

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

Filogeografia Intraespecífica de *Lonchorhina aurita*
(Chiroptera, Phyllostomidae)

Mariana Silva Azevedo

Vitória, ES
Fevereiro, 2013

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

**Filogeografia Intraespecífica de *Lonchorhina aurita*
(Chiroptera, Phyllostomidae)**

Mariana Silva Azevedo

Orientadora: Prof^a. Dra. Valéria Fagundes

Co-orientador: Prof. Dr. Albert David Ditchfield

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

Vitória, ES
Fevereiro, 2013

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Valéria Fagundes, pessoa mais que fundamental na minha vida acadêmica desde a graduação. Muito obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos, pela ajuda, e pela amizade nesses anos todos desde minha entrada na UFES.

Ao meu co-orientador, Dr. Albert David Ditchfield, que além de ser um dos meus inspiradores na biologia, foi fundamental desde a concepção até a finalização da minha dissertação. Muito obrigada pelas palavras, pela ajuda, e por me aceitar como sua aluna, tenho muito orgulho disso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa nestes anos de mestrado, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo) pela concessão de apoio financeiro para desenvolvimento desse projeto.

Aos Drs João Stenghel Morgante da Universidade de São Paulo (SP), Bruce Patterson do Field Museum of Natural History (Chicago, USA), Burton Lim do Royal Ontario Museum (Toronto, Canadá), Robert Baker da Texas Tech University (Texas, USA), Loren Ammerman da Angelo State University (Texas, USA), Maria Tereza (UNEMAT), Diego Ástua (UFPE) e ao Museu de Biologia Melo Leitão (ES), pela cessão de tecidos de *Lonchorhina*.

Às Dras Leonora Pires Costa, Maria José de Jesus Silva, Roberta Paresque e ao Dr. Yuri leite, pela participação na banca avaliadora desta dissertação.

A todos os professores do PPGBAN (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) pela participação na minha formação como mestre e cientista.

À Dra. Roberta Paresque pela ajuda com as análises populacionais e à Ms. Ana Carolina Pavan pelos e-mails totalmente esclarecedores trocados.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal (LGA): Arturo Martinelli, Cristina Dornelas, Eduardo Loyola, Fernanda Zaidan, Gabriel Dalbem, Lorena Dinelli, Lucas Vianna, Marianna Machado, Marina Monjardim, Rosana Nunes, Victor Colombi, e Yuri Marins, pelo apoio, pelos ensinamentos compartilhados, pelas brincadeiras e gargalhadas que tornaram os dias de lab muito mais agradáveis. Em especial, agradeço à doutoranda Sílvia Lopes pela ajuda e discussões enriquecedoras desde a concepção do projeto até a análise dos dados.

Ao pessoal do NGACB (Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade) com quem convivi muitos dias desse mestrado, com quem aprendi muito, dividi equipamentos, troquei experiências e me tornei amiga. Em especial, agradeço a

doutoranda Ana Carolina Loss e à Ms. Juliana Justino pelos ensinamentos e ajuda na hora do aperto.

Aos colegas da turma de mestrado 2011, que viveram essa fase da minha vida comigo. Muito obrigada pelo convívio, pela troca de experiência, pela calma na hora do desespero e pelas alegrias nos momentos de sucesso.

Agradeço também aos melhores amigos da turma 2007/1 que pude encontrar durante a minha graduação na UFES. É muito bom saber que mesmo não estando na mesma sala de aula todos os dias, vocês me ensinam muitas coisas e me apoiam muito, tanto na vida pessoal, quanto na acadêmica. Carina Caiado, Joilton Tavares, Letícia Zanchetta, Lucas Vianna, Marcus Vinícius Scherrer, Mirella Tostes, Thiele Arpini e Vinícius Gama, obrigada por tornarem mais leves estes dois anos de mestrado.

Ao meu namorado e também mestrando por toda ajuda, tanto no mestrado, como em todos os dias da minha vida. Marcus, serei eternamente grata por cada momento de apoio que você me deu, eu não teria chegado até aqui se não fosse a sua confiança, o seu carinho e o seu amor. E você sabe que cada palavra dita aqui é verdade, e eu espero um dia poder retribuir tudo o que você faz por mim.

Ao meu pai Denis Azevedo, à minha mãe Maria da Conceição Silva e à minha irmã Clara Azevedo, por me acompanharem nos momentos mais difíceis e mais felizes da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, por se orgulharem de mim, por me apoiarem sempre, por tornarem as coisas mais fáceis nos meus momentos de desespero, por entender meu desespero, por entender os meus sumiços e por serem quem vocês são. Acima de tudo agradeço a Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir e por me ajudar a enfrentar todos os desafios.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	01
Lista de Figuras	02
Resumo	03
Abstract	04
Introdução	05
Metodologia	08
Resultados	12
Discussão	23
Referências Bibliográficas	33
Apêndice	44

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Índices de diversidade onde n = número de indivíduos amostrados, **13**
 nH = número de haplótipos, H_e = número de haplótipos exclusivos,
 s = número de sítios polimórficos, dH = diversidade haplotípica, dN
= diversidade nucleotídica, H = haplótipos, π = número médio de
diferenças par-a-par.
- TABELA 2.** Distância genética em porcentagem dentro (destaque em cinza) e **17**
entre os clados formados para a análise concatenada dos
marcadores.
- TABELA 3.** Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 e τ com intervalo de confiança de **19**
95% e RHarpeding (RHarp) obtidos através da análise de *mismatch*
distribution e os valores de F_s de Fu (F_s) e D de Tajima (D) para as
populações estabelecidas e para a população como um todo (todos
os indivíduos amostrados).
- TABELA 4.** Análise da Variância molecular (AMOVA) de *Lonchorhina aurita*. **22**
- TABELA 5.** F_{st} entre os pares de populações para o gene *citb* (abaixo) e para a **22**
região HVI (destaque em cinza acima).

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa com a distribuição dos espécimes de *L. aurita* analisados no estudo. Em sombreado destaca-se a distribuição da espécie segundo Wilson e Reeder (2005). Detalhes das localidades no Apêndice. **08**
- FIGURA 2.** Árvore de Inferência Bayesiana para o gene mitocondrial citocromo b (citb) e para região hipervariável I do d-loop (HVI). **15**
- FIGURA 3.** Árvore de Inferência Bayesiana para análise dos marcadores mitocondriais concatenados com o mapa da distribuição dos espécimes pelos biomas brasileiros e de fronteira. **16**
- FIGURA 4.** Rede hierárquica de haplótipos para o gene citb e região HVI construída a partir do critério de *median-joining* no programa Network 4.6.1. As áreas dos círculos correspondem, de maneira diretamente proporcional, as frequências dos haplótipos que os representam e os números nas linhas representam a quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos, sendo que a ausência de número significa um (1) passo mutacional. **17**
- FIGURA 5.** Esquema representativo para os tempos de Ancestral Comum Mais Recente (T_{DIV}) de cada clado observado em milhares de anos. **19**

RESUMO

Lonchorhina aurita é uma espécie da família Phyllostomidae (Chiroptera) com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul do México até o leste do Brasil. Estudos preliminares demonstraram evidências para uma estruturação de suas populações em sul e norte da Mata Atlântica (MA) baseada em um pequeno número amostral de poucas localidades distintas, além de uma controversa história taxonômica. Assim, o presente estudo buscou identificar o padrão filogeográfico e populacional de *L. aurita* utilizando uma amostra mais significativa em uma escala geográfica maior através de análises de sequências de DNA de dois marcadores moleculares mitocondriais (citocromo b, citb e região hipervariável I da região controle do DNA mitocondrial, HVI) e um nuclear (*Recombination Activator Protein 2*, RAG2). Para isso foram inferidas as relações filogenéticas das sequências de DNA obtidas e estimados índices para inferir a história demográfica do grupo e calculados valores de polimorfismo dentro das populações. Foram encontrados 19 haplótipos para o gene citb e 12 haplótipos para a região HVI. Para o gene nuclear RAG2 foram obtidos apenas dois haplótipos pouco variáveis e conseqüentemente nenhuma análise foi realizada para esse marcador. Observou-se a formação de seis clados estruturados geograficamente através da análise concatenada dos marcadores moleculares, sendo o clado I formado por indivíduos do norte da MA e por um indivíduo da Amazônia do Pará, clado II amostras do sul da MA, clado III formado por indivíduos do Amapá, clado IV formado por indivíduos do Suriname, o clado V formado por indivíduos do Equador e Peru e o clado VI formado por indivíduos de Honduras e do México. A distância genética intraespecífica foi relativamente pequena (2,2%), assim como os valores de distância genética dentro dos clados (0 a 0,91%), enquanto que as distâncias entre os clados mostrou valores entre 1,8 a 3,4%. Baseados na grande semelhança genética encontrada entre as amostra de *L. aurita* e *L. inusitata* (2,3% de distância genética), os resultados levantaram um questionamento sobre a validade das espécies do gênero *Lonchorhina*. Ainda, a rede de haplótipos mostrou forte estruturação geográfica, sendo esta maior para o gene citb do que para a região HVI. Os índices de história demográfica apontaram para uma expansão populacional recente de algumas populações, além de tempo de divergência bem antigos (pelo menos 230 mil anos atrás) para os clados geográficos encontrados. As análises populacionais apontaram para uma forte estruturação entre as populações e entre os grupos de populações. Assim, conclui-se que as populações de *L. aurita* são altamente estruturadas em clados geográficos e esse padrão encontrado pode ser explicado por fatores históricos explicados a luz de teorias consagradas em estudos filogeográficos e também por fatores comportamentais e ecológicos da espécie.

Palavras-chave: Filogeografia, citb, HV1, Estruturação geográfica, Estruturação populacional, Expansão populacional.

ABSTRACT

The bat species *Lonchorhina aurita* (Chiroptera:Phyllostomidae) has a wide geographic distribution, occurring from the South Mexico to East of Brazil. Previous studies exposed some evidences of genetic structure among populations from North and South Atlantic Forest (AF), based on a short sample size of a few different localities and a controversial taxonomic history. Thus, herein we aimed to identify the phylogeographic and demographic patterns in *L. aurita* using a broader sample size in a larger geographic scale. For this purpose we used three molecular markers: two from the mitochondrial DNA (cytochrome b, *cytb*, and the hypervariable region I of the mitochondrial control region, HVI) and one nuclear marker (Recombination Activator Protein 2, RAG2). Thus, we build the phylogenetic relationship among the DNA sequences, calculated the polymorphisms values to the populations and estimated the population index to infer the demographical trends. We found 19 haplotypes to the *cytb* gene and 12 haplotypes to the HVI region. To the nuclear gene RAG2, we found only two haplotypes, that showed a minor nucleotide difference and, therefore, no analysis were made with this molecular marker. Through the concatenated analysis of both mitochondrial markers, six clades were formed, each one corresponding to a different geographic locality. The clade I clustered specimens from north of AF and one from the Amazon forest in the Brazilian State of Pará. The clade II clustered specimens from the south of AF. The clade III grouped specimens from the Amapá state. Clade IV grouped individuals from Suriname, clade V was built by Equator and Peru specimens and, finally, the clade VI clustered individuals from Honduras and México. Both the intraspecific genetic distance (2,2%) and the genetic inside the clades (0 to 0.91%) were very small, while the genetic distance among the clades showed values between 1.9 to 3.4%. Based on the low genetic distance between samples of *L. aurita* e *L. inusitata* (2.3%), our results raises taxonomic questions about *Lonchorhina* species. The haplotype network indicated strong geographic structure, being higher to *cytb* than the HVI. The indexes of demographic history pointed to scenario of recent population growth in some populations, and the divergence time among the clades were estimated in, at least, 230 hundred years ago. The population analyses indicate a strong genetic structuration among the populations and groups of populations. Thus, we conclude that the *L. aurita* is highly structured in geographic clades, and that this pattern can be explained by historical elements, described by consecrated theories used in phylogeographic studies, and to behavior and ecological trends of this species.

Keywords: Phylogeography, *cytb*, HV1, Geographical structuration, Population structuration, Population expansion.

INTRODUÇÃO

O termo filogeografia, introduzido por Avise no final da década de 80, é aplicado ao estudo da distribuição de linhagens gênicas de uma espécie em um contexto geográfico e temporal, com base na análise de haplótipos, principalmente de DNA mitocondrial (DNAMt). Estudos filogeográficos baseiam-se em dois principais aspectos da variabilidade intraespecífica do DNAMt: a quantidade de divergência genética e a subdivisão geográfica em grupos monofiléticos (clados). Há exemplos de espécies que exibem padrões bem estruturados de subdivisão de populações, outras que possuem pouca ou nenhuma estruturação filogeográfica com baixa divergência genética, e algumas ainda que apresentam pouca ou nenhuma estruturação filogeográfica com altos níveis de divergência genética, sendo essa última mais rara (Avise *et al.*, 1987).

Análises filogeográficas possibilitam a proposição de modelos explicativos para especiação e também a identificação de padrões de quebras filogeográficas em diferentes táxons. Além disso, os estudos de fauna de uma mesma região tem revelado o compartilhamento de padrões entre táxons não relacionados, o que provavelmente reflete uma história evolutiva comum (Ditchfield, 1996), uma vez que tais padrões são mais facilmente explicados como resultado de eventos climáticos ou geológicos do que por eventos independentes, afetando cada táxon separadamente.

