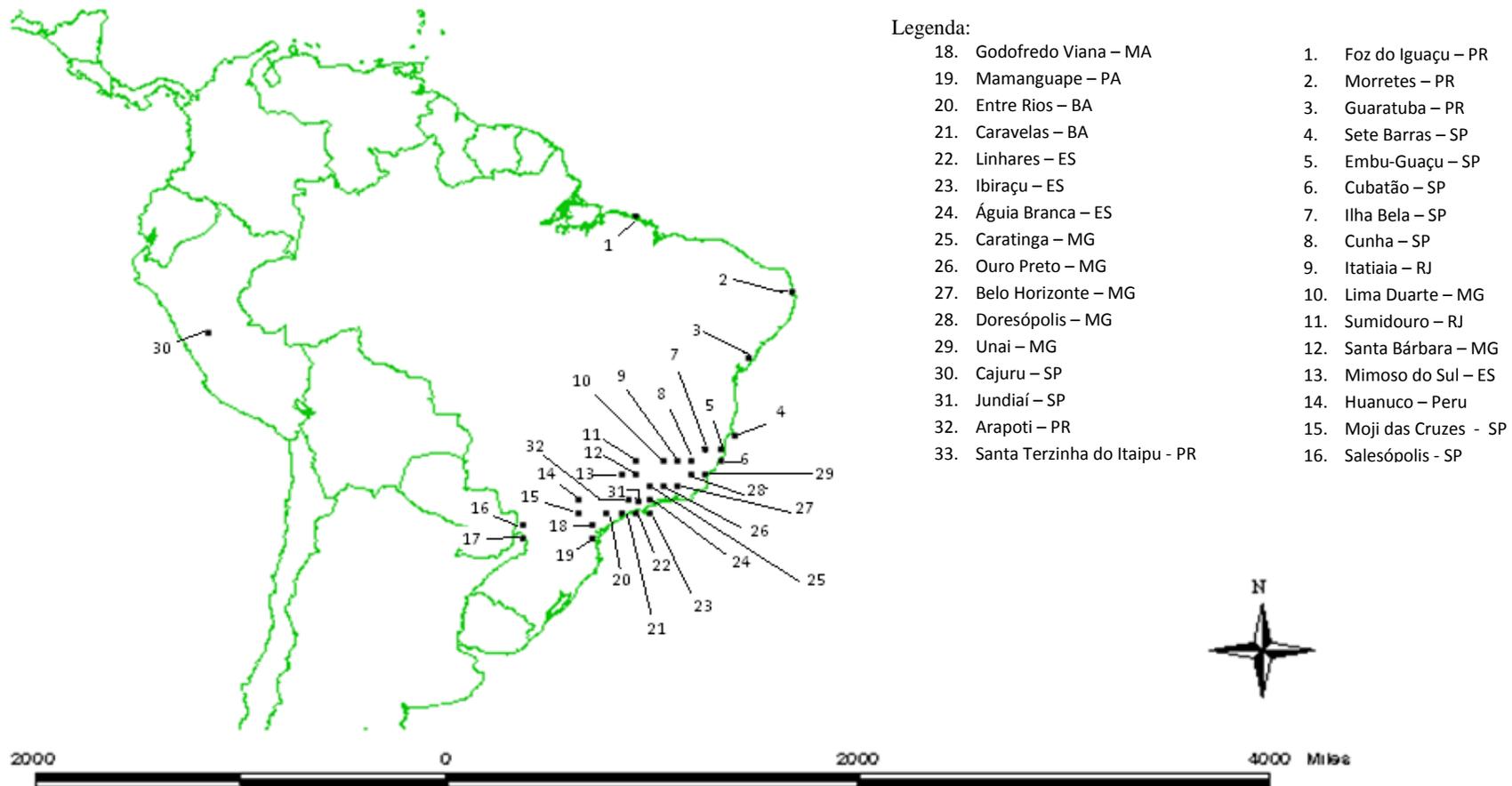


Figura 2: Mapa com os pontos dos haplótipos identificados de *S. lilium* envolvidas nesse estudo. Cada ponto no mapa representa uma localidade diferente de origem das amostras.

