



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA



CARLA CLARISSA NOBRE DE OLIVEIRA

**FILOGEOGRAFIA E VARIAÇÃO MOLECULAR DE MORCEGOS
CAVERNÍCOLAS (FURIPTERIDAE GRAY, 1866 E NATALIDAE GRAY,
1866) COM ÊNFASE EM TÁXONS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL**

BELO HORIZONTE

2019

CARLA CLARISSA NOBRE DE OLIVEIRA

**FILOGEOGRAFIA E VARIAÇÃO MOLECULAR DE MORCEGOS
CAVERNÍCOLAS (FURIPTERIDAE GRAY, 1866 E NATALIDAE GRAY,
1866) COM ÊNFASE EM TÁXONS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Zoologia.

Orientadora: Valéria da Cunha Tavares, PhD.

BELO HORIZONTE

2019

043

Oliveira, Carla Clarissa Nobre de.

Filogeografia e variação molecular de morcegos cavernícolas (Furipteridae gray, 1866 e Natalidae gray, 1866) com ênfase em táxons com ocorrência no Brasil [manuscrito] / Carla Clarissa Nobre de Oliveira. – 2019.

117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Valéria da Cunha Tavares.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Zoologia. 2. Filogeografia. 3. Quirópteros. 4. Taxonomia. I. Tavares, Valéria da Cunha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591



ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Carla Clarissa Nobre de Oliveira

Ao trigésimo dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove, às quatorze horas, na Universidade Federal de Minas Gerais, teve lugar a defesa de Doutorado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria da Doutoranda Carla Clarissa Nobre de Oliveira intitulada: **"Filogeografia e variação molecular de morcegos cavernícolas (Furipteridae Gray, 1866 e Natalidae Gray, 1866) com ênfase em táxons com ocorrência no Brasil"**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Valéria da Cunha Tavares, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para a candidata para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Gisele Pires de Mendonça Dantas, Helder Canto Resende, Paulo Estefano Dineli Bobrowiec, Renato Gregorin, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata.

Após a arguição, apenas os Srs. Examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: o trabalho foi:

- ☒ Aprovado sem alterações
☐ Aprovado com alterações (observações em anexo)
☐ Reprovado

Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2019.

Comissão Examinadora	Assinatura
Profa. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas	
Prof. Dr. Helder Canto Resende	
Prof. Dr. Paulo Estefano Dineli Bobrowiec	
Prof. Dr. Renato Gregorin	
Profa. Dra. Valéria da Cunha Tavares (Orientadora)	

Às raízes fincadas por Lourdes e às asas cedidas
por Mary.

AGRADECIMENTOS

A minha jornada com morcegos teve início no ano de 2004, quando tive a oportunidade, durante uma aula de ecologia, de capturar um *Artibeus planirostris* e, desde então, tenho dedicado os últimos quinze anos da minha vida a estudá-los. O caminho até aqui foi longo e são tantas pessoas a quem devo agradecimentos pela realização desse trabalho que possivelmente alguns escaparão à memória.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Valéria Tavares, pelo apoio e orientação desde a concepção do projeto, passando por todas as sugestões, críticas ao trabalho e na obtenção de dados. Por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e me ajudar a tentar compreender os morcegos cavernícolas.

Esse trabalho é parte integrante dos objetivos do projeto MCTI/CNPq/Universal 14/2014 processo 459121/2014-6, sob a coordenação de V. da C. Tavares. Agradeço ao CNPq e CAPES pelo apoio e financiamento de grande parte do projeto. Agradeço ao Instituto Tecnológico Vale, na pessoa do Dr. Guilherme Oliveira, pela produção de grande parte dos dados moleculares e ao Dr. Santelmo Vasconcelos, pelo apoio técnico e produção dos dados. Agradeço a CAPES pela bolsa PNPd concedida à minha orientadora.

Agradeço à Ligiane Moras, Érica Martinha, Daniel Casali, Patricia Pilatti, Fernanda Pizani e Guilherme Garbino pelo auxílio com as análises realizadas e pelas longas e elucidativas discussões sobre os resultados.

Aos membros da banca que gentilmente aceitaram dispor de seu tempo e conhecimento para colaborar com esse trabalho: Gisele Dantas, Helder Resende, Paulo Bobrowiec, Renato Gregorin, Luiz Falcão e Rafael Félix.

Ao professor Fernando Perini pela acolhida em seu laboratório e aos colegas e amigos do Laboratório de Mastozoologia da UFMG: Carla Melo, Daniel Casali, Cayo Dias, Rodolfo Stumpp, Fred Viktor e Maria Clara. Agradeço-os não apenas pelo aprendizado, mas por todo o apoio e carinho ao longo do percurso.

Ao professor Fabrício Santos pela recepção em seu laboratório e aos colegas do LBEM que tanto contribuíram nas atividades lá realizadas: Patrícia Avelino, Camila Salvicus, Elisa Ramos, Jean Oliveira, Zé Eustáquio e Rafael Félix.

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente ao coordenador Adalberto Santos e ao professor Fernando Silveira pela acolhida e apoio em questões da tese. Agradeço também ao secretário da PGZoo Eduardo Guimarães por sua disponibilidade em lidar com as mais diversas questões.

Agradeço aos pesquisadores que cederam material para a realização do trabalho: Adrian Tejedor (Amazon Aid Foundation), Anderson Feijó e Patrício Rocha (UFPB), Albert Ditchfield (UFES) e Ana Carolina Pavan (USP), Diego Astúa e Patricia Pilatti (UFPE), Fernando Perini (UFMG), Jennifer Barros (UFPR), Renato Gregorin (UFLA), Mário de Vivo e Juliana Gualda (MZUSP), Luís Reginaldo e Thayse Benathar (UFOPA, UFPA) e Roberto Novaes (UFRJ).

Aos amigos da Zoo, que ao longo dos anos se fizeram presentes nos meus dias das mais diversas formas: Carla Melo, Daniel Casali, Felipe Freitas, Graciele Braga, Graciela Bohórquez e Thiago Quintão, pela amizade e carinho.

Aos amigos e colegas que participaram direta ou indiretamente na execução do projeto: Érika Castro, Fernanda Pizani, Gabriela Prado, Gustavo Oliveira, Lígia Moreira, Marina Martins, Mariana Matias, Patricia Pilatti, Pâmella Moreno, Suelen Reis, Tatiana Souza, Thais Lira e Thayse Benathar.

Por fim, agradeço aos meus pais, Mary e Jorge pelo apoio e incentivo desde o início. À Patricia Pilatti por estar sempre presente nos meus dias, mesmo que à distância. Agradeço também ao Pedro, pelo afeto dedicado e por todo o apoio, sem os quais não seria capaz de estar onde estou.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

RESUMO

As espécies de morcegos neotropicais associadas aos abrigos diurnos rochosos, como cavidades e pedrais, estão distribuídos ao longo de diferentes biomas de forma descontínua, associados as ocorrências de áreas cársticas. *Furipterus horrens* e *Natalus macrourus* são morcegos insetívoros, cavernícolas/rupícolas distribuídos ao longo território brasileiro, considerados vulneráveis à extinção nacionalmente e, apresentam forte associação aos seus abrigos diurnos. O presente trabalho apresenta testes de delimitação de espécies e investigações sobre as relações evolutivas dos gêneros *Natalus* e *Furipterus*, utilizando dados mitocondriais (citocromo B e citocromo oxidase, subunidade I) de táxons associados aos ambientes cársticos. Para analisar as interrelações entre linhagens e/ou populações utilizamos análises bayesianas de estruturação populacional, de variância molecular e redes haplotípicas. Para testar limites específicos e relações evolutivas entre táxons e linhagens, consideramos as divergências genéticas observadas, testes de delimitação de espécies e análises filogenéticas bayesianas e de máxima verossimilhança. A espécie *Furipterus horrens* apresentou linhagens muito divergentes, com elevada estruturação populacional e distribuídas tanto simpátrica quanto alopatricamente. Essas divergências foram corroboradas por análises populacionais bayesianas, testes de delimitação de espécies e filogenéticos, revelando um possível complexo de espécies. Para a família Natalidae, *Chilonatalus* foi recuperado como gênero distinto e grupo irmão dos demais *Natalus*, *N. tumidirostris* foi recuperado como parafilético, associado aos espécimes de *N. stramineus* e *N. s. saturatus* é sinônimo de *N. mexicanus*. As análises populacionais de *Natalus macrourus* indicaram moderada estruturação populacional, com haplótipos compartilhados entre localidades geograficamente distantes. A divergência genética, filogenia e avaliações populacionais foram compatíveis, *a priori*, com a ocorrência de uma única espécie para o Brasil, sem isolamento entre as populações amostradas. As análises de diversidade e variação molecular de *Natalus* e *Furipterus* são pioneiras e apontam para a necessidade de avaliações dessa natureza, sobretudo no caso de táxons sob pressão ambiental. As informações geradas subsidiam avaliações mais precisas do *status* de conservação das espécies ameaçadas e ações para a conservação e manejo dessas.