Avise já havia proposto em 2000 que a distribuição geográfica e estruturação da variação genética de uma espécie podem ser influenciadas por fatores biogeográficos e demográficos históricos, assim como por comportamento e ecologia contemporâneos. Neste contexto estão inseridos diversos trabalhos que investigam padrões filogeográficos de espécies de vertebrados e utilizam hipóteses biogeográficas de ampla aceitação para explicá-los. Entre essas hipóteses destacam-se: a teoria de refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini e Williams, 1970; Whitmore e Prance, 1987; Haffer e Prance, 2001; Carnaval e Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009); a hipótese dos museus (Fjeldsa, 1994; Fjeldsa e Lovett, 1997; Fjeldsa *et al.*, 1999); a teoria dos rios como fator de isolamento (Wallace, 1852); a teoria do

geotectonismo (revisada em Marroig e Cerqueira, 1997) e a hipótese dos gradientes de habitat ou de diversificação parapátrica por seleção (Endler, 1977; Smith *et al.*, 1997).

As diferenças na habilidade de dispersão de uma espécie parecem exercer grande influência nos padrões de estruturação filogeográfica do DNAm (Avice, 1989), por isso apesar dos morcegos serem mamíferos de pequeno porte, geralmente não possuem padrões de diferenciação geográfica de linhagens, como encontrados em roedores ou marsupiais. Por serem animais alados, os morcegos possuem uma capacidade de transpor barreiras, como rios e montanhas, e conseqüentemente o fluxo gênico entre suas populações é potencialmente grande (Ditchfield e Burns, 1998). Assim, é esperado que as espécies de morcegos geralmente apresentem um baixo nível de divergência genética e nenhuma ou pouca estruturação geográfica entre indivíduos de populações geograficamente distantes, diferente do encontrado em pequenos mamíferos não voadores.

Estudos filogeográficos têm crescido expressivamente nos últimos anos. Um dos estudos com grande destaque foi realizado por Ditchfield (2000) que buscou descrever um padrão filogeográfico geral para morcegos estudando espécies neotropicais. O objetivo deste trabalho foi observar a variação populacional e a estrutura geográfica das espécies, além de comparar os padrões filogeográficos encontrados com aqueles descritos na literatura para outros táxons. Como resultado foram encontrados baixos índices de divergência nucleotídica (1 a 4%) em 17 espécies, mesmo entre populações geograficamente distantes, revelando que o grau de divergência intraespecífica em morcegos chega a ser até 10 vezes inferior ao de pequenos mamíferos, assemelhando-se ao padrão descrito para aves (Ditchfield e Burns, 1998). Muitos trabalhos posteriores foram concordantes com o observado por Ditchfield em 2000 (Hoffmann e Baker, 2001; Hoffmann e Baker, 2003; Lamb *et al.*, 2012), por outro lado, para alguns táxons encontraram-se valores de divergência diferentes do anteriormente registrado, como em *Glossophaga soricina* (6%) no trabalho de Hoffmann e Baker (2001), *Carollia castanea* (5%) em Hoffmann e Baker (2003), *Artibeus jamaicensis* (4,3%) no estudo realizado por Larsen *et al.* (2007), *Desmodus rotundus* (11,8%) em Martins *et al.* (2007) e *Sturnira lillium* (6%) em trabalho realizado por Lopes e Ditchfield (2008).

Para *Lonchorhina aurita* Tomes, 1863 não existem estudos de grande proporções geográficas e as relações filogeográficas do grupo são pouco resolvidas. O único estudo filogeográfico exclusivo para essa espécie foi realizado por Lopes e Ditchfield (2009) utilizando análises de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP) do gene

mitocondrial citocromo b (citb), porém com uma amostra restrita a indivíduos da Mata Atlântica no leste do Brasil. Esse estudo revelou quatro haplótipos, sendo dois compartilhados por indivíduos da região sul da Mata Atlântica e dois por indivíduos da região norte, levando os autores a proporem a existência de uma quebra filogeográfica associada a um evento de divisão latitudinal de populações. Evidências de forte estruturação genética na Mata Atlântica também foram observadas para outros táxons de mamíferos (Costa, 2003; Leite, 2003; Moraes-Barros *et al.*, 2006; Tchaicka *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007; Lara-Ruiz *et al.*, 2008), anfíbios (Muller, 1973; Lynch, 1979; Fouquet, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009), répteis (Vanzolini, 1988; Pellegrino *et al.*, 2005; Wüster *et al.*, 2005; Graziotin *et al.*, 2006) e aves (Bates *et al.*, 1998; Cabanne *et al.*, 2007 e 2008).

Além das relações filogeográficas pouco resolvidas, registros na literatura apontam para uma história taxonômica complexa para a espécie. *L. aurita* foi descrita em 1863 por Tomes, com localidade-tipo em Trinidad e Tobago, na América Central, com grande distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul do México até o sudeste brasileiro (Wilson e Reeder, 2005). Décadas mais tarde da descrição de *L. aurita*, Anthony (1923) descreveu *L. occidentalis* como uma espécie plena com localidade-tipo no Equador, porém em estudos posteriores a espécie foi considerada como subespécie (Sanborn, 1932; Goodwin e Greenhall, 1961; Hernández-Camacho e Cadena, 1978; Jones, 1966; Tuttle, 1970) ou até mesmo sinonímia de *L. aurita* (Solmsen, 1985).

Considerando-se que *L. aurita* possui ampla distribuição geográfica, que a história taxonômica desse grupo sugeriu a existência de mais de um táxon, que há evidências de estruturação e diversificação genética com quebra filogeográfica latitudinal em amostras da Mata Atlântica e que os estudos disponíveis foram baseados em poucos indivíduos e localidades restritas, essa espécie se torna um bom modelo para estudos filogeográficos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo identificar o padrão filogeográfico e populacional de *L. aurita* utilizando uma amostra mais significativa em uma escala geográfica ampliada através de análises de sequências de DNA de dois marcadores moleculares mitocondriais e um nuclear.

METODOLOGIA

Amostragem

O presente estudo contou com 54 indivíduos de *Lonchorhina aurita* coletados em 18 localidades (Figura 1, Apêndice), sendo 12 no Brasil (São Paulo, n=5; Espírito Santo, n=26; Paraíba, n=5; Bahia, n=1; Pará, n=1; Amapá, n=2), além de amostras do Peru (n=2), Equador (n=3), México (n=2), Honduras (n=5) e Suriname (n=1). Também foi adicionada à amostra uma sequência de citocromo oxidase b (citb) de um indivíduo proveniente do México obtida do *GenBank* (número de acesso: FJ155494). Para grupo externo foram geradas sequências de dois indivíduos do gênero *Lonchorhina*: *L. inusitata* (ROM 120751) do Suriname e *L. orinocensis* (ROM 107813) da Venezuela.

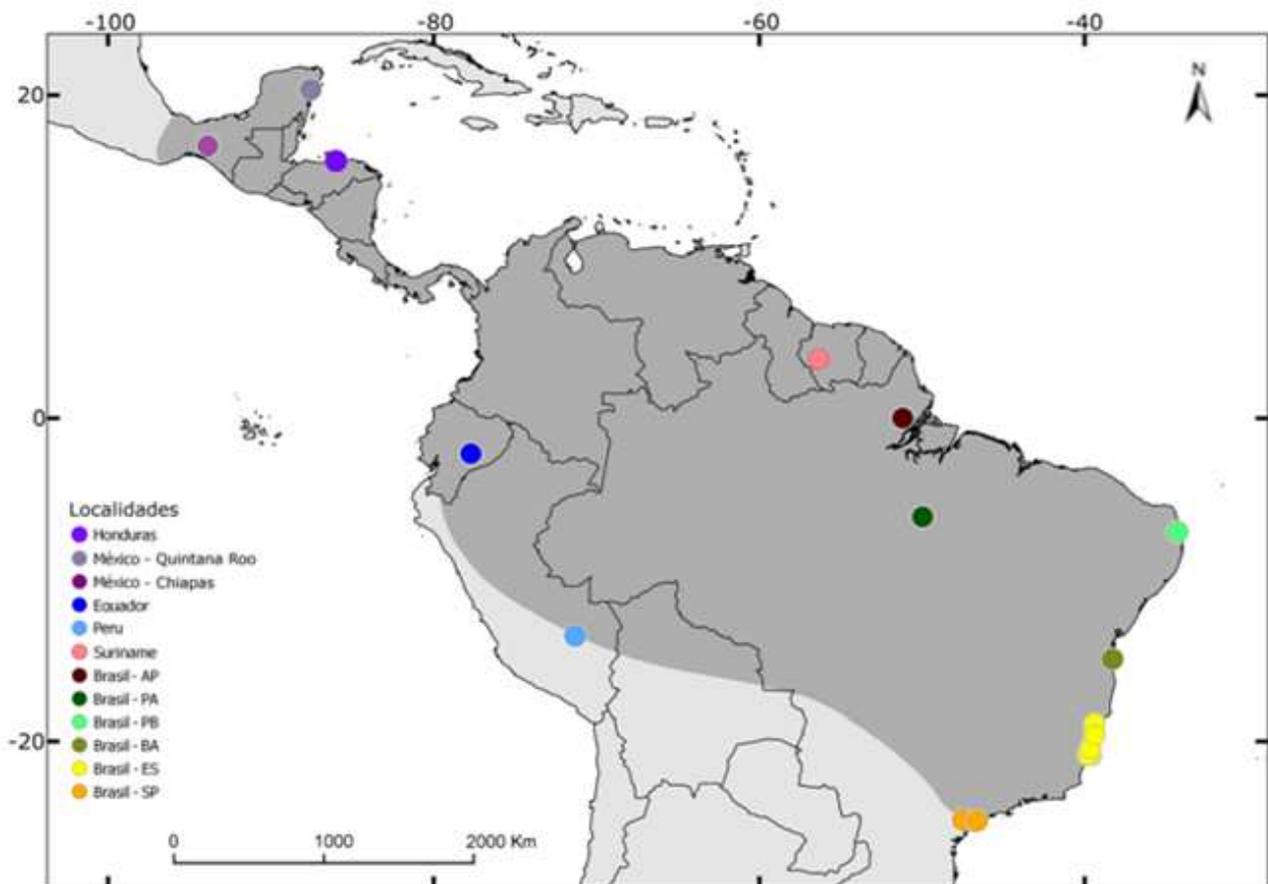


Figura 1. Mapa com a distribuição dos espécimes de *L. aurita* analisados no estudo. Em sombreado destaca-se a distribuição da espécie segundo Wilson e Reeder (2005). Detalhes das localidades no Apêndice.

Isolamento do DNA, Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e Sequenciamento

As amostras de tecidos frescos conservados em álcool foram submetidas ao protocolo padrão de extração de DNA com NaCl/SDS/Proteinase K, segundo Bruford (1992). A amplificação foi feita através de PCR seguindo *primers* já descritos na literatura (segue abaixo).

O gene mitocondrial citocromo oxidase b (*citb*) foi amplificado utilizando-se os *primers* BAT05A: 5'-CGACTAATGACATGAAAAATCACCGTTG-3' e BAT14A: 5'-TATTCCCTTTGCCGGTTTACAAGACC-3' (Martins *et al.*, 2007). As reações foram realizadas em um volume final de 25µl contendo 1x de tampão, 2mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,2mM de dNTP (desoxirribonucleotídeos livres), 0,24 µM de cada primer, 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Inc.) e 5-50ng de DNA molde completados com água Mili-Q. Os parâmetros da reação de PCR seguidos foram: (1) um passo inicial de desnaturação da dupla fita do DNA 95°C por 5 minutos, (2) 37 ciclos de 92°C por 1 minuto (desnaturação), 47°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (elongação); (3) um período de espera a 72°C por 5 minutos (Lopes e Ditchfield, 2009).

Para a amplificação do marcador mitocondrial região hipervariável I da região controle do DNA mitocondrial (HV1) usou-se os *primers* BrDIL: 5'-CCCAAAGCTGAAATTCTACTTAAACTA-3' e o BrDIH: 5'-ATGACCCTGAAGAAAGAACCAG-3' (Moraes-Barros, 2006). As reações também foram realizadas em um volume final de 25µl contendo 1x de tampão, 2,5mM de MgCl₂, 0,16mM de dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* e 5-50ng de DNA molde completados com água Mili-Q. O perfil da PCR foi: (1) desnaturação da dupla fita do DNA a 94°C por 5 minutos; (2) 32 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 55°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 70 segundos (elongação); (3) um período de espera a 72°C por 10 minutos.

Finalmente para a amplificação do gene nuclear *Recombination Activator Protein 2* (RAG2) foram utilizados os *primers* descritos por Baker *et al.* (2000): RAG2F1: 5'-GGCYGGCCCAARAGATCCTG-3' e RAG2R2: 5'-GRAAGGATTTCTTGGCAGGAGT-3'. As reações foram realizadas em um volume final de 25µl contendo 1x de solução tampão, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,24 µM de cada *primer*, 1U de *Platinum Taq DNA Polimerase* e 5-50ng de DNA molde completados com água Mili-Q. O perfil da PCR foi: (1)

desnaturação da dupla fita do DNA a 95°C por 2 minutos; (2) 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 63°C C por 30 segundos (anelamento), 72° C por 2 minutos (elongação); (3) um período de espera a 72° C por 10 minutos.