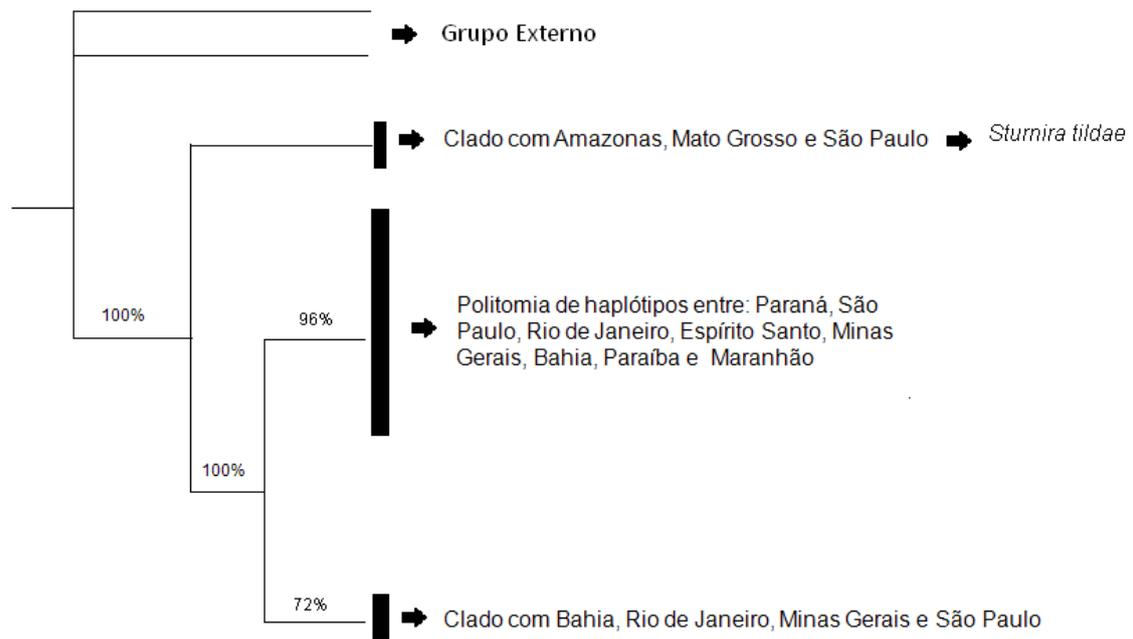


Figura 3: Representação esquemática das topologias das análises de agrupamento de vizinhos, máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Os valores nos clados indicam os valores de Bootstrap.