Palavras-Chave: Filogeografia, mtDNA, Morcegos cavernícolas, Espécies crípticas

ABSTRACT

Neotropical bats associated with rock crevices and caves are distributed in varied biomes, ecosystems and discontinued environments across karstic areas. *Furipterus horrens* and *Natalus macrourus* are insectivorous, cave-dweller/rupicolous bats distributed along the Brazilian territory, and currently considered nationally vulnerable to extinction and, hypothetically, both are strongly associated with day shelter. This study consists in species delimitation tests and analysis of evolutionary relationships between Natalids and *Furipterus* species, presenting molecular tests of populational structure and haplogroup distribution based on mtDNA (cytochrome B and COI). These taxa are, hypothetically, strongly dependent of their shelter in karstic areas, which are distributed heterogeneously throughout the neotropics. In order to consider the relationship between lineages or populations, we used Bayesian population structure analysis and molecular variance, besides generating haplotype networks. As a means of testing species delimitation and evolutive boundaries of taxa and lineages, we performed Bayesian and maximum likelihood phylogenetic analysis. *Furipterus horrens* were split into divergent lineages distributed in allopatry and also in sympatry, showing high population structure and low haplotype sharing. Considering Natalids' analysis, *Chilonatalus* was recovered as sister-group of all *Natalus*. *N. tumidirostris* was recovered in parafiletism, in association with *N. mexicanus*. Besides, *N. s. saturatus* was recovered as synonymous of *N. mexicanus*, as shown in previous morphological studies. The population assessments of *Natalus macrourus* indicated a moderate population structure, with some shared haplotypes between geographically distant locations. The values of genetic divergence, phylogenetic and population analysis indicate, a priori, the occurrence of a single species for Brazil. Spatially, was not observed any isolation among the sampled populations. Molecular and diversity variation analysis in *Natalus* and *Furipterus* are pioneering, indicating the demand for this kind of evaluation, specially in taxa under anthropic pressure. The information here presented allows for a better assessment of the preservation status of endangered species, for their conservation and management.

Keywords: Bat phylogeography, mtDNA, cave-dwelling bats, cryptic diversity

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Haplotype network from cytochrome oxidase (COI) and cytochrome b (Cyt *b*) for *Furipterus horrens*. A (pink), single individual from southern South America; cluster B (ink blue), Eastern and Southeastern South America and the Guianas; cluster C (yellow), Eastern Amazonia at the lower-middle Xingu River; cluster D (dark green), Eastern Brazil; cluster E (brown), Eastern Amazonia at the lower-middle Xingu River as in C, and cluster F (light green) Eastern Amazonia.....60
- Figure 2. Evolutionary tree derived from the genus *Furipterus* (Furipteridae) lineage relationships. Lineages recovered are illustrated as colored clades in the tree, and as distributional points in the map, to the right. This final tree is derived from fully supported Bayesian trees generated with 1797 base pairs of the concatenated mtDNA markers COI and Cytochrome b. Clade A, single individual from southern Atlantic forest, mosaic with limestone karst; clade B, Eastern Amazonian Forest, Guiana forests, Southeastern Brazil caatinga in mosaic with semideciduous forests and limestone karst; clade C, lower-middle Xingu river rock outcrops, river margin with forest and arenitic formations, Eastern Brazil; clade D, Eastern Brazil mosaic of Caatinga, forests and limestone caves; clade E, lower-middle Xingu river rock outcrops as in C) and clade F, iron-rich caves in savannah like formations (cangas) from Eastern Amazonian mosaic with Amazonian forests, Pará state, Brazil.61
- Figure 3. Dated evolutionary tree of lineages within genus *Furipterus* (Furipteridae) and estimated divergence times, using a lognormal relaxed molecular clock. The ultrametric tree was derived from Bayesian inference analyses of 1797 base pairs of mitochondrial DNA with two independent fossil calibrations, the Oligocene mormoopid *Koopmanycteris paleomormoops* and the Miocene noctilionid *Noctilio lacrimaelunaris*. The color-coding vertical bars indicate clades recovered by the phylogeny (to the left) and groups recovered by the mPTP species limits tests (to the right).62
- Figura 4. Indivíduo de *Natalus macrourus* (VCT 2662): crânio em vista dorsal e lateral. Escala: 10mm (A) (foto: P. Pilatti), indivíduo capturado na FLONA Carajás (B) (foto: V. Tavares). 74
- Figura 5. Distribuição do gênero *Natalus* na América do Sul (Fonte: IUCN 2018, Rocha et al. 2013, Delgado-Jaramillo et al. 2018).76

Figura 6. Filogenias prévias da família Natalidae. Adaptado de Dávalos 2005 (A) e adaptado de Tejedor 2007 (B).....77

Figura 7. Mapa de distribuição das amostras analisadas nesse estudo. Em vermelho estão as sequencias produzidas e em verde as sequencias obtidas via Genbank. 80

Figura 8. Filogenia da família Natalidae e grupo externo inferida a partir de análises Bayesianas de 1140pb para Cyt B (A) e 657pb de COI. Números na base representam valores de probabilidade posterior (PP) e números após os taxa terminais indicam, a saber: (1) *Chilonatalus macer*, *Chilonatalus micropus* (2) *N. mexicanus* (3) *N. macrourus* (RO), (4) *N. tumidirostris* Venezuela (5) *N. tumidirostris* Trinidad e Venezuela (6) *N. stramineus* (7) *N. macrourus* Nordeste brasileiro, (8) *N. macrourus* FLONA Carajás- Pará, Altamira-Pará, Peruaçu-MG, Chapada Diamantina-BA, Montividiu, GO, (9) *N. major*, (10) *N. mexicanus*, (11) *N. stramineus* Guatemala, (12) *N. saturatus* Nicarágua, (13) *N. tumidirostris* (14) *N. macrourus* (RO), (15) *N. stramineus* Nordeste brasileiro, (16) *N. stramineus* Nordeste brasileiro e (17) *N. macrourus*, demais localidades. 91

Figura 9. Filogenia da família Natalidae e grupo externo inferido a partir de análises Bayesianas baseada em 1797 loci mitocondriais. Números à esquerda da árvore representam valores de probabilidade posterior (PP) e à direita os clados (1) *Chilonatalus macer*, Cuba (2) *Chilonatalus micropus*, República Dominicana (3) *Natalus major*, República Dominicana (4) *Natalus mexicanus*, (5) *Natalus tumidirostris*, Venezuela (6) *Natalus tumidirostris*, Trinidad e Sucre, Venezuela (7) *Natalus stramineus*, Saba (8) *Natalus macrourus*, Brasil..... 92

Figura 10. Resultados dos testes mPTP para delimitação de espécies a partir dos dados concatenados de COI e CitB, para os gêneros *Chilonatalus* e *Natalus*..... 94

Figura 11. Resultado da análise espacial de estruturação genética utilizando os dados concatenados (Cyt B+COI) do gênero *Natalus*. Para *Natalus macrourus*, Go - Goiás, CDIA - Chapada Diamantina, XIN – Xingu, RO – Rondônia, NE – Nordeste, CKS – Carajás..... 97

Figura 12. Rede de haplótipos gerada a partir dos dados de Citocromo B para *Natalus macrourus*: GO, Montividiu, Goiás, CKS (FLONA Carajás, Serra Norte de Sul), NE Nordeste (Rio Grande do Norte e Sergipe), Xingu (Altamira, Baixo e médio Xingu), CDI (Chapada Diamantina), PER, PARNA Cavernas do Peruaçu, RO, Rondônia, rio Madeira..... 98

Figura 13. Rede de haplótipos gerada a partir dos dados de Citocromo Oxidase (COI) para *Natalus macrourus*: GO, Montividiu, Goiás, CKS (FLONA Carajás, Serra Norte de Sul), NE Nordeste (Rio Grande do Norte e Sergipe), Xingu (Altamira, Baixo e médio Xingu), CDI(Chapada Diamantina), PER, PARNA Cavernas do Peruaçu, RO, Rondônia, rio Madeira.
..... 99

Figura 14. Correlograma de mantel mostrando correlação espacial (Correlação de mantel) para os dados concatenados (Cyt B+COI), distribuídos de acordo com as classes de distância, após progressiva correção de Bonferroni ($R=0,504$, $p<0,01$)..... 101