O produto amplificado foi purificado com enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (EXO/SAP) (GE Healthcare Life Sciences) e em seguida enviado para sequenciamento (Macrogen, Coréia do Sul). Cada sequência utilizada no estudo foi submetida a 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 as sequências correspondem aos marcadores moleculares alvo. O alinhamento das sequências de DNA obtidas foi realizado manualmente e comparado ao alinhamento automático produzido no programa MEGA desenvolvido por Kumar *et al.* (1994).

Análise da Estrutura Filogeográfica

Para a verificação do grau de saturação das bases nucleotídicas foi usado o programa DAMBE de Xia e Xie (2001). As relações filogenéticas das sequências de DNA obtidas foram determinadas por agrupamentos de vizinhos (*Neighbor-Joining*. NJ) e máxima parcimônia (MP), realizada no programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011); máxima verossimilhança (ML) na plataforma online PhyML versão 3.0.1 beta (Anisimova, 2011); e da Inferência Bayesiana (IB) no programa Mr. Bayes versão 3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Além de inferir a relação filogenética das amostras para cada um dos marcadores moleculares, ainda foi feita uma análise concatenada dos marcadores mitocondriais. O melhor modelo de substituição nucleotídica para a MV e IB foi selecionado no programa jModelTest versão 0.1.1 (Posada, 2008). A relação hierárquica entre os haplótipos foi estabelecida numa rede de haplótipos utilizando o programa NETWORK versão 4.1 (Rohl, 2000), baseada na implementação do algoritmo *median-joining*, o qual gera uma árvore (*minimum spanning tree*) e adiciona os haplótipos intermediários ausentes usando o algoritmo de máxima parcimônia de Farris (Bandelt *et al.*, 1999). As divergências genéticas intra e inter clados foram calculadas no MEGA5 usando-se o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). No pacote estatístico ARLEQUIN™ versão 3.11 (Excoffier, Laval e Schneider, 2005) foi realizado o teste de Mantel para avaliar a correlação entre distância genética e distância geográfica.

História Demográfica das Populações

Para os estudos de história demográfica, foram calculados os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997), para verificar se há algum sinal de expansão populacional recente (Fu, 1997; Schneider e Excoffier, 1999). Além disso também se calculou a distribuição *mismatch* (Rogers e Harpending, 1992, Harpending *et al.*, 1998) e a soma do desvio dos quadrados (SSD) para se verificar o desvio entre as curvas observada e esperada da distribuição de *mismatch* dentro do modelo de expansão populacional. Para todas as estimativas foi utilizado o *software* ARLEQUIN™ com um parâmetro de 10000 replicações.

Ainda foram realizados cálculos de estimativas de tempo de divergência do ancestral comum mais recente (T_{DIV}) dos clados formados por uma abordagem Bayesiana coalescente implementada no programa BEAST versão 1.5.3 (Drummond e Rambaut, 2007). Tal análise foi feita através do cálculo de um relógio molecular relaxado usando como taxa de evolução uma média de 2,6% por milhão de anos, calculada por Hoffmann *et al.*, (2003) para o cib de morcegos Phyllostomidae. Adicionalmente, o tempo desde a expansão dos grupos, τ (tau), foi calculado também no programa ARLEQUIN™.

Análises de Genética Populacional

O programa DNAsp versão 5.10.01 (Librado e Rozas, 2009) foi utilizado para calcular os níveis de polimorfismo dentro das populações, e através dele foram estimados parâmetros como diversidade nucleotídica (dN), diversidade haplotípica (dH) e número de sítios polimórficos (s). A média de diferenças par-a-par foi calculada usando o programa ARLEQUIN™. As análises interpopulacionais só foram realizadas para populações com pelo menos três indivíduos. O programa ARLEQUIN™ foi utilizado para medir a diferenciação genética entre as populações através da análise de variância molecular (AMOVA) e das estimativas de F_{st} (Wright, 1931). Também foram calculados os índices de diferenciação genética entre os grupos de populações (F_{ct}), e entre indivíduos de todas as populações (F_{sc}). A partir dos índices de F_{st} pode ser calculado o número absoluto de migrantes por geração (Nm) trocados entre as populações através da fórmula $Nm=1-F_{ST}/2F_{ST}$ (Hudson *et al.*, 1992).

RESULTADOS

Variabilidade Genética

A partir da análise dos 1043 pares de base (pb) sequenciados do gene *citb* de 55 indivíduos de diferentes 18 localidades, foram encontrados 19 haplótipos (C1-C19) com 73 sítios polimórficos, e destes 62 foram informativos. Para a região HVI foram sequenciados 396 pb de 54 indivíduos de 18 localidades distintas, nesse conjunto de dados encontrou-se 12 haplótipos (H1-H12) com 24 sítios variáveis, dos quais 18 foram informativos. Para o gene nuclear RAG2 foram sequenciados 1003 pb de 16 indivíduos de oito localidades distintas e foram obtidos apenas dois haplótipos (R1-R2), com um sítio polimórfico não informativo. Devido ao gene RAG2 não apresentar variação inter e intrapopulacional e a impossibilidade de análise de variabilidade, optou-se por não incluir esse gene na análise.

Cada haplótipo dos marcadores mitocondriais foi exclusivo de uma localidade, com exceção dos haplótipos C1 e H5 que foram compartilhados entre Espírito Santo (ES) e Bahia (BA), e os C14 e H1 que foram encontrados tanto no México, como em Honduras. Os haplótipos mais abundantes para ambos os marcadores foram registrados para o ES e a BA (C1 e H5), ambos compartilhados por 24 indivíduos (45% da amostra). Além disso, o conjunto de dados mostrou-se com elevados valores de diversidade haplotípica (*citb*: $dH=0,7945$ e HVI: $dH=0,7714$) e nucleotídica (*citb*: $dN=0,01767$ e HVI: $dN=0,01427$). Os dados acima apresentados se encontram detalhados na tabela 1.

Estrutura Filogeográfica e taxa de divergência

Não houve saturação no conjunto de sequência analisadas, além disso, uma heterogeneidade de composição de bases nucleotídicas foi observada. O melhor modelo evolutivo para o gene *citb* foi Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma (HKY+G), com um parâmetro gamma de 0,1460, enquanto que para a região HVI o modelo sugerido foi o Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma + *proportion of invariable sites* (HKY+G+I), com um parâmetro gamma de 0,8980 e *pinv* de 0,7460.

Tabela 1: Índices de diversidade onde n = número de indivíduos amostrados, nH = número de haplótipos, He = número de haplótipos exclusivos, s = número de sítios polimórficos, dH = diversidade haplotípica, dN = diversidade nucleotídica, H = haplótipos, π = número médio de diferenças par-a-par.

Gene	Localidade/População	Sigla	n	nH	He	s	dH	dN	H	π	
Citb	Espírito Santo: Vitória/Cariacica	ESvc	16	1	0	0	0	0	C1	0	
	Espírito Santo: Sooretama	ESs	4	4	3	10	1	0,00517	C1, C2, C3, C4	5,50000	
	Espírito Santo: Ibirapu	ESi	5	1	1	0	0	0	C1	0	
	Espírito Santo: Pinheiros	ESp	1	1	0	0	0	0	C1	-	
	Bahia: Ilhéus	BA	1	1	0	0	0	0	C1	-	
	São Paulo: Sete Barras	SPsb	2	2	1	1	1	0,00095	C5, C6	-	
	São Paulo: Serra do Mar/Peruíbe	SPsmp	3	2	1	1	0,6667	0,00065	C6, C7	0,66667	
	Paraíba: Mamanguape	PB	5	2	2	2	0,4000	0,00078	C9, C10	0,80000	
	Amapá: Mazagão	AP	2	1	1	0	0	0	C12	-	
	Pará: Marabá	PA	1	1	1	0	0	0	C11	-	
	México: Chiapas e Quintana Roo	MEX	3	2	1	17	0,6667	0,01070	C15, C19	-	
	Peru: Cusco	PER	2	2	2	1	1	0,00094	C16, C17	-	
	Honduras: Colon	HON	5	2	1	2	0,8000	0,00095	C14, C15	1	
	Suriname: Sipaliwini	SUR	1	1	1	0	0	0	C18	-	
	Equador: Morona San Tiago	EQU	3	1	1	0	0	0	C14	0	
	TOTAL: 18	15	54	19	18	73	0,7945	0,01767	-	19,1167	
	HV1	Espírito Santo: Vitória/Cariacica	ESvc	16	1	0	0	0	0	H5	0
		Espírito Santo: Sooretama	ESs	4	2	1	3	0,6670	0,00554	H5, H6	2
Espírito Santo: Ibirapu		ESi	5	1	0	0	0	0	H5	0	
Espírito Santo: Pinheiros		ESp	1	1	0	0	0	0	H5	-	
Bahia: Ilhéus		BA	1	1	0	0	0	0	H5	-	
São Paulo: Sete Barras		SPsb	2	1	0	0	0	0	H7	-	
São Paulo: Serra do Mar/Peruíbe		SPsmp	3	1	0	0	0	0	H7	0	
Paraíba: Mamanguape		PB	5	2	2	4	0,4000	0,00415	H3, H4	1,20000	
Amapá: Mazagão		AP	2	1	1	0	0	0	H8	-	
Pará: Marabá		PA	1	1	1	0	0	0	H9	-	
México: Chiapas e Quintana Roo		MEX	2	2	1	1	1	0,00278	H1, H2	-	
Peru: Cusco		PER	2	1	1	0	0	0	H10	-	
Honduras: Colon		HON	5	1	0	2	0	0	H1	1	
Suriname: Sipaliwini		SUR	1	1	1	0	0	0	H12	-	
Equador: Morona San Tiago		EQU	3	1	1	0	0	0	H11	0	
TOTAL: 18		15	53	12	10	24	0,7714	0,01427	-	8,34978	

Para a análise dos marcadores concatenados o melhor modelo estimado foi o HKY+G+I, com um parâmetro Gamma de 0,8710 e pinv de 0,6290, diferindo para o modelo de correção Bayesiana que resultou no modelo HKY+G, com um Gamma de 0,0980, esses últimos parâmetros foram usados apenas para geração da árvore de IB.

Os resultados das análises de NJ, MP, ML e IB para ambos os marcadores apresentaram topologias muito similares, por isso ilustraremos aqui somente as análises filogenéticas de IB (Figura 2). Os dois marcadores moleculares mitocondriais utilizados apresentaram resultados muito semelhantes, sendo assim apresentaremos os resultados das relações filogenéticas encontradas pela análise concatenada de ambos os marcadores, pois essas deram maior resolução nas relações interclados.

Analisando-se as árvores filogenéticas da análise dos dois marcadores concatenados, observa-se a formação de seis grupos estruturados geograficamente (Figura 3): clado I formado por indivíduos do norte da Mata Atlântica da Paraíba (PB) e da Amazônia do Pará (PA) com suporte de 83%, clado II formado por indivíduos do sul da Mata Atlântica do Espírito Santo (ES), Bahia (BA) e São Paulo (SP) com suporte de 97%; clado III formado por indivíduos do extremo Norte do Brasil no Amapá (AP) com um suporte de 100%, clado IV formado por indivíduos do Suriname (um exemplar de *L. aurita* e o exemplar *L. inusitata* do grupo externo) com suporte de 99%, clado V formado pelos indivíduos dos Andes do Equador e Peru com um valor de suporte de 73%, e clado VI formado por indivíduos da América Central de Honduras e da América do Norte do México com um valor de suporte de 67%. O clado VI se diverge do clado que contém os cladros I, II, II, IV e V. Não foram observadas zonas de contato ou haplótipos compartilhados entre os cladros geográficos.

O clado I se dividiu no subclado Ia, formado pelas amostras da PB e subclado Ib formado pela amostra do PA. O clado II se organizou em dois cladros, um com amostras do ES e da BA (subclado IIa) e outro com amostras de SP (clado IIb). No clado V também se observa a separação das amostras do Equador (Va) das amostras do Peru (Vb), enquanto no clado VI se observa uma separação das amostras de Honduras e Quintana Roo do México (VIa) da amostra de Chiapas também no México (VIb).

A distância genética intraespecífica encontrada foi relativamente pequena (2,2%) e a distância interespecífica variou de 2,3% (*L. aurita* e *L. inusitata*) a 16,3% (*L. aurita* e *L. orinocensis*). Os valores de distância genética dentro dos cladros de *L. aurita* foi baixo (0 a 0,9%), enquanto que as distâncias entre os cladros mostrou valores entre 1,8 a 3,4% (Tabela

2). Quanto às distâncias entre as populações, o teste de Mantel confirmou a correlação entre a distância genética e a distância geográfica ($P < 0,05$).

A amostra de *L. inusitata* também foi usada na construção da rede hierárquica dos haplótipos visto que essa amostra compôs o clado das amostras de *Lonchorhina aurita*. Para o gene *citb* a rede revelou que os haplótipos estão estruturados geograficamente (Figura 4), semelhante ao encontrado para HVI, sendo que para tal marcador a estruturação geográfica dos haplótipos foi consideravelmente menor, uma vez que os grupos geográficos estão separados por poucos passos mutacionais (Figura 4).