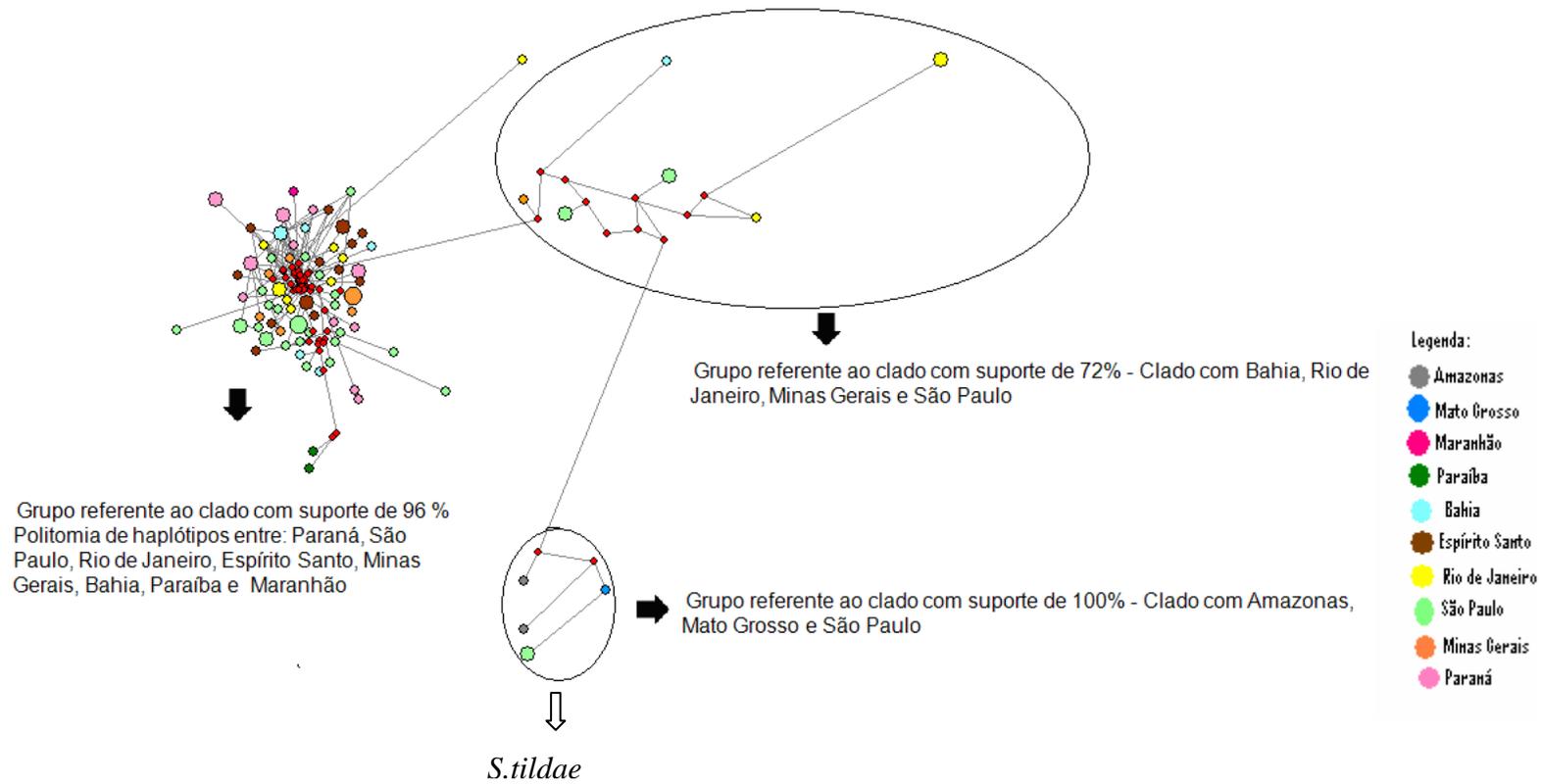


Figura 4: Rede de Haplótipos geradas pelo Network. Cada ponta da rede está relacionada com um dos clados gerados nas análises de máxima parcimônia, "neighbor-joining" e máxima verossimilhança.

II - Tabelas

Tabela 1. Valores de número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), número de sítios polimórficos (s), diversidade nucleotídica (Pi), Fst, D de Tajima e Fs de Fu sobre cada população

Todos os valores de Fst acima foram significativos. * valores significativos $p < 0.05$.

População	H	Hd	S	Pi	Fst	D'Tajima	Fs
Entre-Rios	5	0,87	41	0.017018	0.29628	-0.10174	0.48536
Cajuru	5	0,87	101	0.047895	0.16522	0.95944	1.63337
Foz	9	0,94	33	0.009113	0.32554	-0.72680	-2.71835
Unai	4	0,83	81	0.037135	0.22075	-0.43718	1.91089
BH	3	0,73	24	0.014035	0.31887	0.00000	1.63315
Cubatão	10	0,96	96	0.028412	0.23280	-0.22313	-0.09400
Águia Branca	14	0,97	69	0.011789	0.31044	-1.68481*	-5.2212*
Morretes	4	0,83	50	0.023246	0.27602	-0.29490	1.41716
Cunha	14	0,97	116	0.018228	0.27871	-1,92437*	-3.6281*
Sete Barras	8	0,93	127	0.048904	0.14148	0.75399	0.48146

Tabela 2. Valores da Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Fontes de Variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre Populações	10	459.942	4.70584	26.27
Dentro das Populações	68	898.159	13.20822	73.73
Total	78	1358.101	17.91406	
Índice de Fixação	0.26269			
Índice de significância	P<0.002			

Tabela 3. Valores de Fst, representados na diagonal acima, e Nm , representado na diagonal abaixo, comparando par- a-par as populações.

Pop.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.21210	0.21827*	0.16650	0.22933	0.11194	0.16882*	0.19258*	0.11284*	0.10308
2	1.85743		0.31108*	0.01068	0.16474	0.08566	0.33371*	0.13421	0.20220*	0.06550
3	1.79073	1.10732		0.24165*	0.26187	0.11305	0.03483*	0.22323	0.04511*	0.17835*
4	2.50306	46.30027	1.56908		-0.14663	0.03634	0.22968*	0.10022	0.12431*	0.08062
5	1.68029	2.53510	1.40931	inf		0.09290	0.18317*	0.12635	0.09959	0.07673
6	3.96648	5.33696	3.92286	13.25942	4.88232		0.11163*	0.09233	0.04786	0.08429
7	2.46177	0.99830	13.85715	1.67695	2.22975	3.97915		0.15570*	0.03077*	0.18194*
8	2.09634	3.22542	1.73985	4.48913	3.45736	4.91556	2.71140		0.07940	0.04791
9	3.93124	1.97285	10.5838	3.53217	4.52061	9.94745	15.75000	5.79576		0.13344*
10	4.35068	7.13415	2.30349	5.70169	6.01603	5.43204	2.24809	9.93523	3.24	

Os valores marcados com * referem-se aos valores de Fst que são significativos ($p < 0.05$)

Os números de 1 a 10 referem-se em ordem crescente, respectivamente as populações : Entre-rios, Cajuru,Foz, Unai, Bh, Cubatão, Água Branca, Morretes, Cunha e Sete barras .