LISTA DE TABELAS

Table 1. Primers used for amplification and/ or sequencing of <i>Furipterus horrens</i>	53
Table 2. Dataset characteristics and best-fitting models of nucleotide substitution.....	54
Tabela 3. Average Kimura 2-parameter distances (%) between the clades of <i>F. horrens</i> based on Cyt <i>b</i> and COI markers.	55
Table 4. Populational parameter estimates for the markers Cytochrome <i>b</i> and COI from <i>Furipterus horrens</i> populations. Groups named as in the clades recovered and network analyses). N = number of individuals sampled, H = number of haplotypes, S = number of polymorphic sites, Hd = haplotypic diversity, π = nucleotide diversity, H = haplotypes, K= average number of pairwise differences.	56
Table 5. F_{ST} values considering Cytochrome <i>b</i> (Cytb) and COI, separately of <i>Furipterus horrens</i> , with significant values in bold. Upper diagonal corresponds to the geographical distance in kilometers.	57
Table 6. Tests of neutrality for combined mitochondrial data. N = number of samples, D= Tajima neutrality test, P significance, Ne expected number of alleles, Fs, Fu's neutrality test.	58
Table 7. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) including haplotypes of populations of <i>Furipterus horrens</i> using and Cyt <i>b</i> and COI data.	59
Tabela 8. Lista de amostras utilizadas, localização e marcadores sequenciados.	81
Tabela 9. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento das espécies do gênero <i>Chilonatalus</i> e <i>Natalus</i> , tamanho da sequência de DNA gerada.	86
Tabela 10. Valores de divergência genética considerando os marcadores Citocromo B e COI entre espécies conforme a taxonomia corrente e de acordo com Kimura 2P. Linhagens: Outgroup (<i>Eumops auripendulus</i>); Chilo: <i>Chilonatalus micropus</i> ; Nmac: <i>Natalus macrourus</i> ; Nmex: <i>N. mexicanus</i> ; Nstr; <i>N. stramineus</i> , Ntum: <i>N. tumidirostris</i>	93
Tabela 11. Lista dos espécimes de <i>Natalus macrourus</i> e respectivos haplótipos identificados.	95

Tabela 12. Testes de neutralidade para os dados mitocondriais concatenados. N= número de amostras, D teste de neutralidade Tajima, P valor de significância, Ne número esperado de alelos, Fs teste de neutralidade Fu	96
Tabela 13. Valores de F_{ST} para os marcadores Citocromo b e COI de <i>Natalus macrourus</i> e distância geográfica em km (diagonal superior).....	96
Tabela 14. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre haplótipos das populações de <i>Natalus macrourus</i> utilizando sequências de Citocromo B e COI.	99
Tabela 15. Valores de divergência genética considerando os marcadores Citocromo B e COI entre as populações de <i>N. macrourus</i> , de acordo com Kimura 2P. Populações: OUT, <i>outgroup</i> (<i>E. auripendulus</i>), CKS&SE (FLONA Carajás e Sudeste), XIN (Pedrais do Baixo e médio Xingu), CDI (Chapada Diamantina), NE (Rio G Norte+Sergipe, RO (Rondônia).	100

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO I.....	28
ALMOST TWO-HUNDRED YEARS OF MONOTYPY AND A POORLY KNOWN LIFE HISTORY: MULTIPLE LINEAGES OF FURIPTERUS (CUVIER, 1828) WERE HIDDEN BY ROCKS.	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUCTION	30
METHODS	31
RESULTS	35
REFERENCES	43
CAPÍTULO II.....	71
FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO <i>NATALUS</i> (CHIROPTERA, NATALIDAE) BASEADA EM DNA MITOCONDRIAL, VARIAÇÕES POPULACIONAIS EM <i>N.</i> <i>MACROURUS</i> E IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO.	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
MATERIAL ANALISADO.....	79
OBTENÇÃO DOS DADOS	86

ANÁLISES.....	87
RESULTADOS	89
ANÁLISES FILOGENÉTICAS	89
ANÁLISES POPULACIONAIS.....	95
DISCUSSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

INTRODUÇÃO GERAL

Morcegos são mamíferos inseridos na ordem Chiroptera e os únicos capazes de realizar voos ativos (Kunz & Fenton 2005, Neuweiler 2000) se constituindo na segunda maior ordem dentro do grupo, com atualmente 1428 espécies e perfazendo cerca de 22% do total de mamíferos atualmente registrados (Burgin et al. 2018, Fenton & Simmons 2014, ASM Database 2020, Paglia et al 2012). Apresentam também hábitos alimentares bem diversificados, podendo ser classificados como nectarívoros, frugívoros, insetívoros, onívoros, folívoros, granívoros, piscívoros e hematófagos (Kunz et al. 2003, Neuweiller 2000).

Devido a essa plasticidade alimentar, estão aptos a ocupar diversos habitats na natureza, oferecendo também importantes serviços ecossistêmicos, atuando como dispersores de sementes e regeneradores de áreas florestais, como reguladores de populações de insetos e de pequenos vertebrados, e estão, por conseguinte, implicados em importantes serviços ecossistêmicos (Boyles et al. 2011, Kunz et al. 2011). Morcegos são também frequentemente encontrados em construções urbanas nas cidades e zonas rurais (Altringham et al. 1996, Kunz et al. 2003).

Em relação aos seus abrigos, morcegos utilizam uma grande gama de ambientes, sendo esse recurso considerado como crucial para esses animais, que passam a maior parte de seus ciclos de vida submetidos a pressões de seleção dos mesmos (Hill & Smith 1984, Kunz 1982, Kunz & Lumsden 2003). Dentre as espécies de morcegos, várias se abrigam em fendas e ocos em rochas, sob folhagens nas copas das árvores, cupinzeiros abandonados e em ambientes rochosos em geral, incluindo pedrais, fendas e cavernas (Kunz & Lumsden 2003, Tavares et al. 2012, Trajano 1996).

Morcegos cavernícolas podem apresentar distintos graus de dependência em relação a esses ambientes, onde algumas espécies apresentam relações oportunísticas com cavidades, como *Carollia persipillata* e *Glossophaga soricina*, o que significa que utilizam comumente, mas não exclusivamente esses ambientes. Outros táxons são mais dependentes de cavernas, considerados como essencialmente cavernícolas ou rupícolas, como *Furipterus horrens*, sendo também registradas ocasionalmente em outros abrigos, como troncos de árvores caídos, enquanto há espécies estritamente cavernícolas, como *Natalus macrourus* e *Lonchorhina aurita* (Guimarães & Ferreira 2015, Kunz 1982, Kunz et al. 2003, Tejedor et al. 2005).

Dentre os benefícios relacionados ao uso de cavidades naturais subterrâneas, ou em abrigos rochosos está a maior estabilidade climática desses ambientes, cujos valores de temperatura e umidade podem permanecer pouco variáveis ao longo das estações (Culver & Pipan 2019, Pipan et al. 2010). Números, ainda subestimados, indicam que mais de 25% das espécies de morcegos que ocorrem no Brasil já foram amostradas no interior de cavernas e que cerca de 30 espécies têm relação estreita com cavidades, contribuindo com a maior parte do aporte de nutrientes para o interior destes ambientes (Bredt et al. 1999, Tavares et al. 2012, Trajano & Gimenez 1998).

A ocorrência de cavidades naturais subterrâneas ao longo do território brasileiro se dá de forma heterogênea, formando aglomerados de cavidades associadas aos afloramentos, circundados por áreas descontínuas sem ocorrências de cavernas (CECAV 2013). A preferência de algumas espécies de morcegos por cavidades, que estão espacialmente dispersas ao longo do território brasileiro, associada à capacidade de voo, pode influenciar a dispersão desses grupos. De forma complementar, sua dispersão pode estar diretamente relacionada aos aspectos morfológicos, como o tamanho corporal e o tamanho e forma das asas (Norberg & Rayner 1987, Pilatti 2011). As limitações de voo impostas por características morfológicas em quirópteros podem, hipoteticamente, influenciar em variações populacionais relacionadas ao fluxo gênico (Meyer et al. 2009, Meyer et al 2016).

Estudos demonstram que, mesmo em escalas pequenas, algumas espécies de morcegos têm distintos padrões de deslocamento (Bernard & Fenton 2003, Trevelin et al. 2013) e de diferenciação gênica, apresentando, em alguns casos, marcada estruturação populacional (Meyer et al. 2008, Ripperger et al. 2013). No caso de populações de morcegos cavernícolas/rupícolas, a forte associação de algumas espécies aos abrigos em rochas, aliada a restrições de deslocamento e dispersão são fatores que podem contribuir para limitações de fluxo gênico, de modo similar ao que ocorre com populações distribuídas em paisagens fragmentadas (Kerth & Petit 2005; Meyer et al. 2008) gerando estruturas populacionais correlacionadas por exemplo com distâncias geográficas (Pereira et al. 2009).