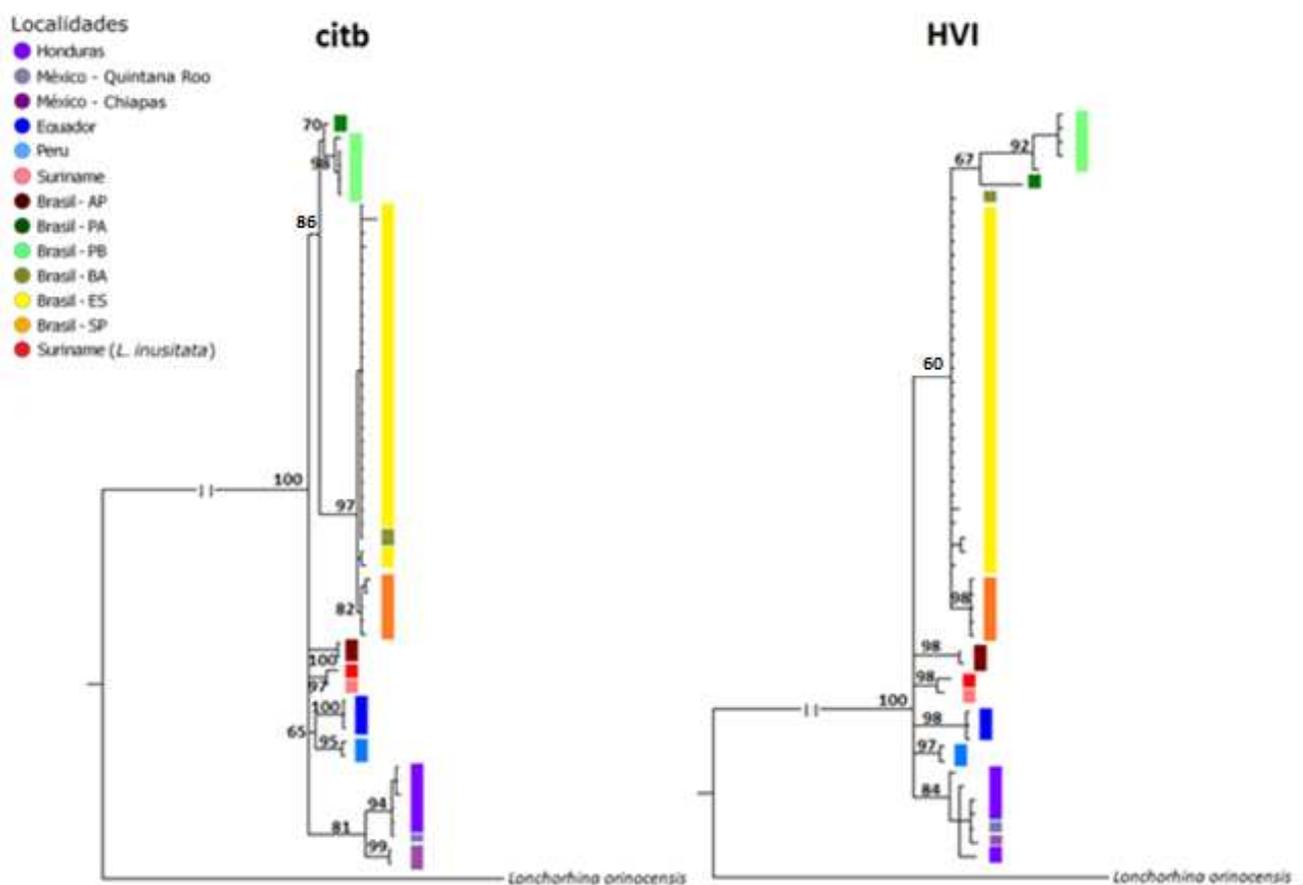


Figura 2. Árvore de Inferência Bayesiana para o gene mitocondrial citocromo b (*citb*) e para região hipervariável I do d-loop (HVI).

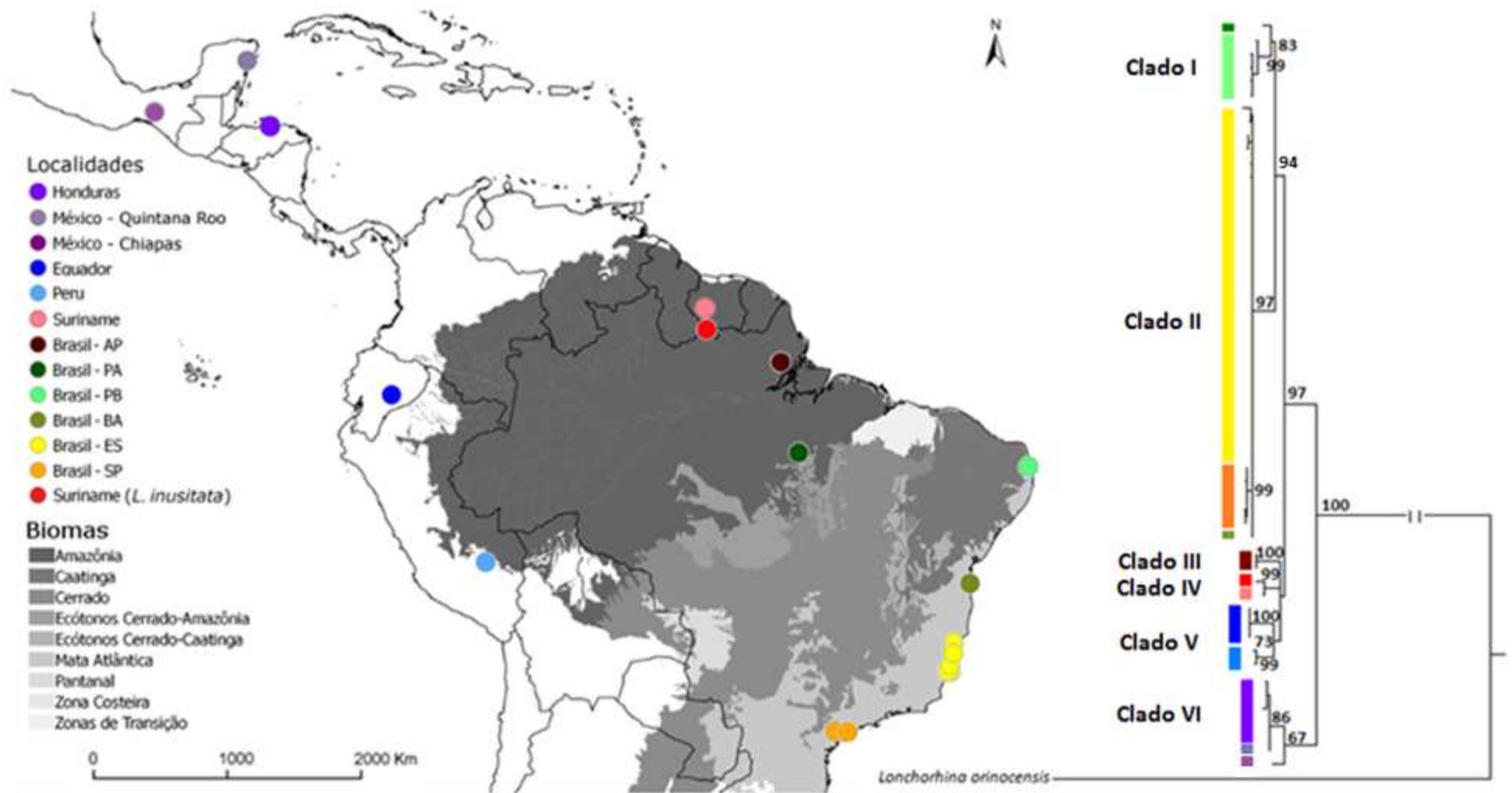


Figura 3. Árvore de Inferência Bayesiana para análise dos marcadores mitocondriais concatenados com o mapa da distribuição dos espécimes pelos biomas brasileiros e de fronteira.

Tabela 2. Distância genética em porcentagem dentro (destaque em cinza) e entre os clados formados para a análise concatenada dos marcadores.

Clados	I	II	III	IV	V	VI
I	0,5					
II	2	0,1				
III	2,1	2,4	0			
IV	2,2	2,3	1,8	0,3		
V	2,3	2,6	1,9	1,8	0,9	
VI	3,4	3,3	3,2	2,9	2,9	0,4

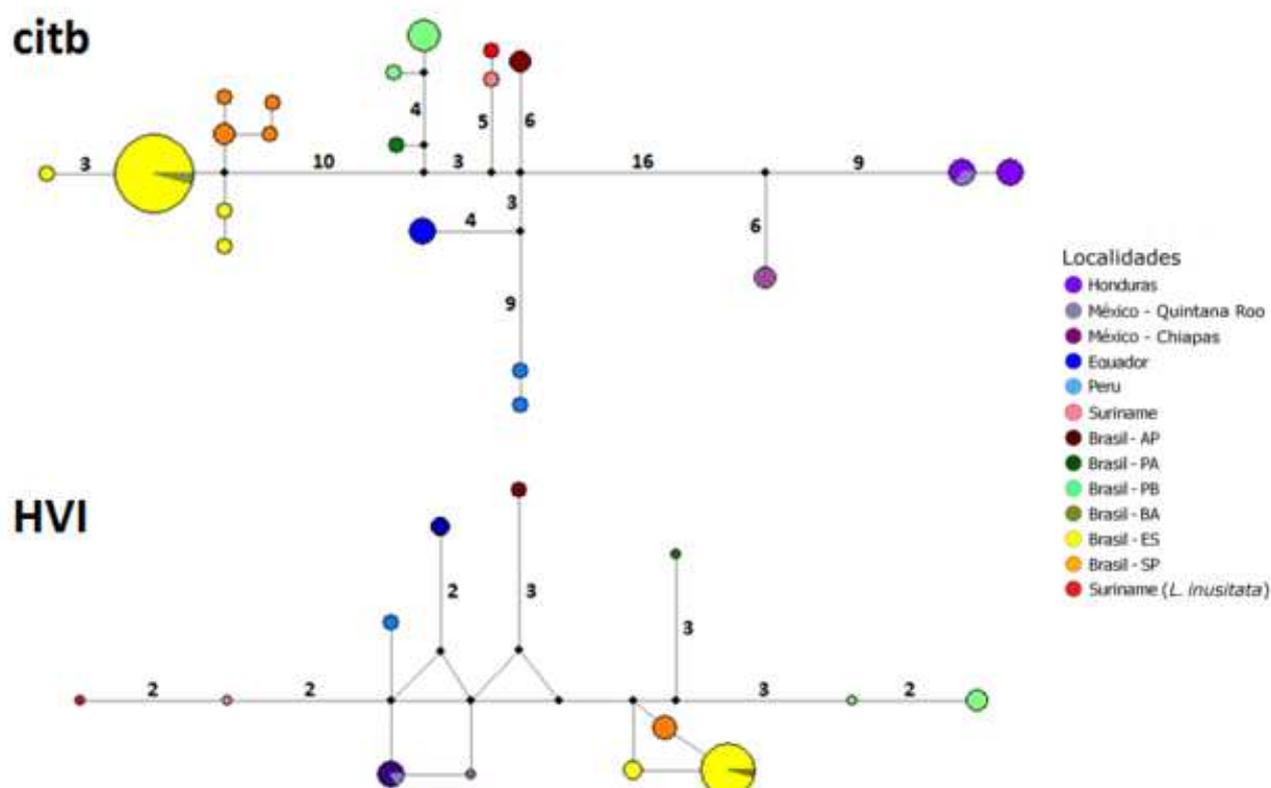


Figura 4. Rede hierárquica de haplótipos para o gene *citb* e região HVI construída a partir do critério de *median-joining* no programa Network 4.6.1. As áreas dos círculos correspondem, de maneira diretamente proporcional, as frequências dos haplótipos que os representam e os números nas linhas representam a quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos, sendo que a ausência de número significa um (1) passo mutacional.

História demográfica das populações

Para as análises demográficas foram usadas somente populações com pelo menos três indivíduos, sendo consideradas como uma população os indivíduos de localidades que fossem distantes entre si por no máximo 20 quilômetros, a saber: população ESvc formada por exemplares de Vitória e Cariacica (n=16); população ESs formada por espécimes de Sooretama (n=4); população ESi formada por indivíduos de Ibirapu (n=5) no ES; população SPsmp composta por exemplares da Serra do Mar e Peruíbe (n=3) em SP, população PB formada por indivíduos da Paraíba (n=5), população HON composta por espécimes de Honduras (n=5) e população EQU composta por exemplares do Equador (n=3).

Todos os valores de F_s de F_u significativos apontam para um rápido crescimento populacional para as populações estabelecidas e também para população como um todo (todos os indivíduos de *L. aurita* usados no presente trabalho), enquanto que para o D de Tajima nenhum valor foi significativo para os dois marcadores moleculares (Tabela 3).

Os gráficos de *mismatch* não foram informativos, pois devido ao pequeno número de indivíduos por haplótipos, a variação de *mismatch* foi pequena para a maioria das populações, o que não permite a estimativa de dados demográficos. Os valores de rH arpending significativos foram baixos, corroborando com o cenário de expansão populacional recente, e os índices de θ_0 e θ_1 demonstraram que as populações expandiram de um tamanho reduzido para um tamanho consideravelmente maior (Tabela 3).

A partir dos valores encontrados para os tempos de Ancestral Comum Mais Recente (T_{DIV}), foi possível estimar que a separação de *L. orinocensis* do clado *L. aurita* + *L. inusitata* ocorreu há aproximadamente 667,6 mil anos. Os clados VI e I + II se divergiram há 557,5 mil anos atrás, sendo que para a separação do clado I e II encontramos um valor de 401,4 mil anos de divergência. Para a separação dos clados VI + I + II do e V + III e IV observa-se o valor de 584,6 milhares de anos, enquanto que o clado V + III e IV se divergiram há 444,1 mil anos atrás e o clado V e III se diferenciou há 381,8 mil anos. Os subclados Ia e Ib se divergiram há pelo menos 253,3 anos, enquanto os subclados IIa e IIb se separaram há 263 mil anos atrás. Os subclados Va e Vb se diferenciaram há 276,8 mil anos e os subclados VIa e VIb se separaram há 239,9 milhares de anos (Figura 5).