Apêndice

Lista das amostras utilizadas, suas localidades e coordenadas geográficas

Sturnira lilium

- Godofredo Viana – Maranhão – 0°19'13 N 45°29'39 O
LK13
- Mamanguape – Paraíba – 5°48'28 S 34°49'10 O
AD65, AD88
- Entre Rios – Bahia – 12°02'04 S 38°04'46 O
AD180, AD181, AD182, AD183, AD208, AD209
- Caravelas – Bahia – 16°27'15 S 38°51'28 O
AD210
- Águia Branca – Espírito Santo – 18°52'29 S 40°48'50 O
YL404, YL405, YL555, YL556, YL557, YL510, YL511, YL523
- Aracruz – Espírito Santo – 19°51'00 S 40°16'00 O
AD339
- Domingos Martins – Espírito Santo – 20°20'26 S 40°38'41 O
AD1004, FC512
- Ibirajuba – Espírito Santo – 19°49'25 S 40°22'06 O
PM12, PM49
- Linhares – Espírito Santo – 19°21'29 S 40°03'43 O
AD349
- Mimoso do Sul – Espírito Santo – 21°03'57 S 41°22'04 O
RZ129
- Itatiaia – Rio de Janeiro – 22° 29'14 S 44°33'23 O
AD265, AD266, AD267 AD268, AD269, AD270, AD271, AD272, AD274
- Sumidouro – Rio de Janeiro – 22°02'01 S 42°40'07 O
AD290
- Belo Horizonte – Minas Gerais – 19°48'59 S 43°55'11 O
EE20, EE 21
- Caratinga – Minas Gerais – 19°45'25 S 42°08'04 O
AD365, AD383

- Doresópolis – Minas Gerais – 20°17'15 S 45°54'12 O
MF12, MF13
- Furnas – Minas Gerais – 20°41'13 S 46°19'38 O
MF01
- Lima Duarte – Minas Gerais – 19°21'29 S 40°03'43 O
AD396
- Ouro Preto – Minas Gerais – 20°17'45 S 43°28'59 O
AD386
- Santa Bárbara – Minas Gerais – 19°11'59 S 42°02'59 O
PET1006
- Unai – Minas Gerais – 16°19'50 S 47°01'16 O
QUE005
- Cubatão – São Paulo – 23°19'06 S 46°17'00 O
CA050, CA085
- Cajuru – São Paulo – 20°31'37 S 48°17'49 O
AD407, AD408, AD417, AD421, AD422,
- Cunha – São Paulo – 23°03'41 S 44°56'35
AD709, AD716, AD717, AD736, AD737
- Embu Guaçu – São Paulo – 23°48'19 S 46°47'48 O
AD976, AD983
- Ilha Bela – São Paulo – 23°16'35 S 45°15'15 O
AD241
- Jundiá – São Paulo - 22°49'53 S 46°48'54 O
AD446
- Moji das Cruzes – São Paulo – 23°31'34 S 46°11'04 O
AD758, AD762
- Ribeirão Grande – São Paulo – 24°05'49 S 48°22'16 O
AD255, AD256, AD261
- Salesópolis – São Paulo – 22°51'06 S 45°44'22 O
AD458, AD459, AD471, AD651
- Sete Barras – São Paulo – 24°04'07 S 47°48'01 O
AD576, AD581, AD604

- Ubatuba – São Paulo – 23°25'01 S 45°03'27 O
AD430
- Arapoti – Paraná – 24°07'34 S 49°48'43 O
AD552, AD553, AD554
- Foz do Iguaçu – Paraná – 25°31'11 S 54°34'42 O
AD547, AD548, AD549
- Guaratuba – Paraná – 25°50'28 S 48°33'50 O
AD491, AD499, AD511, AD513
- Morretes – Paraná – 25°25'16 S 48°51'13 O
AD696, AD701
- Santa Terezinha do Itaipu – Paraná – 25°25'35 S 54°23'55 O
AD525, AD526, AD527, AD528, AD529, AD530

Sturnira tildae

- Aripuanã – Mato Grosso do Sul – 9°04'00 S 60°37'39 O
AR134
- Cajuru – São Paulo - 20°31'37 S 48°17'49 O
IP137, IP138.
- Purus – Amazonas – 5°36'46 S 64°05'26
PEB806
- Santa Isabel do Rio Negro – Amazonas – 0°24'20 N 65°00'57 O
AD858