No âmbito das análises de variações intraespecíficas, com o desenvolvimento das técnicas de amplificação e sequenciamento de DNA, a filogeografia emergiu como um ramo que faz a interface entre a Genética, sobretudo a Genética de populações, a História Evolutiva dos táxons e Ecologia (Avise 2000, Edwards & Beerli 2000), considerando a distribuição de haplótipos em contexto geográfico. Dados sobre a filogeografia de morcegos incluindo

marcadores mitocondriais e nucleares vem sendo utilizados de modo crescente nas últimas décadas para estimar aspectos sobre a história evolutiva das linhagens de morcegos, considerando o comportamento social (Kerth et al. 2002, Pereira et al. 2009), biogeografia e variação populacional (Carstens et al. 2004, Clare et al. 2011, Ditchfield 2000, Martins et al. 2009, Meyer et al. 2008, Pavan et al. 2011).

Dentre as espécies de morcegos, as que possuem hábitos migratórios tendem a apresentar maior compartilhamento de haplótipos e baixa diferenciação gênica (McCracken & Gassel 1997, Russel et al. 2005). Já no caso das espécies de morcegos não-migratórios, as taxas de diferenciação gênica são maiores (Ditchfield 2000, Martins et al. 2009, Pavan et al. 2011), sugerindo que a dispersão afete diretamente o fluxo gênico dentro das espécies. Estudos demonstram que a variabilidade gênica em morcegos está associada a fatores como habilidade de dispersão, eventos históricos e comportamentais (Burland et al. 1999, Carstens et al. 2006, Kerth et al. 2002).

O Brasil é um país megadiverso, sendo o segundo país em diversidade de quirópteros do mundo, com pelo menos 182 espécies registradas (Nogueira et al. 2018). Bernard et al. (2011) demonstraram que há muitas lacunas de conhecimento sobre morcegos devido à amostragem heterogênea e problemas taxonômicos. Em estudos testando a ocorrência de complexos de espécies publicados acerca de morcegos da América do Sul, observa-se a limitada, ou a não inclusão nas análises de materiais provenientes do Brasil, de modo que revisões frequentemente negligenciam a amplitude de variação intra-específica que pode ser encontrada em território brasileiro (e.g. Solari et al. 2009, Velazco & Patterson 2014).

Estudos filogeográficos de haplogrupos em território brasileiro demonstraram estruturação populacional em espécies que usam cavernas, com alto grau de dependência, como é o caso de *Lonchorhina aurita*, e espécies que usam, mas não dependem de cavidades, como é o caso de *Desmodus rotundus* (Azevedo 2013, Lopes & Ditchfield 2009) e de *Carollia perspicillata* (Pavan et al. 2011). Esses padrões são encontrados em outros de mamíferos em áreas de Mata Atlântica (Miranda et al. 2008, Moraes-Barros et al. 2006) e sugerem concordância com as proposições de retração e expansão de florestas durante as mudanças climáticas do Pleistoceno (Haffer 1969, Prance & Whitmore 1986).

As espécies de morcegos cavernícola/rupícolas selecionadas para o presente estudo apresentam atualmente *status* de conservação Vulnerável, de acordo com o critério A3, do Ministério do Meio Ambiente (MMA 2014, MMA 2018), ou seja, apresentam declínio populacional pronunciado, estimado para as próximas gerações, em especial devido à supressão sistemática dos ambientes cavernícolas para fins de mineração, seja ela para extração de ferro ou calcário, ou a instalação e operação de hidrelétricas (Tavares et al. In litt.). Ambos os táxons apresentam graus distintos de dependência de ambientes cavernícolas, onde *Furipterus horrens* conta com registros para abrigos não rochosos (ocos de árvores e construções humanas) enquanto *Natalus macrourus* é exclusivamente cavernícola (Tejedor 2011).

Inserido na família Furipteridae, *Furipterus* é um gênero monotípico de morcegos insetívoros pequenos (cerca de 3g) cavernícolas/rupículas facultativos que ocorrem no Brasil, Colômbia, Guiana, Trinidad, Venezuela ao sul do rio Orinoco, Panamá e Costa Rica (Gardner 2008, LaVal 1977). *Furipterus horrens* tem pelos dorsais volumosos e finos, cinza-azulados a ardósia e ventrais mais pálidos, cauda longa, focinho proeminente e sem proeminências em forma de rim (Gardner 2008).

No Brasil, *F. horrens* foi registrado em cavidades de minério de ferro da região de Carajás, e em pedrais no baixo médio rio Xingu norte (ambos no estado do Pará) e em cavidades calcárias no Brasil central, nordeste, sudeste e sul do Brasil (Bredt et al. 1999, Duda et al. 2012, Esbérard et al. 2005, Leal et al. 2014, Novaes et al. 2012, Portella et al 2017). *Furipterus horrens* nunca foi revisado, a despeito de sua ampla distribuição, aparente vulnerabilidade, principalmente devido ao seu diminuto tamanho. Poucos dados moleculares estavam disponíveis para o táxon na porção de sua distribuição brasileira, até o presente estudo. Em realidade, os poucos dados moleculares disponíveis para *Furipterus* se restringiam a Guiana (Clare et al. 2011).

Já os morcegos insetívoros do gênero neotropical *Natalus* são estritamente cavernícolas, pequenos e delicados (comprimento de antebraço: 27-45mm), caracterizando-se por apresentar pernas e caudas longas, com aproximadamente o tamanho do corpo. Possuem orelhas em forma de funil, com olhos pequenos e pelos longos que variam do cinza ao amarelado ao avermelhado, apresentam caixa craniana globosa, pequena crista sagital e rostro estreito e alongado (Gardner 2008, Tejedor 2011).

O gênero foi recentemente revisado de forma robusta para as formas ocorrentes na América Central e Caribe (Tejedor et al. 2005, Tejedor 2007, Tejedor 2011) sendo que *N. macrourus* foi considerado como o táxon ocorrente ao sul do rio Amazonas (Garbino & Tejedor 2013), com base em uma amostragem que não inclui a extensão de ocorrência nesta região e possíveis variações. No Brasil, *Natalus macrourus* ocorre na região norte, nordeste, sudeste e centro-oeste, sendo encontrado nos sistemas ferríferos no estado do Pará, em áreas de calcário e em pedrais associados a cachoeiras no Xingu central (Bredt et al. 1999, Esbérard et al. 2005, Tavares 2012) e não havia dados moleculares disponíveis para o táxon, até o presente estudo. O teste do *status* das populações de *Natalus macrourus* ocorrentes no Brasil é particularmente relevante dado o cenário de exploração de ambientes cársticos nesse país, ao qual a espécie está intimamente associada.

Em resumo, esse trabalho conta principalmente com testes de delimitação de espécies e relações evolutivas dos gêneros *Natalus* e *Furipterus* e testes moleculares de estruturação gênica e distribuição de haplogrupos, com base em dados mitocondriais; desses táxons em princípio dependentes, ou fortemente associadas a conglomerados cársticos, os quais distribuídos de modo heterogêneo ao longo dos neotrópicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altringham, J. D., Hammond, L., & McOwat, T. (1996). *Bats: biology and behaviour* (Vol. 3). Oxford: Oxford university press.
- American Society of Mammalogist Database (2020)
<https://www.mammaldiversity.org/index.html>. Acesso em: 20/10/2019
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Azevedo, M. S. (2013). *Filogeografia Intraespecífica de Lonchorhina aurita (Chiroptera, Phyllostomidae)* (Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo).
- Bernard, E., & Fenton, M. B. (2003). Bat mobility and roosts in a fragmented landscape in central Amazonia, Brazil. *Biotropica*, 35(2), 262-277.
- Bernard, E., Aguiar, L. M., & Machado, R. B. (2011). Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries?. *Mammal Review*, 41(1), 23-39.
- Boyles, J. G., Cryan, P. M., McCracken, G. F., & Kunz, T. H. (2011). Economic importance of bats in agriculture. *Science*, 332(6025), 41-42.
- Bredt, A., Uieda, W., & Magalhães, E. D. (1999). Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia*, 731-770.
- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there?. *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1-14.
- Burland, T. M., Barratt, E. M., Beaumont, M. A., & Racey, P. A. (1999). Population genetic structure and gene flow in a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1422), 975-980.
- Carstens, B. C., Sullivan, J., Davalos, L. M., Larsen, P. A., & Pedersen, S. C. (2004). Exploring population genetic structure in three species of Lesser Antillean bats. *Molecular Ecology*, 13(9), 2557-2566.
- Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas CECAV – CANIE.
 <<<http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>>> Acessado em 07/05/2019.