Tabela 3. Valores das estimativas de θ_0 , θ_1 e τ com intervalo de confiança de 95% e RHarpeding (RHarp) obtidos através da análise de *mismatch distribution* e os valores de F_s de Fu (F_s) e D de Tajima (D) para as populações estabelecidas e para a população como um todo (todos os indivíduos amostrados).

Gene	População	θ_0	θ_1	τ	RHarp	F_s	D
Citb	ESvc	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	ESs	18.47109	99999	10.05078	0,220	-0,39918	0,08338
	ESi	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	SPsmp	0	99999	86.05273	0,560	-2,19722	0
	PB	0	0	0	0,680	-5,40913	-0,97256
	HON	0.00352	99999	2.75195	0,360	-4,77912	0,24314
	EQU	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	TOTAL	3.29238	124.39570	237.24805	0,0570	-24,15953	-0,14993
HV1	ESvc	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	ESs	17.10000	99999	5.52148	1	-1,87180	2,01187
	ESi	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	SPsmp	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	PB	0	99999	3.25000	0,680	-4,29249	-1,04849
	HON	0.00176	99999	2.65820	0,360	-4,77912	0,24314
	EQU	0	0	0	0	34×10^{37}	0
	TOTAL	0	0	0	0,047	-24,8266	-0,40308

Em **negrito** os valores significativos para Rharp, F_s e D.

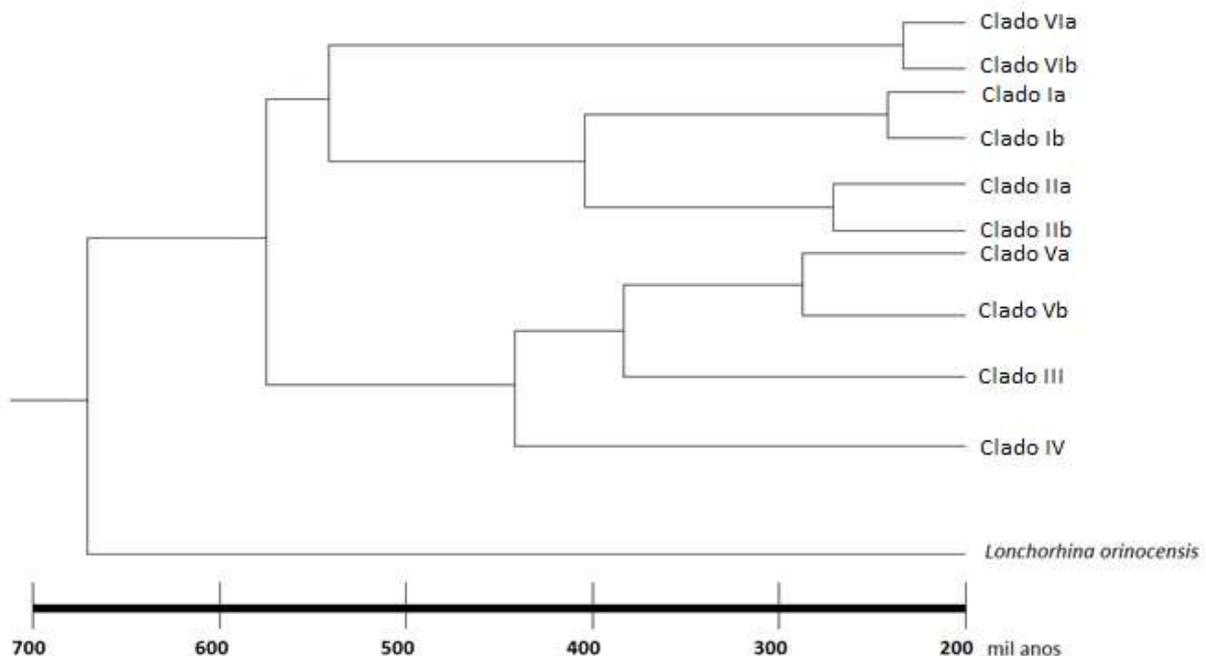


Figura 5. Esquema representativo para os tempos de Ancestral Comum Mais Recente (T_{DIV}) de cada clado observado em milhares de anos.

Análises Intra e Interpopulacionais

As diversidades haplotípicas (dH) e a nucleotídicas (dN) para a espécie foram altas para os dois marcadores moleculares (dH>0,5 e dN>0,005).

Para o gene *citb*, observamos que as populações ESs, SPsb, SPsmp, MEX, PER e HON apresentaram alta dH, enquanto as demais mostraram baixa ou nula dH. A maioria das dN foram baixas (com exceção das populações ESs e MEX), o que indica que a maioria dos haplótipos são distintos entre si por poucos passos mutacionais. Para a região HVI, a maioria das dH foram baixas ou nulas (com exceção das populações ESs e MEX) e a dN confirma o padrão de dH, sendo todas de valores baixos, com uma única exceção para a população ESs (dN= 0,00554).

Para ambos os marcadores moleculares as diferenças par-a-par foram pequenas em sua maioria (exceto ESs para o *citb*), diferentemente do encontrado para as populações como um todo. A partir desses dados é possível inferir que, no geral, as populações em separado são pouco diversas, mas que apresentam diferenças significativas entre elas, o que explicaria os altos índices gerais (para a espécie como um todo). Todos os dados acima citados encontram-se detalhados na tabela 1.

Com base nos resultados observados nas árvores filogenética, para os teste de AMOVA 1 foram propostos três cenários (Tabela 4): I: todas as populações (ESvc, ESs, ESi, SPsmp, PB, EQU, HON) formam um único grupo; II: há quatro grupos formados: ESvc+ESs+ESi+SPsmp, PB, EQU e HON; III: há dois grupos: leste (ESvc, ESs, ESi, SPsmp, PB) e oeste (EQU e HON).

Para testar a hipótese levantada Lopes e Ditchfield (2009) que trata da subdivisão de populações na Mata Atlântica (MA) em dois grupos, foram testados dois cenários para o teste de AMOVA 2 (Tabela 4): I: todas as populações da MA (ESvc, ESs, ESi, SPsmp e PB) formam o mesmo grupo e II: as populações da MA formam os dois grupos propostos previamente por Lopes e Ditchfield em 2009: Mata Atlântica SUL (ESvc, ESs, ESi, SPsmp) e Mata Atlântica NORTE (PB).

As análises de AMOVA 1 sustentam a existência de quatro unidades evolutivamente significantes (cenários I e II), corroborando a estruturação populacional encontrada pelas análises dos dois marcadores usados no estudo, pois a variação encontrada entre grupos é extremamente maior do que a encontrada dentro das populações e entre as populações dentro

dos grupos. O cenário III foi o pior cenário observado, visto que a variação entre as populações dentro dos grupos tem uma menor diferença entre a diferença entre os grupos estipulados, além disso observa-se que o valor de F_{sc} é relativamente maior do que o valor de F_{ct} , desta maneira esse grupo pode ser considerado artificial.

Os resultados de AMOVA 2 dão suporte para a existência de dois clados na Mata Atlântica para ambos os marcadores moleculares, como proposto por Lopes e Ditchfield (2009), pois a fonte de variação entre os grupos é extremamente maior do que dentro das populações e entre as populações dentro dos grupos no cenário II. No cenário I mais uma vez a diferença encontrada entre as populações é bem maior do que a encontrada dentro das mesmas. Para ambos os marcadores moleculares pode-se notar valores mais elevados dos índices F_{ct} em relação ao F_{sc} , mesmo o F_{sc} para HVI sendo alto, o F_{ct} é ainda maior, o que corrobora a ideia de estruturação de grupos de populações para ambos os testes de AMOVA.

A maioria dos valores de F_{st} entre os pares de populações são elevados o que reforça mais uma vez a ideia de estruturação populacional (Tabela 5), nota-se algumas exceções com valores de F_{st} menores que 0,6 entre as populações do Espírito Santo. Além disso, o cálculo do número migrantes (N_m) mostrou ausência de migrantes para a maioria das populações, com exceção entre ESvc e ESi para citb e para a HVI e entre ESi e ESv e SPsmp e ESs para a HVI.

Tabela 4. Análise da Variância molecular (AMOVA) de *Lonchorhina aurita*.

AMOVA	Cenários	Marcadores	Dentro das populações	Entre as populações dentro dos grupos	Entre grupos	<i>Fst</i>	<i>Fct</i>	<i>Fsc</i>
1	Todas as populações formam um único grupo (I)	citb	3,04	96,96	-	0,96964	-	-
		HV1	5,59	94,41	-	0,94409	-	-
	Populações separadas em quatro grupos (II)	citb	1,99	2,80	95,21	0,98014	0,95213	0,58509
		HV1	3,81	8,48	87,71	0,96190	0,87714	0,68991
	Populações separadas em dois grupos (III)	citb	1,93	37,49	60,57	0,98065	0,60571	0,95093
		HV1	3,93	46,54	49,53	0,96067	0,49525	0,92208
2	Todas as populações da MA formam um único grupo (I)	citb	6,60	93,40	-	0,93405	-	-
		HVI	6,81	93,19	-	0,93188	-	-
	Populações da MA separadas em dois grupos (II)	citb	2,73	4,32	92,95	0,97270	0,92946	0,61304
		HVI	2,98	7,84	89,18	0,97019	0,89178	0,72454

Tabela 5. *Fst* entre os pares de populações para o gene citb (abaixo) e para a região HVI (destaque em cinza acima).

	ESvc	ESs	ESi	SPsmp	HON	EQU	PB
ESvc	-	0,67677	0	1	0,97848	1	0,97379
ESs	0,52730	-	0,39394	0,73913	0,86521	0,91176	0,86033
ESi	0	0,21233	-	1	0,95000	1	0,93939
SPsmp	0,96392	0,29841	0,90228	-	0,93075	1	0,92563
HON	0,99465	0,94454	0,98744	0,97730	-	0,92727	0,91049
EQU	1	0,92445	1	0,98837	0,98107	-	0,94858
PB	0,99136	0,89938	0,97980	0,96199	0,97384	0,97223	-

DISCUSSÃO

Filogeografia de *L. aurita*

O presente estudo representa a análise mais completa da variação genética de *L. aurita* até o momento, compreendendo 55 espécimes para o gene *citb* e 54 para o marcador HVI de 18 localidades, com aumento de aproximadamente 350% de espécimes e localidades em relação a trabalhos anteriores. Foram encontrados seis clados estruturados geograficamente, todos com haplótipos exclusivos, sendo um de amostras do Sul da Mata Atlântica (MA), um da região norte da MA e do Pará, um do extremo norte do Brasil, um do Suriname, um da região Andina e por fim um da região da América Central e América do Norte, com valores de divergência de sequência reduzidos (2,2%).

Observando-se as análises de filogenia e os cálculos dos valores de divergência de sequências, verificou-se que a amostra de *Lonchorhina inusitata* Handley e Ochoa, 1997 do Suriname, utilizada a princípio para enraizamento da árvore como grupo externo, sempre esteve incluída no clado de *L. aurita*. Essa amostra compôs um clado com a amostra de *L. aurita* também do Suriname. Através da observação das redes de haplótipos pode-se notar o quão semelhante essa amostra é das demais, principalmente da do Suriname, sendo diferenciada apenas por um passo mutacional para o gene *citb* e dois passos mutacionais para o marcador HVI. Ainda, essa amostra de *L. inusitata* se diferencia de *L. aurita* por 2,3%, enquanto que a divergência dentro de *L. aurita* é em média 2,2%. Contudo é importante ressaltar que os espécimes nomeados como *L. inusitata* até o final do século XX eram todos identificados como *L. aurita*, pois o gênero era monotípico até então. Além disso, ao descrever *L. inusitata*, os autores destacaram a maior semelhança desta espécie com *L. marinkellei* Hernández-Camacho e Cadena, 1978, do que com *L. aurita*, sugerindo consequentemente um questionamento da separação também de *L. marinkellei* e *L. aurita*, visto a grande semelhança genética de *L. aurita* e *L. inusitata*. Desta maneira sugere-se a necessidade de uma ampla revisão taxonômica para avaliar a validade das espécies do gênero.

De acordo com o arranjo dos clados observados nas árvores filogenéticas, os baixos valores de divergência de sequência dentro de *L. aurita* (0 a 3,4%) e alto valor de divergência de sequência entre *L. aurita* e *L. orinocensis* (16,3%), pode-se afirmar que os clados geográficos de *L. aurita* correspondem a populações e não a táxons distintos, pois eles

apresentam pouca divergência entre si quando comparados com o valor da divergência entre os espécimes analisados e o grupo externo. Além disso, as amostras do Equador, localidade tipo da subespécie *L. aurita occidentalis*, se diferenciam pouco das demais de outras localidades (2,4%), o que dá suporte à proposta de Solmsen (1985) na sinonímia das subespécies *L. aurita aurita* e *L. aurita occidentalis* em *L. aurita*.