- Clare, E. L., Lim, B. K., Fenton, M. B., & Hebert, P. D. (2011). Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *PloS One*, 6(7), e22648.
- Culver, D. C., & Pipan, T. (2019). *The biology of caves and other subterranean habitats*. Oxford University Press.
- Ditchfield, A. D. (2000). The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*, 9(9), 1307-1318.
- Duda, R., Dalapicolla, J., & Costa, L. P. (2012). First record of the smoky bat *Furipterus horrens* (F. Cuvier, 1828) (Mammalia: Chiroptera) in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Check List*, 8(6), 1362-1364.
- Edwards, S., & Beerli, P. (2000). Perspective: Gene Divergence, Population Divergence, and the Variance in Coalescence Time in Phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6), 1839-1854.
- Esbérard, C. E., Motta, J. A., & Perigo, C. (2005). Morcegos cavernícolas da Área de Proteção Ambiental (APA) Nascentes do Rio Vermelho, Goiás. *Revista Brasileira de Zoociências*, 7(2).
- Fenton, M. B., & Simmons, N. B. (2014). *Bats: A World of Science and Mystery*. University of Chicago Press.
- Garbino, G. S., & Tejedor, A. (2013). *Natalus macrourus* (Gervais, 1856)(Chiroptera: Natalidae) is a senior synonym of *Natalus espiritosantensis* (Ruschi, 1951).
- Gardner, A. L. (Ed.). (2008). *Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats* (Vol. 2). University of Chicago Press.
- Guimarães, M. M., & Ferreira, R. L. (2015). Morcegos cavernícolas do Brasil: Novos registros e desafios para conservação. *Revista Brasileira de Espeleologia*, 2(4), 1-33.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165(3889), 131-137.
- Hill, J. E., & Smith, J. D. (1984). *Bats: a natural history*.

- Kerth, G., Mayer, F., & Petit, E. (2002). Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology*, 11(8), 1491-1498.
- Kerth, G., & Petit, E. (2005). Colonization and dispersal in a social species, the Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology*, 14(13), 3943-3950.
- Kunz, T. H. (1982). Roosting ecology of bats. In *Ecology of bats* (pp. 1-55). Springer, Boston, MA.
- Kunz, T. H., & Fenton, M. B. (Eds.). (2005). *Bat ecology*. University of Chicago Press.
- Kunz, T. H., Lumsden, L. F., & Fenton, M. B. (2003). Ecology of cavity and foliage roosting bats. *Bat ecology*, 1, 3-89.
- Kunz, T. H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 1-38.
- LaVal, R. K. (1977). Notes on some Costa Rican bats. *Apuntes sobre algunos murciélagos Costarricenses*. Brenesia., (10/11), 77-83.
- Leal, E. S. B., Gomes-Silva, F. F., Lira, T. C., Prado Neto, J. G., & Passos Filho, P. B. (2014). Occurrence of *Furipterus horrens* (F. Cuvier, 1828) (Chiroptera: Furipteridae) in the state of Paraíba and update of the distribution of the species in Brazil. *Chiroptera Neotropical*, 20(20), 1280-1287.
- Lopes, S. R., & Ditchfield, A. D. (2009). Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical*, 15(1), 450-455.
- Martins, F. M., Templeton, A. R., Pavan, A. C., Kohlbach, B. C., & Morgante, J. S. (2009). Phylogeography of the Common Vampire Bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 294.
- McCracken, G. F., & Gassel, M. F. (1997). Genetic structure in migratory and nonmigratory populations of Brazilian free-tailed bats. *Journal of Mammalogy*, 78(2), 348-357. *Conservation*, 88(3), 333-345.

- Meyer, C. F., & Kalko, E. K. (2008). Bat assemblages on Neotropical land-bridge islands: nested subsets and null model analyses of species co-occurrence patterns. *Diversity and Distributions*, 14(4), 644-654.
- Meyer, C. F., Struebig, M. J., & Willig, M. R. (2016). Responses of tropical bats to habitat fragmentation, logging, and deforestation. In *Bats in the anthropocene: Conservation of bats in a changing world* (pp. 63-103). Springer, Cham.
- Ministério do Meio Ambiente (2014). Portaria Nº 444 de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção.
- Ministério do Meio Ambiente (2018) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. Volume II: Mamíferos. 625p.
- Miranda, G. B., Oliveira, L. F., Andrades-Miranda, J., Langguth, A., Callegari-Jacques, S. M., & Mattevi, M. S. (2008). Phylogenetic and phylogeographic patterns in sigmodontine rodents of the genus *Oligoryzomys*. *Journal of Heredity*, 100(3), 309-321.
- Moraes-Barros, N., Silva, J. A., Miyaki, C. Y., & Morgante, J. S. (2006). Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genetica*, 126(1-2), 189-198.
- Neuweiler, G. (2000). *The biology of bats*. Oxford University Press.
- Nogueira M.R., I.P. Lima, G.S.T. Garbino, R. Moratelli, V.C. Tavares, R. Gregorin, and A.L. Peracchi. 2018. Updated checklist of Brazilian bats: version 2018.1. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq). <<http://www.sbeq.net/updatelist>>accessed in: 20/07/2019
- Norberg, U. M., & Rayner, J. M. (1987). Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 316(1179), 335-427.
- Novaes, R. L. M., de França Souza, R., Felix, S., Sauwen, C., Jacob, G., & dos Santos Avilla, L. (2012). New record of *Furipterus horrens* (Cuvier, 1828)(Mammalia, Chiroptera)

- from the Cerrado of Tocantins state with a compilation of the known distribution within Brazil. *Check List*, 8(6), 1359-1361.
- Paglia, A. P., Da Fonseca, G. A., Rylands, A. B., Herrmann, G., Aguiar, L. M., Chiarello, A. G., ... & Mendes, S. L. (2012). Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. *Occasional papers in conservation biology*, 6, 1-82.
- Pavan, A. C., Martins, F., Santos, F. R., Ditchfield, A., & Redondo, R. A. (2011). Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102(3), 527-539.
- Pereira, M. J., Salgueiro, P., Rodrigues, L., Coelho, M. M., & Palmeirim, J. M. (2009). Population structure of a cave-dwelling bat, *Miniopterus schreibersii*: does it reflect history and social organization?. *Journal of Heredity*, 100(5), 533-544.
- Pilatti, P. (2011). Ecomorfologia e diversificação morfológica nas órbitas e escápulas em morcegos neotropicais (Master's thesis, Universidade Federal da Paraíba).
- Pipan, T., Lopez, H., Oromi, P., Polak, S., & Culver, D. C. (2010). Temperature variation and the presence of troglobionts in terrestrial shallow subterranean habitats. *Journal of Natural History*, 45(3-4), 253-273.
- Portella, T. P., Kaku-Oliveira, N. Y., de S Barros, J., & Sessegolo, G. C. (2017). First record of the Vulnerable bat *Furipterus horrens* (Cuvier, 1828)(Chiroptera: Furipteridae) in the state of Paraná, southern Brazil. *Check List*, 13, 127.
- Prance, G. T., & Whitmore, T. C. (Eds.). (1986). *Biogeography and Quaternary history in tropical America*. Clarendon Press.
- Ripperger, S. P., Tschapka, M., Kalko, E. K., Rodriguez-Herrera, B., & Mayer, F. (2013). Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conservation Genetics*, 14, 925-934.
- Russell, A. L., Medellín, R. A., & McCracken, G. F. (2005). Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology*, 14(7), 2207-2222.