O padrão filogeográfico geral esperado para morcegos é semelhante ao das aves e diferente do de pequenos mamíferos não voadores (Ditchfield, 2000), apresentando pouca estruturação populacional e baixa divergência de sequência entre populações até mesmo muito distantes geograficamente. Por outro lado, alguns estudos tem mostrado estruturação populacional para algumas espécies de morcegos (Hoffmann e Baker, 2001; Hoffmann e Baker, 2003; Larsen *et al.* 2007; Martins *et al.*, 2007) e até mesmo para algumas aves (Bates *et al.*, 1998; Bates 2000 e 2002; Aleixo, 2004; Cheviron *et al.*, 2005; Cabanne 2007 e 2008). Para o morcego *Lonchorhina aurita*, Lopes e Ditchfield (2009) encontraram dois conjuntos diferentes de haplótipos entre amostras do sul e do norte da Mata Atlântica. Tal resultado os levou a acreditar que *L. aurita* também poderia ter estruturação populacional, porém este estudo foi feito com uma amostragem reduzida e com poucas localidades distintas (12 indivíduos de quatro localidades).

O arranjo filogenético encontrado no presente trabalho apresentou seis grupos estruturados geograficamente, sendo quatro destes nunca antes registrados na literatura (clado III, IV, V, VI e subclado Ib) e dois coincidentes com o estudo de Lopes e Ditchfield (2009) (subclado Ia e clado II). Além disso, observou-se que o clado da MA Norte (subclado Ia) é mais relacionado a um clado com uma amostra Amazônica (subclado Ib) do que com as amostras do sul da MA (clado II). Os valores de divergência observados pelo presente trabalho foram baixos, compatível com o encontrado no estudo de Ditchfield (2000), porém estruturação geográfica associada a baixos valores de divergência de sequência também já foi registrada para a espécie *Bradypus variegatus* na Mata Atlântica (Moraes-Barros *et al.*, 2006). Ao se observar os valores de tempo de ancestral comum mais recente para os grupos observados, nossos dados mostraram que a separação dos mesmos se deu há pelo menos 239 mil anos atrás. Desta maneira, os baixos valores de distância genética encontrados entre os clados poderia estar associado a alta pressão seletiva sofrida pelos marcadores moleculares analisados.

Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar os clados geográficos formados, sendo que tanto eventos históricos e demográficos, quanto comportamentais e ecológicos podem influenciar nas relações dentro dos táxons (Avice, 2000). Analisando o conjunto de dados gerado no presente estudo, acredita-se que a diferenciação entre os grupos geográficos é correlacionada basicamente com a distância geográfica (Atartouch *et al.*, 2006). O teste de Mantel confirma a relação entre distância genética e geográfica. Além disso, o panorama encontrado corresponde a expectativa de que o padrão descrito seja de isolamento por distância, visto que não se observam transições discretas entre linhagens divergentes para ambos os marcadores e a espécie possui ampla distribuição.

Outras hipóteses são recorrentemente levantadas em estudos filogeográficos clássicos para se explicar padrões de estruturação geográfica de clados. Dentre as hipóteses que envolvem o componente histórico, destacam-se quatro teorias com maior relação com os resultados encontrados: 1- Teoria de que Mata Atlântica e Amazônia já estiveram ligadas entre si (Bigarella *et al.*, 1975; Oliveira-Filho e Ratter, 1995); 2- Teoria paleogeográfica, que diz a respeito das mudanças da distribuição das terras e mares durante os períodos Terciário e Quaternário, com sucessivas reduções e aumentos no nível do mar em Períodos Glaciais e Interglaciais, respectivamente, levando à separação de uma biota previamente contínua na Amazônia (Haffer, 1969); 3- Teoria dos rios, que se refere à grande amplitude do leito dos rios em alguns trechos, formando verdadeiras barreiras à dispersão e promovendo a diferenciação até de aves e outras espécies situadas em margens opostas (Haffer, 1969); e 4- Teoria dos refúgios, que explora a possibilidade de retração e expansão de florestas durante as mudanças climáticas do Pleistoceno (Haffer, 1969; Whitmore e Prance, 1987), além da teoria de diversificação por formação de cadeias montanhosas. Mesmo que no geral essas teorias sejam recorrentemente abordadas na explicação de eventos de especiação, elas também podem ajudar a compreender as interrupções de fluxos gênicos e a estruturação populacional notadas pelas análises do presente trabalho.

A maior relação das amostras do clado Ia, composto por amostras do norte da MA do Brasil, com a amostra Amazônica do clado Ib (PA) do que com as amostras ao Sul da MA (clado II), separadas em clados distintos há pelo menos 253 mil anos, pode ser explicada pela teoria de que Mata Atlântica e Amazônia já estiveram ligadas. Costa (2003) também mostrou que espécies de pequenos mamíferos não voadores ao norte e ao sul da MA eram mais próximas geneticamente de espécies amazônicas do que entre si. A autora notou que a

similaridade de sequências foi muitas vezes maior entre as amostras da MA e Amazônia (AM) ou entre estas e as florestas da área central brasileira do que dentro de cada um dos dois domínios de floresta tropical, concluindo que a MA não é historicamente isolada da AM. Tal padrão é explicado por Costa (2003) pelo fato das florestas secas e abertas da área central do Brasil não estarem isoladas dos biomas tropicais, pelo contrário, durante o Pleistoceno estariam funcionando como uma eficiente ponte de conexão entre os biomas MA e AM, baseado nisso a autora concluiu que os biomas amazônico e atlântico não são exclusivos quanto a fauna.

A separação das amostras da MA nos clados II (ES, SP e BA) e Ia (PB), diferenciadas há cerca de 400 mil anos, pode ser embasada pela teoria dos refúgios. Acredita-se que antes da retração e expansão das matas que ocorreram no Pleistoceno causadas por alterações da temperatura e umidade nos períodos glaciais e interglaciais (Ab'Saber, 1977; Clapperton, 1993; Hewitt, 2000; Ledru *et al.*, 2005), haviam conexões que possibilitavam o fluxo gênico entre as populações, mas que depois que os espécimes foram separados em ilhas de mata úmida durante esse processo, eles tiveram tempo suficiente para se diferenciar. Tal teoria foi testada em 2008 em estudo de Carnaval e Moritz, que através de modelos florestais de acordo com registro de pólen e modelos paleoclimáticos previram áreas de estabilidade histórica que combinam com os centros atuais de endemismo de vários táxons. A teoria dos refúgios é recorrentemente abordada para explicar o padrão encontrado na Mata Atlântica para diversos táxons (Costa, 2003; Grazziotin *et al.*, 2006; Moraes-Barros *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007; Cabanne, 2007; Carnaval e Moritz 2008; Lara-Ruiz *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a idade de divergência dos clados observados no presente estudo não são compatíveis com o último evento de glaciação (11 mil anos atrás), mas acredita-se que eventos de glaciação anteriores possa ter influenciado na atual distribuição das espécies, pois foram registrados pelo menos 16 eventos de glaciação durante o Pleistoceno, no período Quaternário, sendo que a média de duração desses eventos foi de 100 mil anos (Salgado-Labouriau, 1994; Suguio *et al.*, 2005). Além disso, observa-se uma grande redução da faixa de MA ao longo da costa da região nordeste do Brasil, sendo grande parte da região dominada pela Caatinga, tal vegetação por não ser de mata fechada, não é comumente habitada por *L. aurita* o que pode ter atuado como barreira entre as amostras do sul e norte da MA.

O clado III é composto por amostras da AM, sendo estas do extremo norte do Brasil. A separação das amostras amazônicas do Pará (clado Ib) e Amapá (clado III) poderia ser explicada pela teoria de Wallace (1852). Wallace propôs uma hipótese para os diversos padrões filogeográficos obtidos na Amazônia, nos quais as divergências seriam definidas devido ao Rio Amazonas estar se comportando como barreira geográfica em alguns trechos de seu percurso (assim como na teoria dos rios). Pellegrino (2005) atribuiu aos rios, só que dessa vez da Mata Atlântica, a estruturação geográfica observada para a espécie de lagarto *Gymnodactylus darwini*. Porém esta teoria não pode ser aplicada ao observado no estudo, pois a separação das amostras ocorreu há 584 mil anos atrás, bem posterior a formação do rio Amazonas (11 milhões de anos). O panorama de separação das amostras amazônicas encontrado pode então ser explicado pela teoria Paleogeográfica, uma vez que os eventos que levaram a formação dos mares internos amazônicos ocorreram no terciário e quaternário, podendo assim coincidir com a data de divergência dos clados.

O clado IV é composto por amostras do Suriname de áreas também do bioma amazônico e se diverge das demais, provavelmente apenas pela distância geográfica e consequente isolamento. Além disso, estudos recentes apontam que a aparente unidade dos atuais biomas pode ser enganosa, e uma história complexa pode estar na base da formação e das interações biogeográficas desses ecossistemas (Tchaicka *et al.*, 2007). Tal hipótese pode explicar a divergência de amostras que compõe um mesmo bioma, como na separação de amostras da MA dos clados II e Ia e das amostras Amazônicas dos clados Ib, III e IV.

O clado V é composto por amostras andinas, características de áreas elevadas, e talvez por diferenças geradas pela ocupação desse nicho essas amostras se divergiram das demais. Novamente a separação das amostras do clado Va e Vb se deve possivelmente a distância geográfica, ou ainda pela separação dos indivíduos por vales entre as montanhas que atuam como uma barreira geográfica, visto que as amostras são características de ambiente de altitude.

O clado VI é composto por espécimes da América Central (Honduras) e América do Norte (México) e quanto à separação dessas amostras em um clado com amostras de Honduras e Quintana Roo do México (VIa) e um clado com amostra do Chiapas também do México (VIb), é sabido da presença de elevadas áreas de planalto entre as localidades de Chiapas e Quintana Roo. Desta maneira, supõe-se que o relevo de altitude esteja atuando como uma barreira eficiente entre as populações em questão. Há na literatura evidências de

cadeias de montanhas separando populações de morcegos, como observado para as espécies de morcego do gênero *Carollia* por ação da cadeia montanhosa dos Andes (Hoffmann e Baker, 2003), para a espécie *Pteronotus davyi* no México (Guevara-Chumacero *et al.*, 2010) e para os molossídeos *Chaerephon atsinanana* e *C. leucogaster* de Madagascar (Lamb *et al.*, 2012).

Quanto aos componentes comportamentais e ecológicos que influenciam no padrão de diferenciação dos clados observados em *L. aurita* é possível citar fatores tais como dispersão limitada, filopatria de fêmeas e dispersão mediada por machos, hábito de vida e estratégia de forrageio. Para *L. aurita* há poucos dados ecológicos e comportamentais na literatura, mas acredita-se que eles, por serem da subfamília Phyllostominae são característicos de matas fechadas (Lopes e Ditchfield, 2009) e forrageiam próximos aos rios (informação pessoal de Ditchfield), não percorrendo assim longas distâncias entre fragmentos de mata, além de que, pelo fato de serem morcegos de pequeno porte, não são capazes de voar longas distâncias. Além disso, sabe-se que *L. aurita* possui hábito de vida cavernícola e de formação de colônias, o que mais uma vez sugere uma limitada dispersão para o grupo, vindo corroborar a proposta de isolamento por distância.

A estrutura detectada para os marcadores mitocondriais também pode ser atribuída à um processo de filopatria de fêmeas dadas as características destes marcadores (*e.g.*, McCracken, 1987; Chesser, 1991; Worthington Wilmer *et al.*, 1999; Castella *et al.*, 2001; Miller-Butterworth *et al.*, 2003; Kerth e Morf, 2004, Rivers *et al.*, 2005; Armstrong, 2006; Furman, 2008; Weyeneth *et al.*, 2011; Lamb *et al.*, 2012). Geralmente em mamíferos (Greenwood, 1980), e em morcegos em particular (Kerth, 2006), as fêmeas tendem a ser muito mais filopátricas do que os machos. Assim, seriam necessários estudos com marcadores nucleares de alta taxa de evolução para saber a contribuição dos machos no processo, já que o marcador utilizado no estudo (RAG2) revelou baixa variabilidade, assim seria adequado a análise de microsatélites, que tem uma taxa de evolução semelhante a de marcadores mitocondriais e é de origem nuclear.

História demográfica

Análises de estruturação populacional, história demográfica e características genéticas de populações podem fornecer informações sobre processos que levaram aos padrões

observados de variação genética entre grupos (Emerson *et al.*, 2001), pois a oscilação no tamanho das populações provoca traços particulares que podem ser detectados em dados genéticos de sequências de DNA (Slatkin e Hudson, 1991; Rogers e Harpending, 1992). Por exemplo, comparações entre diversidade de haplótipos e diversidade nucleotídica podem apontar eventos demográficos de uma população (Martínez *et al.*, 2006). Segundo Grant e Bowel (1998), populações com valores altos de diversidade haplotípica ($dH > 0,5$) e baixos valores de diversidade nucleotídica ($dN < 0,005$) possivelmente passaram por evento de gargalo populacional seguido de rápido crescimento demográfico. Isso ocorre devido ao fato de que nestes eventos de expansão populacional repentina há uma tendência à retenção de novas mutações (Fu 1997), enquanto que populações com valores elevados de diversidade haplotípica e nucleotídica podem representar populações com estabilidade populacional e longa história evolutiva.

O conjunto de dados do presente estudo apontou para uma expansão demográfica recente para algumas populações (SPsb, SPsmp, PER, HON e MEX), visto que os valores de dH elevados estavam associados a um baixo valor de dN . Indicações de expansão populacional recente associadas a elevados valores de dH e baixos valores de dN também foram encontradas para outros morcegos, como para *Nyctalus azoreum* no arquipélago de Açores em Portugal (Salgueiro *et al.*, 2004), *Miniopterus schreibersii* também em Portugal (Pereira *et al.*, 2009) e *Chaerephon leucogaster* em Madagascar (Lamb *et al.*, 2012).