- Solari, S., Hoofer, S. R., Larsen, P. A., Brown, A. D., Bull, R. J., Guerrero, J. A., ... & Baker, R. J. (2009). Operational criteria for genetically defined species: analysis of the diversification of the small fruit-eating bats, *Dermanura* (Phyllostomidae: Stenodermatinae). *Acta Chiropterologica*, 11(2), 279-288.
- Tavares, V. D. C., Palmuti, C. F. D. S., Gregorin, R., & Dornas, E. T. T. (2012). Morcegos. *Estudos sobre Vertebrados Terrestres*, 156p.
- Tejedor, A., Tavares, V. D. C., & Silva-Taboada, G. (2005). A revision of extant Greater Antillean bats of the genus *Natalus*. *American Museum Novitates*, 2005(3493), 1-22.
- Tejedor, A. (2005). The type locality of *Natalus stramineus* (Chiroptera: Natalidae): implications for the taxonomy and biogeography of the genus *Natalus*. *Acta Chiropterologica*, 8(2), 361-380.
- Tejedor, A. (2007). Systematics and phylogeny of the New World bat family Natalidae (Doctoral dissertation, City University of New York).
- Tejedor, A. (2011). Systematics of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2011(353), 1-140.
- Trajano, E. (1996). Movements of cave bats in southeastern Brazil, with emphasis on the population ecology of the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera). *Biotropica*, 121-129.
- Trajano, E., & Gimenez, E. E. (1998). Bat community in a cave from eastern Brazil, including a new record of *Lionycteris* (Phyllostomidae, Glossophaginae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 33(2), 69-75.
- Trevelin, L. C., Silveira, M., Port-Carvalho, M., Homem, D. H., & Cruz-Neto, A. P. (2013). Use of space by frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a restored Atlantic forest fragment in Brazil. *Forest Ecology and Management*, 291, 136-143.
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2014). Two new species of yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* Gray, 1842 (Chiroptera, Phyllostomidae) from Costa Rica, Panama and western Ecuador. *ZooKeys*, (402), 43.

CAPÍTULO I

Almost two-hundred years of monotypy and a poorly known life history: multiple lineages of *furipterus* (cuvier, 1828) were hidden by rocks.

Carla C. Nobre^{1*}, Ligiane M. Moras^{2*}, Santelmo S. Vasconcellos², Érica M. Silva³, Guilherme S.T. Garbino⁴, Fabrício Santos⁵, Guilherme Oliveira², Valéria da C. Tavares^{2, 6*}

¹ Pós-graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, (Minas Gerais), Brazil.

² Instituto Tecnológico Vale, Belém, (Pará), Brazil.

³

⁴ Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, (Minas Gerais), Brazil.

⁵ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, (Minas Gerais), Brazil.

⁶ Laboratório de Mamíferos, Departamento de Sistemática e Ecologia, CCEN/DSE, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, (Paraíba), Brazil.

⁷ Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brazil.

E-mail: val.c.tavares@gmail.com (**corresponding author)

*These authors contributed equally to this work.

Short title: *Multiple lineages recognized within *Furipterus horrens**

ABSTRACT

The thumbless bat *Furipterus horrens* is a tiny and delicate insectivorous bat from the family Furipteridae, which is composed by two monotypic genus including the nominal *Furipterus*, widely distributed in the Neotropics and *Amorphochilus*, confined to rocky formations from the Pacific coast of South America. Natural history information for the two furipterid species is scarce and their diversity has been documented by few museum specimens. *Furipterus* has virtually never undergone systematic revisions, with the single exception of the middle XIX century description of *F. caeruleus* Tomes, 1856. Likewise, there has virtually been no assessment of the genetic diversity within the species. We herein describe patterns of distribution and roost use for this species departing from our collected material during roost surveys conducted in cave roosts and other rocky roosts from South America over the last 20 years and, associated to that we tested for genetic variation within *F. horrens* based on our original data including the mitochondrial complete cytochrome-b gene and the standard Barcode region of mitochondrial DNA Cytochrome C Oxidase subunit I (COI). Our prediction was to find structured populations in distinct levels of isolation associated to the naturally patchy distribution of these roosts. Phylogenetic analyses recovered well-supported clades coincident with the haplotype clusters recovered in the network analyses, and species limits tests split the individuals in several lineages, suggesting from five to eight putative species, instead of one. Our data demonstrate that the species is abundant in caves and rock outcrops from Eastern South America and distributed in highly divergent populations. Our data indicate the occurrence of well-structured populations constituting highly divergent lineages, with low occurrence of haplotype sharing. The lineages recovered were mostly allopatric along South America, except in the case of two sympatric lineages from the low-medium Xingu River. Based on the apparently discontinuous distribution found for *Furipterus* in South America we hypothesized past metapopulational arrangements composed of spatially structured populations with different degrees of isolation and restricted that could have compromised the gene flow. *Furipterus horrens* as up to now recognized is composed by highly divergent populations probably containing more than one species, a diversity that remained virtually overlooked for over two centuries. This new data has conservation implications, as some of the unique, newly recognized lineages of *F. horrens* may be circumscribed to small distribution extents, inhabiting rocky formations in riverbeds or caves close to pressures from anthropogenic activities.

Keywords: Thumbless-bat, genetic variation, species delimitation, cave bats, tree roost.

INTRODUCTION

The intensification of the revisionary works on Neotropical bat taxonomy including the examination of recently collected material provided evidence to better understand the taxonomic contents of most Neotropical bat families (E.g. Emballonuridae, Lim et al. 2010; Phyllostomidae, Velazco & Patterson 2008, Velazco & Patterson 2014, Nogueira et al. 2012, Tavares et al. 2014; Garbino et al. 2020; Mormoopidae, Pavan et al., 2013; Thyropteridae, Gregorin et al. 2006; Natalidae, Tejedor 2011; Molossidae, Moras et al. 2016; Vespertilionidae, Moratelli & Wilson 2014) to the exception of the bats from family Furipteridae. The family Furipteridae is composed by two tiny Neotropical insectivorous bats belonging to two monotypic genera, *Amorphochilus* Peters, 1877 and *Furipterus* Bonaparte, 1837. *Furipterus* have virtually never undergone revisionary studies, with the single exception of the description of *Furipterus caeruleus* Tomes, 1856 with the type locality “Santa Catarina” a state from Southern Brazil, presently a junior synonym of *F. horrens* (Cuvier, 1828). Likewise, the few molecular data up to now available of *Furipterus* has only appeared in broad, general mitochondrial COI variation analyses circumscribed to the standard barcoding marker for bats (Clare et al. 2011) and in tests on the phylogenetic position of Furipteridae within Chiroptera (Teeling et al. 2005, Rojas et al. 2016, Amador et al. 2018).

Furipterids are overall poorly documented by records and museum specimens along their distribution. *Amorphochilus schnabli* Peters, 1877 is restricted to western South America, in the xerophytic Pacific coast of Ecuador, Peru, and Northern Chile (Cabrera 1958, Gardner 2008). On the other hand, *Furipterus horrens* (Cuvier, 1828) has a broader distribution, occurring in Central America (Nicaragua, Costa Rica and Panama, Handley, 1966, Medina-Fitoria et al. 2015, Alfaro-Lara et al. 2019) and in South America, with records from Colombia, Venezuela, Trinidad, Guyana, French Guiana, Suriname, Peru, Ecuador, northern Bolivia and Brazil (Handley 1976, Tavares et al. 2010, Clare et al. 2011, Tavares et al. 2012, Leal et al. 2014, Portela et al. 2017; Arroyo-Cabrales, 2019). Natural history data for furipterids is scarcely reported in the literature (e.g. Laval 1977, Uieda et al. 1980).

Furipterus horrens is a tiny and delicate bat reported to usually form small groups to large colonies reaching up to 250 individuals (2 to 5 g weight and 33 – 41 mm forearm; La Val 1977, Uieda et al. 1980, Arroyo-Cabrales, 2019). This species has been recorded roosting buildings, tunnels, among boulders, hollow logs and within or under fallen trunks (Simmons

and Voss, 1998; Arroyo-Cabrales, 2019) and it is associated with rocky roosts in Eastern Brazil within South America (Guimarães & Ferreira 2015, Leal et al. 2014, Portela et al. 2017, Tavares et al. 2010, Tavares et al. 2012). It was long considered one of the rarest neotropical bats in the world (Handley 1976, Uieda et al. 1980, Bredt et al. 1999, Guimarães & Ferreira 2015, Novaes et al. 2012, Tavares et al. 2012). On the other hand it may be considered abundant in cave complexes in Brazil (Arroyo-Cabrales 2019).

Roost dependence combined to constraints to the movements of the bats and to their dispersal can contribute to restrictions to the gene flow among their populations similarly as for species distributed in fragmented landscapes (Kerth & Petit 2005, Meyer et al. 2008). We herein hypothesize that the dispersal capacity of *F. horrens* is limited based on its apparently discontinuous distribution in Eastern South America, related to its rocky roost-association (LaVal 1977, Uieda et al. 1980). Based on that, we predicted an impoverished connectivity for the populations of *F. horrens* populations and restricted gene flow. We herein studied the genetic diversity of *Furipterus horrens* throughout its South American distribution, aiming to identifying populations and test for structure patterns using DNA mitochondrial data. We also investigate historical patterns for the lineages detected and propose investigative lines to resolve the taxonomy of this taxon based on our initial findings.

METHODS

Taxon sampling

We obtained tissue samples deposited in the collections of the Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná; Universidade Federal de Lavras (CMUFLA), Lavras, Minas Gerais; Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)), Belo Horizonte, Minas Gerais; Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba; Universidade Federal de Pernambuco, Recife (UFPE); Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)), Belém, Pará and from the Instituto de Pesquisa Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA). From this material we obtained 50 original Cytochrome B and COI DNA sequence data, from 50 specimens of *Furipterus horrens* distributed in the Eastern Amazonian forests and cangas (iron rich savannah like habitats from Eastern Amazon), from the Brazilian caatinga of eastern South America, Northeastern Brazil, from the Atlantic Forest sites including locations in the South-

Southeastern Brazil south to Paraná state in Brazil, summing up to 14 Brazilian localities. We added eight sequences available in GenBank from six additional localities in Northwestern Amazonia (Ecuador), and from the Guiana shield including localities in Guyana, and Suriname.

Sampling sites included karstic areas inserted in iron-rich lithologies, siliciclastic and, sandstone lithologies the Amazonian Eastern South America (e.g. rock crevices along river Xingu), and limestone caves in anthropic areas in the Northeastern, Southeastern and Southern Brazil (Supplementary information – Table 1). The complete collecting localities and their geographical coordinates are listed in the supplementary files together with the associated tissue collection, GenBank accession numbers, and base-pair length are listed in the Supplementary Information (Table S1). We included the species *Noctilio albiventris* Desmarest, 1818 to serve as outgroup in our analyzes as a representative of the Noctilionidae, which is sister to Furipteridae according to a recent phylogeny for Yangochiropteran bats (Amador et al. 2018).

A large part of the bats included in our study was sampled during fieldwork conducted in the Lower-Medium River Xingu, and in the Floresta Nacional of Carajás, eastern Amazônia by VCT, with the help of hand nets inside the bat roosts, and mist-nets. We provide descriptions of these roosts in a section dedicated to remarks in Natural History.

Extraction, amplification and DNA sequencing

Most genomic DNA was extracted from liver or wing puncture samples stored in ethanol using DNeasy® extraction kits (Qiagen®). We amplified two mitochondrial genes, Cytochrome *b* (Cyt *b*–1140 bp) and Cytochrome oxidase (COI–657 bp). All amplifications were obtained in reactions containing between 40–60 ng of DNA, 1.5 U of Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1x Platinum Taq PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs set (Invitrogen®) and 0.3 µM of each primer. The amplification and DNA sequencing protocols follow Moras et al. (2016) using the primers described in Table 1, with temperatures adjusted to 44°C for annealing. The readings obtained from chromatograms obtained were assembled, edited, and checked for quality using Geneious 8.1.6. The sequences were aligned using the Muscle algorithm (Edgar 2004) as implemented in MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) and checked by codon translation. Pairwise genetic distances between pairs of lineages were calculated for the the Cytochrome B and the COI datasets using the Kimura 2-parameter substitution model (Kumar et al. 2016).

Part of the material was sequenced in the facilities of Instituto Tecnológico Vale with similar standard protocols as described.

Data analysis

Genetic variation, and population analyses

Population analyses were performed considering each marker separately and using the Arlequin 3.5 software (Excoffier & Lischer, 2010). Haplotype networks were generated using the median-joining algorithm (Bandelt et al. 1999) as implemented in the Haplotype viewer software (Ewing 2016).

The population parameters estimated were the sample size (N), the number of individuals in each group, or lineage; the number of haplotypes (H), the number of individuals in the same population with different DNA sequences; the Haplotype diversity (Hd), the probability that, given two sequences, these are different in a population; the Number of polymorphic sites (S), variations in mutation positions; the Nucleotide diversity (π), average number of nucleotide differences per site between sequences and; the Average number of nucleotide differences (mutations) pairwise (K).

To estimate the molecular diversity within and between populations, we calculate F_{ST} values, and to test for neutrality we used Tajima's D test (1989) and Fu's F test (1997), performed in the DNAsp software (Librado & Rozas 2009). We run Exact tests and analyses of molecular variance (AMOVA, Excoffier & Lischer 2010) to evaluate genetic structure in populations of *Furipterus horrens* using Arlequin 3.5 software (Excoffier & Lischer, 2010). We performed spatial analyses of molecular variance using the SAMOVA 1.0 software (Dupanloup et al. 2002). Mantel tests were used by estimating the Monmonier algorithm as implemented in the Alleles in Space software (Miller 2005).

Phylogenetic analysis and Time-divergence estimations

We used PartitionFinder2 (Lanfear et al. 2016) to estimate the best-fit partitioning schemes and the nucleotide substitution models using the Bayesian information criterion (BIC).

We subsequently run Bayesian analyses to estimate phylogenetic relationships for *F. horrens* and *Noctilio albiventris* with the software MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) using the CIPRES portal. We used the the log-likelihood (lnL) plots as provided by the software Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2014) and run four simultaneous Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (one cold and three heated) for 20 million generations, sampling at every 2000 generations, and a burn-in of 10%. The genetic distances between the clades recovered in phylogenetic analysis were estimated using the Kimura 2- parameters model (K2P, Kimura 1980) as implemented in MEGA7.0 software (Tamura et al. 2013).

To obtain an ultrametric tree and be able to estimate the divergence times within *Furipterus*, we conducted a Bayesian inference analysis, using a lognormal relaxed molecular clock. As there are not known fossil furipterids we used two Noctilionoidea fossil species (one Mormoopidae and one Noctilionidae) as independent calibration points. The Oligocene mormoopid *Koopmanycteris paleomormoops* (Morgan, Czaplewski & Simmons, 2019) was used to constrain the *Mormoops megalophylla* + *Pteronotus rubiginosus* clade (lognormal prior, mean = 31, standard deviation = 0.01, offset = 0.1). The Miocene *Noctilio lacrimaelunaris* (Czaplewski 1996) was used to calibrate the split between *Noctilio albiventris* and *N. leporinus* (lognormal prior, mean = 3 standard deviation = 0.5, offset = 1).

The Birth Death Model was chosen as the tree diversification prior. We ran two MCMC chains for 30,000,000 generations each, sampling at every 3000 generations. The tree files obtained were combined with the help of Logcombiner v. 1.8.3. We cautionary did the exercise of excluding and including the sample from Paraná, Southern Brazil (AMB01) specifically of the analyzes to generate the resulting dated tree, because this is a unique record for this locality. For our discussion we only considered the dated resulting tree without the southern Brazil representative of *Furipterus*, until we can collect more samples also because when performing the analysis including this southern Brazilian individual we recovered a very ancient divergence-time for *Furipterus* (~30 Myr) and that needs more corroboration with collection locality sample replicates.

Species delimitation

We tested for putative species lineages based on the combined dataset (Cytochrome b + COI) using the Multi-rate Poisson Tree Process (mPTP) algorithm as implemented in Kapli et al. (2017), and using a tree estimated in MrBayes based on unique haplotypes (58 terminals). To infer the support of the delimitation we performed MCMC analysis with 1,000,000 generations.

RESULTS

Population Analyses

We identified 27 haplotypes within *F. horrens* populations considering the Cytochrome b marker, and 25 haplotypes considering the COI marker, distributed in six groups, with little haplotype sharing between localities. The list of haplotypes for each marker is presented in the Supplementary Information (Table S2) and the haplotype network is represented in the Figure 1.

The haplotype A (color blue in the figure 1) is a single individual from southern Atlantic Forest, an area arranged in mosaic with limestone karst. The haplotype group B is formed by haplotypes from the Eastern Amazonian Forest, from the Guiana forests, and from the Southeastern Brazil mosaics of semideciduous forests, caatinga and limestone karst. The haplogroup C is from Eastern South America, Northeastern Brazil mosaics of Caatinga and limestone karst, the haplogroups D and E are from the lower-middle Xingu River rock outcrops from the Eastern Brazilian Amazon, where the river margins are populated with Amazonian Forest and arenitic formations, and the haplogroup F comes from the iron-rich caves in savannah like formations (cangas) from Eastern Amazonian forests.

The haplogroups C, D and F form a cluster considering the Cytochrome B data and the haplogroups C and F form a cluster considering the Cytochrome oxidase (COI) data. One haplotype (VCT 5708) comes from a close location to those of haplogroup F, and it is more closely related to the “forested” haplotypes from group B; this haplotype is from northern, tall forests of the Carajás mosaic, and the animal was captured in a mist-net out in the forest. The

haplogroups D and E are from close localities in the Xingu River but are set apart according to the network analysis of haplotypes (Fig. 1).

The haplotype network for Cytochrome *b* lacks a central haplotype and the hypothetical haplotype generated as a mean vector is shared by clusters D, E and F. The high accumulation of mutations observed in the individual from southern Brazil (Haplotype A) places it as the most divergent in all analysis. The clusters B and F had the highest haplotype diversity. In contrast, group C had the lowest values of haplotype diversity with five individuals sharing two haplotypes (Table 4).