Um estudo realizado em 2008 por Carnaval e Moritz relacionou dados de simulação climática com estudos paleopalinológicos e de filogeografia e descreveu um cenário no qual, durante o Pleistoceno, existiu uma área de floresta sempre verde e contínua na Bahia, enquanto ao sul desta área as simulações mostraram que o clima não era capaz de sustentar uma área de florestas como as de hoje. Os autores então concluíram que nesta região a floresta deve ter ficado restrita a fragmentos muito pequenos em áreas de maior pluviosidade (Whitmore e Prance, 1987). De acordo com Lessa *et al.* (2003) a existência de refúgios pressupõe uma contração populacional associada à fragmentação do habitat e uma subsequente assinatura de expansão nos marcadores moleculares, que pode ser fruto tanto de uma expansão demográfica como uma expansão geográfica, já que ambas deixam a mesma assinatura nos marcadores moleculares (Ray *et al.*, 2005).

O cenário encontrado no presente trabalho corrobora a ideia dos refúgios para as amostras do leste do Brasil, em especial para São Paulo, Espírito Santo e Paraíba, visto que os

resultados do teste de F_s de Fu, quando foram estatisticamente significativos, apresentaram valores negativos, o que sugere uma expansão populacional recente (Fu, 1997). Além disso, os valores de dH e dN mostraram que os diferentes haplótipos são distintos por poucos passos mutacionais, o que mais uma vez aponta para uma expansão recente (Grant e Bowel, 1998). As amostras do Peru, Honduras e México também apresentaram um perfil de expansão recente, mas tal achado foi baseado em um número pequeno de amostras, deste modo qualquer conclusão merece ressalvas.

Assim, é possível sugerir que a baixa divergência encontrada entre as sequências dos marcadores moleculares nos clados formados possa ser decorrente de um efeito gargalo sofrido pelas populações, o que é reforçado pelos dados que apontam para um evento de expansão populacional recente. Acredita-se que após o efeito *bottleneck* enfrentado pela populações ocorreu perda de alelos, gerando baixa divergência genética interpopulacional e baixa divergência entre os clados também. Tal hipótese é embasada pelo fato das populações terem expandido de um número pequeno de indivíduos para número bem maior, conforme mostrado pelos valores de θ_0 e θ_1 do presente trabalho, o que sugere que o atual cenário de diversidade gênica tenha vindo de um pequeno estoque inicial.

É importante ressaltar ainda a discrepância nos dados para a região HVI, pois foram encontrados valores inesperados para os índices calculados, sendo que índices como número de diferenças par-a-par e número de sítios polimórficos foram muito menores para a HVI do que para o gene *citb* que conhecidamente tem uma evolução menos acelerada. Desta maneira, acredita-se que para *L. aurita* a HVI tem se mostrado como uma região altamente conservável, não sendo assim um bom marcador para geração de dados populacionais para a espécie, assim como Rocha *et al.* (2012) observou para o gênero do marsupial *Micoureus*.

Estrutura genética

A análise de AMOVA testa a existência de estruturação genética comparando a variabilidade genética entre e dentro das populações. Quando o valor de AMOVA é maior dentro das populações do que entre elas, indica-se falta de estruturação geográfica (Excoffier *et al.*, 1992). Em nossas análises o valores de AMOVA foram maiores entre os grupos e populações do que dentro delas, coincidindo com um padrão de estruturação populacional.

As análises de AMOVA confirmaram a existência de quatro grupos com estruturação geográfica, coincidentes com quatro dos clados encontrados pelas análises filogenéticas (clado Ia, II, V e VI) e com a rede de haplótipos gerada que mostrou a formação grupos estruturados por localidade. Além disso, os dados de AMOVA também apontaram para uma divisão populacional entre as amostra da MA, pois a variação entre os grupos de populações Sul e Norte da MA foi extremamente maior do que entre as populações. Evidências de estruturação populacional na Mata Atlântica é recorrente em outros trabalhos (e.g., Costa, 2003; Leite, 2003; Pellegrino *et al.*, 2005; Wüster *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006; Moraes-Barros *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Fouquet, 2007; Miranda *et al.*, 2007; Cabanne *et al.*, 2007 e 2008; Lara-Ruiz *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009).

Os valores de *Fst* entre todas as populações foi elevado, acima de 0,6 (Freeland, 2005) e o número de migrantes por geração se mostrou bem reduzido. Esses dados, em conjunto, apontam para um isolamento genético entre as populações. Slatkin (1987) sugeriu que um migrantes por geração já é suficiente para superar a deriva genética entre as populações. Contudo, estudos mais recentes (Mills e Allendorf, 1996; Vucetich e Waite, 2000) sugeriram que um número de migrantes entre três e 10 é que é o ideal para a coesão entre as populações, o que favoreceria a manutenção da diversidade gênica. A quantidade de alelos trocados entre as populações é indicativo de estruturação ou não de uma espécie (Barton e Hewitt, 1985), pois a migração homogeneíza as frequências alélicas entre populações através do fluxo gênico, o que impede a fixação de adaptações local, impedindo assim a diferenciação (Barton e Hewitt, 1985). Para *L. aurita*, a maioria das populações analisadas (86% para o gene *citb* e 95% para o marcador HVI) não apresentou mais do que um migrante entre elas por geração.

Quanto ao tempo de divergência do ancestral mais recente, notamos valores consideravelmente altos (acima de 230 mil anos), o que nos indica que a separação dos clados é antiga. Tal dado dá suporte à estruturação geográfica encontrada entre os clados e populações.

Em resumo, os dados moleculares desse trabalho sugerem que as populações de *Lonchorhina aurita* são altamente estruturadas, com altos valores de *Fst*, ausência de migração entre quase todas elas e sinais de expansão recente. A estruturação populacional observada em *L. aurita* além de poder ser associada a efeitos como distância geográfica e fatores ecológicos e comportamentais da própria espécie, representa um bom modelo para se

testar as teorias de diferenciação genética disponíveis na literatura. Para aprimorar a elaboração de hipóteses serão necessários estudos complementares englobando indivíduos de áreas não amostradas e outros marcadores mitocondriais com taxa de evolução mais acelerada, além de estudos com marcadores nucleares de microssatélite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber, A. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas*, 3:1-19, 1977.
- Aleixo, A. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58: 1303–1317, 2004.
- Anisimova, M.; Gil, M.; Dufayard, J. F.; Dessimoz, C.; Gascuel, O. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology*, 60(5): 685-99, 2011.
- Anthony, H. E. Preliminary report on Ecuadorean mammals. *American Museum Novitates*, 55 (3): 1-14, 1923.
- Armstrong, K. N. Phylogeographic structure in *Rhinonictoris aurantia* (Chiroptera: Hipposideridae): implications for conservation. *Acta Chiropterologica*, 8(1):63-81, 2006.
- Atartouch, T.; Rüber, L.; Gonzalez, E. G.; Albert, E. M.; Rami, M.; Dakkak, A.; Zardoya, R. Signature of an early genetic bottleneck in a population of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 373–383, 2006.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review Ecology and Systematics*, 18: 489-522, 1987.
- Avise, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6): 1192-1208, 1989.
- Avise, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. 2000.
- Baker *et al.* Systematics of bats of the family phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional Papers*, Museum of Texas Tech University, 202: 1-16, 2000.
- Bandelt, H-J; Forster, P.; Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48, 1999.

- Barton, N. H.; Hewitt, G. M. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:113-148, 1985.
- Bates, J. M.; Hackett, S. J.; Cracraft, J. Area-relationships in the Neotropical low lands: an hypotheses based on raw distribution of passerine birds. *Journal of Biogeography*, 25: 783-93, 1998.
- Bates, J. M. Allozyme genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor*, 102: 770–783, 2000.
- Bates, J. M. The genetic effects of forest fragmentation on five species of Amazonian birds. *Journal of Avian Biology*, 33: 276–294, 2002.
- Bigarella, J. J.; Andrade-Lima, D.; Riehs, P. J. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 47: 411–464, 1975.
- Bruford, M.; Hanotte, O.; Brookfield, J. F. Y.; Burke, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular genetic analyses of populations: A practical approach*. IRL Press, Oxford, p. 225–269, 1992.
- Cabanne, G .S.; Santos, F. R.; Miyaki, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91: 73-84, 2007.
- Cabanne, G. S.; d'Horta, F. M.; Sari, E. H. R.; Santos, F. R.; Miyaki, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves:Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 49:710-773, 2008.
- Carnaval, A.C.; Moritz, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35(7): 1187-1201, 2008.
- Carnaval, A.; Hickerson, M. J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M. T.; Moritz, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323: 785–789, 2009.
- Castella, V.; Ruedi, M.; Excoffier, L. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 708-720, 2001.

- Chesser, R. K. influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations, *Genetics*, 129: 573-583, 1991.
- Cheviron Z. A.; Hackett S. J.; Capparella A. P. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 336–357, 2005
- Clapperton, C. *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Vol. 779: Amsterdam Elsevier, 1993.
- Costa, L. P. The historical bridge between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, 30: 71–86, 2003.
- Ditchfield, A. D. Phylogeography of Neotropical bats using mitochondrial DNA sequences. Ph. D. Thesis, University of California, Berkeley. 1996.
- Ditchfield, A. D; Burns, K. DNA Sequences Reveal Phylogeographic Similarities of Neotropical Bats and Birds. *Journal Comparative Biology*, 3(2): 165-170, 1998.
- Ditchfield, A. D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to non-volant small mammals. *Molecular Ecology*, 9: 1307-1318, 2000.
- Drummond, A. J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214, 2007.
- Emerson, B. C.; Paradis, E.; Thebaud, C. Revealing demographic histories species using DNA sequence data. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 707-716, 2001.
- Emmons, L. H.; Feer, F. *Neotropical Rainforest Mammals*, a field guide. 1^a ed. Chicago, University of Chicago Press, 1: 55-56, 1990.
- Endler, J. A. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 1977.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491, 1992.

- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50, 2005.
- Fitzpatrick, S. W., Brasileiro, C. A.; Haddad, C. F. B.; Zamudio, K. R. Geographical Variation in Genetic Structure of an Atlantic Coastal Forest Frog Reveals Regional Differences in Habitat Stability. *Molecular Ecology*, 18: 2877–96, 2009.
- Fjeldsa, J. Geographical Patterns for Relict and Young Species of Birds in Africa and South-America and Implications for Conservation Priorities. *Biodiversity and Conservation*, 3: 207-226, 1994.
- Fjeldsa, J.; Lovett, J. C. Geographical patterns of old and Young species in African forest biota: The significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodiversity and Conservation*, 6: 325-346, 1997.
- Fjeldsa, J.; Lambin, E.; Mertens, B. Correlation between endemism and local ecoclimatic stability documented by comparing Andean bird distributions and remotely sensed land surface data. *Ecography*, 22: 63-78, 1999.
- Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M. D.; Meyer, A.; Marty, C.; Blanc, M.; Gilles, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2): 267-582, 2007.
- Freeland, J. R. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, p. 388, 2005.
- Fu, Y. X. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925, 1997.
- Furman, A.; Çoraman, E.; Bilgin, R.; Karataş, A. Molecular ecology and phylogeography of the bent-wing bat complex (*Miniopterus schreibersii*) (Chiroptera: Vespertilionidae) in Asia Minor and adjacent regions. *Zoologica Scripta*, 38(2): 129-141, 2009
- Haffer, J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137, 1969.
- Haffer, J.; Prance, G.T. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: On the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, 16: 579-605, 2001.

- Handley, C. O. Jr.; Ochoa, G. J. New species of mammals from northern South America: a sword-nosed bat, genus *Lonchorhina* Tomes (Chiroptera: Phyllostomidae). *Memoria: Sociedade de Ciencias Naturales La Salle*, 57:71-82, 1997.
- Harpending H. C.; Batzer M. A.; Gurven M.; Jorde L. B.; Rogers A. R.; Sherry, S. T. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95: 1961-1967, 1998.
- Hernández-Camacho, J.; Cadena, G.A. Notas para la revisión del género *Lonchorhina* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Caldasia*, 12:199-251, 1978.
- Hewitt, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913, 2000.
- Hoffmann, F.G. and Baker, R.J. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome b gene. *Journal of Mammalogy*, 82: 1092-1101, 2001.
- Hoffmann, F.G. and Baker, R.J. Comparative phylogeography of short tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). *Molecular Ecology*, 12: 3403-3414, 2003.
- Hudson, R.R.; Slatkin, M.; Maddison, W. P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589, 1992.
- Huelsenbeck, J.P; Ronquist, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755, 2001.
- Greenwood, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28: 1140-1162, 1980.
- Guevara-Chumacero, L. M; López-Wilchis, R.; Pedroche, F. F.; Juste, J.; Ibáñez, C.; Barriga-Sosa, I. D. L. A. Molecular phylogeography of *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) in Mexico. *Journal of Mammalogy*, 91(1): 220-232, 2010.
- Goodwin, C.G.; Greenhall, A.M. A review of the bats of Trinidad and Tobago. *American Museum of Natural History*, 122:187-302, 1961.
- Grant, W. S.; Bowel, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity*, 89: 415–426, 1998.

- Grazziotin, F. G.; Monzel, M.; Echeverrigaray, S.; S.L. Bonatto. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* Complex (Serpentes:Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15: 3969-3982, 2006.
- Jones, J.K.; Smith, J.D; Genoways, H.H. Annotated checklist of the mammals of the Yucatan Peninsula, México. I. Chiroptera. *Occasional Papers The Museum*, Texas Tech University, 13:1-31, 1973.
- Kimura, M.A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120, 1980.
- Kerth, G.; Morf, L. Behavioural and genetic data suggest that Bechstein's bats predominantly mate outside the breeding habitat. *Ethology*, 110: 987-999, 2004.
- Kerth, G. Relatedness, life history, and social behaviour in the long-lived Bechstein's bat, *Myotis bechsteinii*. *Functional and evolutionary ecology of bats* (ed. by A.Zubaid, G.F.McCracken and T.H.Kunz), p. 199-212. Oxford University Press, New York. 2006.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences*, 10(9): 189-191, 1994.
- Lamb, J.M.; Naidoo, T.; Taylor, P.J; Napier, M.; Ratrimomanarivo, F.; Steven M.; Goodman, S.M. Genetically and geographically isolated lineages of a tropical bat (Chiroptera: Molossidae) show demographic stability over the late Pleistocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106, 18-40, 2012.
- Lara-Ruiz, P., Chiarello, A. G.; Santos, F. R. Extreme Population Divergence and Conservation Implications for the Rare Endangered Atlantic Forest Sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, 141: 1332-42, 2008.
- Larsen, P. A.; Hooper, S.R; Bozeman, M.C.; Pedersen, S.C.; Genoways, H.H.; Phillips C.J.; Pumo, D.E.; Baker, R.J. Phylogenetics and Phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* Complex Based on Cytochrome-*b* DNA Sequences. *Journal of Mammalogy*, 88(3):712-727, 2007.
- Ledru, M.; Rousseau, D.; Cruz, F. Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research*, 64(3): 444-450, 2005.

- Leite, Y. L. R. Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae), with Description of Two New Species. *University of California Publications in Zoology*, 132: 1-118, 2003.
- Lessa, E. P.; Cook, J. A.; Patton, J. L. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late quaternary. *PNAS*, 100(18): 10331-10334, 2003.
- Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452, 2009.
- Lopes, S.R. Inferências filogeográficas e Estruturação Populacional de *Sturnira lilium* (Phyllostomidae) de Mata Atlântica. M.Sc. thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2008.
- Lopes, S. R.; Ditchfield, A. D. Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical*, 15(1): 450-455, 2009.
- Lynch, J.D. The amphibians of the lowland tropical forests. In: Duellman WE (ed.). *The south American Herpetofauna: Its origin, evolution and dispersal*. Kansas, Museum of Natural History, University of Kansas. 1979.
- Marroig, G.; Cerqueira, R. Plio-Pleistocene South American History and the Amazon lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Computational Biology*, 2: 103-119, 1997.
- Martínez, P.; González, E. G.; Castilho, R.; Zardoya, R. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 39: 404-416, 2006.
- Martins, F. M.; Ditchfield, A. D.; Meyer, D.; Morgante, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45: 372-378, 2007.
- McCracken, G. F. Genetic structure of bat social groups. In: *Recent Advances in the Study of Bats* (eds Fenton, MB; Racey, P; Rayner, JMV), p. 281-298. Cambridge University Press, Cambridge. 1987.

- Miller-Butterworth, C. M.; Jacobds, D. S.; Harley, E. H. Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat. *Nature*, 424: 187–191, 2003.
- Mills L. S.; Allendorf, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 10:1509-1518, 1996.
- Miranda, G. B.; Andrades-Miranda, J.; Oliveira, J. F. B.; Langguth, A; Mattevi, M. S. Geographic Patterns of Genetic Variation and Conservation Consequences in Three South American Rodents. *Biochemical Genetics*, 45:839 –56, 2007.
- Moraes-Barros, N.; Silva, J. A B; Miyaki, C. Y.; Morgante, J. S. Comparative phylogeography of the Atlantic Forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenartha). *Genética*, 126: 189-98, 2006.
- Muller, P. Dispersal centers of terrestrial vertebrates in the Neotropical realm. *Biogeographica*, Junk, 2: 244, 1973.
- Paton, J. L.; da Silva, M. N. F. The history of Amazonian mammals: mechanisms and timing of diversification. In: Bermingham, E.; Dick, C.W.; Moritz, C. (Eds.), *Tropical Rainforest: Past, Present and Future*. Chicago, The University of Chicago Press., 107-126, 2005.
- Pellegrino, K. C .M.; Rodrigues M.T.; Waite N.A.; Morando M.; Yassuda Y. Y.; Sites J. W. 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*, 85(1): 13-26, 2005.
- Pereira, M. J. R; Salgueiro, P.; Rodrigues, L.; Coelho, M. M.; Palmeirim, J. M. Population Structure of a Cave-Dwelling Bat, *Miniopterus schreibersii*: Does It Reflect History and Social Organization? *Journal of Heredity*, 100(3): 533-544, 2009.
- Posada, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256, 2008.
- Ray, N.; Currat, M.; Berthier, P.; Excoffier, L. Recovering the geographic origin of early modern humans by realistic and spatially explicit simulations. *Genome Research*, 15: 1161–1167, 2005.

- Rivers, N. M.; Butlin, R. K.; Altringham, J. D. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14: 4299–4312, 2005.
- Rogers A. J.; Harpending, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution*, 9: 552–569, 1992.
- Rohl, A. Network: A Program Package for Calculating Phylogenetic Networks, Version 3.0. Mathematisches Seminars, University of Hamburg, Hamburg (www.fluxus-engineering.com). 2000.
- Rocha, R. G.; Leite, Y. L. R.; Ferreira, E.; Justino, J.; Costa, L. P. Highly conserved d-loop sequences in woolly mouse opossums Marmosa (*Micoureus*). *Mitochondrial DNA*, 23(2): 77-83, 2012.
- Salgado-Labouriau, M. *História Ecológica da Terra*, Edgard Blucher. 1994.
- Salgueiro, P.; Coelho, M. M.; Palmeirim, J. M.; Ruedi, M. Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology*, 13: 3357–3366, 2004.
- Sanborn, C.C. Neotropical bats in the Carnegie Museum. *Annals of Carnegie Museum*, 21: 171-183, 1932.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. Arlequin versão 2000: *A Software for Population Genetic Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. p .111, 2000.
- Slatkin, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787-792, 1987.
- Slatkin, M.; Hudson, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562, 1991.
- Smith, T. B.; Wayne, R. K.; Girman, D.J.; Bruford, M. W. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, 276: 1855-1857, 1997.
- Solmsen, E. *Lonchorhina aurita* Tomes, 1863 (Phyllostominae, Phyllostomidae, Chiroptera) in westlichen Ecuador. *Z. Säugetierk*, 50:329-337, 1985.

- Suguio, K.; Santana-Neto, J.; Nery, J.; Souza, C.; Oliveira, A.; Oliveira, P. *Variabilidade e mudanças climáticas no Brasil e seus impactos regionais. Quaternário do Brasil* (CRG Souza, K Suguio, AMSP Oliveira, PE Oliveira, eds.) Holos Editora, Ribeirão Preto: 28-51, 2005.
- Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595, 1989.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739, 2011.
- Tchaicka, L.; Eizirik, E; Oliveira, T. G. ; Candido, J. F.; Freitas T. R. O. Phylogeography and Population History of the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, 16:819–38, 2007.
- Tomes, R. F. On a new genus and species of leaf-nosed bat in the museum at Fort Pitt., *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1863: 81-84, 1863.
- Tuttle, M. D. *Distribution and Zoogeography of Peruvian bats, with comments on natural history*. The University of Kansas science bulletin, 49: 45-86, 1970.
- Vanzolini, P. E.; Williams E.E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, São Paulo, 19(1-4): 1-298, 1970.
- Vanzolini, P. E. Distributional Patterns of South American lizards. In: Vanzolini P. E; HayerWr (eds.) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Rio de Janeiro Academia Brasileira de Ciências, 1988.
- Vucetich, J. A.; Waite, T. A. Is one-migrant-per-generation sufficient for the genetic management of fluctuating population? *Animal Conservation*, 3:261-266, 2000.
- Xia, X.; Xie. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373, 2001.
- Wallace, A. R. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 20: 107-110, 1852.

- Weyeneth, N.; Goodman, S. M.; Ruedi, M. Do diversification models of Madagascar's biota explain the population structure of the endemic bat *Myotis goudoti* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Journal of Biogeography*, 38(1): 44–54, 2011.
- Wilson, D. E.; Reeder, D. M. (editors). *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press, 2: 142, 2005.
- Whitmore, T. C.; Prance, G.T. Biogeography and quaternary History in Tropical America. *Clarendon Press*. Oxford, 1987.
- Worthington Wilmer, J.; Hall, L.; Barratt, E.; Moritz, C. Genetic structure and male-mediated gene flow in the ghost bat (*Macroderma gigas*). *Evolution*, 53: 1582-1591, 1999.
- Wright, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159, 1931.
- Wüster, W.; Duarte, M. R.; Salomão, M. D. G. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. *Journal of Zoology: Proceedings of the Zoological Society of London*, 266: 1–10, 2005.

APÊNDICE

Espécimes utilizados na análise da seqüência do gene citocromo b (citb) e região hipervariável I do d-loop (HVI):

PAÍS - ESTADO (sigla): Localidade (coordenada geográfica): número de identificação do exemplar (haplótipo citb, haplótipo HVI).

Siglas referentes às coleções ou coletores: AD: Albert Ditchfield, VP: Vinícius Pimenta, GM: Geovana Mendes, LN: Leandro Novaes, RF: Richelli Freitas e PM: Poliana Mendes; SM: Susan Murray; ROM: Royal Ontario Museum; BR: estrada do Brasil, APC: A.P. Carmignotto e AC: A. Cesari; FMNH: The Field Museum of Natural History; TK: Texas Tech University; MBML: Museu de Biologia Melo Leitão; ASK: Angelo State University Texas Tech.

BRASIL - AMAPÁ (AP): Vila de Maracá, Mazagão (00°13'37" N, 51°43'18" W): BR156-10 (C12, H8), BR156-33 (C12, H8). **PARAÍBA (PB): Reserva Guaribas, Mamanguapé** (6°41'20" S, 35°07'31" W): AD60 (C9, H3), AD 61 (C9, H3), AD 62 (C10, H4), AD 63 (C9, H3), AD 64 (C9, H3). **BAHIA (BA): Ilhéus, Castelo Novo** (14°26' S, 39°03' W): MBML 1871 (C1, H5). **ESPÍRITO SANTO (ES): Pinheiros, Córrego do Veado** (18°22'14" S, 40°08'28" W): GM 33 (C1, H6); **Sooretama, Reserva de Sooretama** (19°03'22" S, 40°08'50" W): VP 264 (C2, H6), VP 311 (C3, H5), VP 316 (C4, H5), VP 317 (C1, H6); **Ibiraçu, Área de Relevante Interesse Ecológico Morro da Vargem** (19°53'28" S, 40°22'43" W): PM 27 (C1, H5), PM 28 (C1, H5), PM 29 (C1, H5), PM 32 (C1, H5), PM 47 (C1, H5); **Vitória, Parque Estadual da Fonte Grande** (20°18'14" S, 40°20'11" W): AD 917 (C1, H5), AD 922 (C1, H5), AD 923 (C1, H5), AD 925 (C1, H5); **Cariacica, Reserva Biológica Duas Bocas**: LN 16 (C1, H5), LN 18 (C1, H5), LN 19 (C1, H5), LN 20 (C1, H5), LN 26 (C1, H5), LN 29 (C1, H5), LN 30 (C1, H5), LN 31 (C1, H5), LN 32 (C1, H5), LN 58 (C1, H5), RF 10 (C1, H5), RF 11 (C1, H5). **SÃO PAULO (SP): Peruíbe, Estação Ecológica Estadual da Juréia-Itatins** (24°19'51" S, 47°20'38" W): AD 610 (C6, H7); Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Pedro de Toledo (24°16'01" S, 47°13'57" W): APC 1315 (C7, H7), APC 1316 (C6, H7). **Sete Barras, Fazenda Intervalos** (24°14'08" S, 48°04'42" W): SM 04 (C5, H7), SM 07 (C8, H7).

EQUADOR - Morona San Tiago: Cueva de los Tayos on the Río Pastaza (01°56'12"S, 77°47'36" W): ASK 7734 (C13, H11), ASK 7736 (C13, H11), ASK 7738 (C13, H11).

HONDURAS - COLON: Trujillo, Parque Nacional Capiro Y Calentura (15°52'N, 85°56' W): TK 136232 (C14, H1), TK 136233 (C14, H1), TK 136751 (C15, H1), TK 136839 (C15, H1), TK 136840 (C14, H1).

PERU - CUSCO: Paucartambo (13°01'25" S, 71°29'30" W): FMNH 174715 (C16, H10), FMNH 174718 (C17, H10).

MÉXICO - CHIAPAS: Tonala, Rio Ocuilapa (16°48" N, 93°40'18" W): TK 20559 (C19, H2), FJ155494 (C19); **QUINTANA ROO: Tulum** (20°12'43" N, 87°27'58" W): ROM 38227 (C15, H1).

SURINAME - SIPALIWINI: Rudi Kappelvliegveld (03°48' N, 56°48' W): TK 151458 (C18, H12).