FST values estimated for each group indicate significant differences between populations (Table 5). All the parameters point to a populational structure for the lineages recovered and Fu's negative results for the Carajás populations suggest a demographic expansion. Parameter estimates were limited by the low number of individuals in each lineage but overall suggest a distribution for the lineages similar to as we recovered by our phylogenetic tree (Figs. 2 and 3; tables 5, 6, and 7). The outputs from the molecular variance analyses (AMOVA) demonstrate a higher variation between groups (Cyt *b* 52%, COI 69%) than within groups (Cyt *b* 14%, COI 22%). Mantel tests shows weak correlations between the geographic and genetic distance in these populations ($r=0.55$; $p>0.05$).

Phylogenetic analysis and Time-divergence estimations

Best-fitting models of sequence evolution of each gene and partitions are summarized in Table 2. Bayesian inference recovered six fully supported lineages of *F. horrens* (Fig. 2), each lineage with similar contents as the resulting haplogroups recovered in the population analyzes (Fig. 2 and tables). Lineage A is a single individual from southern South America, clade B is formed by individuals from the Eastern Amazon, the Guianas and Southeastern Brazil, clade C is composed by individuals from a lower medium Xingu River series, and the clade D by individuals from northeastern Brazil and, E by another lower medium Xingu river series and F includes individuals from the Carajás mosaic in southeastern Amazonia (Figs. 2 and 3).

The clades C, D and F form a cluster considering the Cytochrome B data and the haplogroups C and F form a cluster considering the Cytochrome oxidase (COI) data. One

haplotype (VCT 5708) comes from a close location to those of haplogroup F, and it is more closely related to the “forested” haplotypes from group B; this haplotype is from northern, tall forests of the Carajás mosaic, and the animal was captured in a mist-net out in the forest. The haplogroups D and E are from close localities in the Xingu River but are set apart according to the network analysis of haplotypes (Fig. 1).

Clade B has representatives demonstrating a widespread distribution in South America and it is sister to an unnamed clade containing Eastern South American clades C, D, E, and F. Within this E South America clade, the clade C, containing individuals from the rock outcrops of the Xingu River, is sister to a large clade a triade of clades apparently more closely related among them, with representatives of this same location (rock outcrops of Xingu River), from the Carajás mosaic (Eastern Amazonia iron caves) and from limestone caves of Northeastern Brazil.

The genetic distance between the clades of *Furipterus* varied from 1.6% (clade E vs. clade F) to 19% (clade A vs. clade C) for Cyt *b*, and 1.2% (clade E vs. clade F) to 22% (clade A vs. clade E) for COI (Table 3). It should be highlighted that the divergence between the sympatric lineages from the lower-medium Xingu river (clades C and E) was 8.5% for Cyt *b* and 10.2% for COI. The genetic distance within the lineages varied from 0.1 % (clade C) to 2.9 % (clade B) for Cyt *b*, and 0.1 % (clade C) to 2.1% (clade B) for COI (Table 3).

Our clock analysis (Fig. 2) estimated an ancient divergence for *Furipterus* in the middle Miocene, at 12.6 Myr, and the first internal divergence in the taxa was estimated to occur in the late Miocene, at 8.6 Myr (Fig. 2).

Species delimitation

The mPTP species delimitation tests pointed to eight putative species from the data set suggesting a possible species complex contained in the taxon currently recognized as *Furipterus horrens* (Fig. 2). These putative species correspond to the six clades obtained in the phylogenetic analysis with the addition of two lineages splitted from the clades B and D (Fig. 2).

DISCUSSION

Our populational, evolutionary and species limits analyses of *Furipterus* (Furipteridae) representatives from several localities along the original distribution of *Furipterus horrens* shows that this species, as currently known is a composite of at least six lineages, and with four of them well separated and much divergent. This includes the lineage represented by a single individual from southern South America, the widespread clade including individuals from Atlantic, Amazon forests and the caatinga, and a series from the lower medium rio Xingu and a Eastern Amazon/Northeastern Brazil clade. The high divergences between four lineages exceeds by far the thresholds suggested by Bradley & Baker (2001) for intraspecific variation of mammals.

The population analyses pointed out to well-structured populations with low haplotypes sharing along the South American distribution of *F. horrens* nearly corresponding to the clades obtained in our phylogenetic tree. Clare et al. (2011) showed relatively high within population variation divergences within *Furipterus* populations from Guyana (2.5 – 4.6 %). The fixation rates suggest low gene flow between the populations analyzed with values compatible with isolation between the lineages, except for the Eastern Amazon populations including series of individuals from the lower-middle Xingu river and from the Carajás mosaic, in southeastern Amazonia. Nonetheless the largely sampled Amazonian populations of *Furipterus* had relatively high haplotype diversity and increasing sampling overall may unveil a more comprehensive map of haplotype diversity (Smith and Klica 2013, Hung et al. 2016).

Fu's neutrality test output may indicate population expansions of the Eastern Amazonian populations (Pritchard et al. 2000, Wakeley 2003, Wakeley 2009). This pattern of recent expansion has been suggested for other bat species widely distributed in the Neotropics such as *Carollia perspicillata* (Pavan et al. 2011), *Noctilio leporinus* (Pavan et al. 2013) and *Glossophaga soricina* (Dias et al. 2017, Hoffman & Baker 2001).

Recurrently, more recent studies considering a broader sampling of individuals and molecular data from most of the distributional range of taxa have helped to uncover divergent Neotropical bat taxa with similar morphologies (e.g. Martins et al. 2007; Lopes et al. 2009; Larsen et al. 2010; Azevedo 2013; Ferreira et al. 2014; Pavan et al., 2016; Dias et al. 2017; Moras et al. 2018). Part of this variation shown by genetic data has been tested by re-examination of morphological evidence, as in the case of molossids (Medina et al. 2014,

Gregorin et al. 2016, Moras et al. 2016, Loureiro et al. 2018, Moras et al. 2018), natalids (Tejedor 2011) and for several phyllostomid bats (e.g., Velazco & Paterson 2008, Velazco et al. 2010, Tavares et al. 2022, Velazco & Lim 2014) and resulted in revisionary taxonomy including considerably genus content changes and shifts in the understanding of diversification patterns. We have herein gathered evidence to genetic structuring, considering the Eastern Brazilian *Furipterus* and strong evidence pointing to a complex of species for the genus *Furipterus*. As the lineages superficially appear morphologically similar, our findings, , could up front be characterized as “cryptic” diversity, a relatively common phenomenon among Metazoa that should not be negligented (Trontelj & Fišer 2010) but this needs a further comprehensive morphological examination.

The middle Miocene time-divergence found for *Furipterus* supports a South American origin for Furipteridae and a colonization and perhaps initial diversification at its Pacific slope during the Miocene, prior to the uplift of a substantial part of the Andean chains (Arroyo-Cabrales, 2019). A first, upper Miocene split appears to have occurred between the oldest represented clade, which is a complex of lineages overall associated to open landscapes in mosaic with specific kinds of roosting sites (iron-rich cangas and iron caves, savannah-like caatingas and limestone caves and riverbed outcrops in clear water riverbeds) from the lineages associated to predominantly forested habitats and limestone caves widely distributed (Guiana, the Southeastern Atlantic Forest and caatinga mosaics, and the Eastern Amazonian forests).

Bats from the sister genus *Amorphochilus* occur mostly in open spaces, in deserts of the West South American pacific coast, although there are some records in forests, and occupy culverts and caves (Arroyo-Cabrales, 2019). Roosting modes and roost distribution appears to be a crucial element to understanding the evolution of the genus *Furipterus* and likely, of the family and for that reason understanding the evolutionary tree of Furipteridae, including *Amorphochilus*, appears to be key. Based on our analyzes and dated tree, which is the first attempt to understand the time and patterns of diversification of *Furipterus*, in the currently known habits of *Furipterus* and in the herein mapped distribution of lineages, we hypothesize that *Furipterus* expanded its populations in the past across open landscapes and drylands, and secondarily occupied forested environments. Those “forest” lineages may perhaps have developed strategies to occupy alternative available roosts other than rocks and caves, such as fallen tree trunks as currently described in the literature (Simmons and Voss, 1998; Arroyo-Cabrales, 2019).

Apparently, there are no physical barriers isolating the sympatric and highly divergent populations located on the banks of the Xingu river. As suggested by our time-divergence analysis there have been at least two distinct patterns of colonization between lineages throughout recent history of this taxon. The lower Medium Xingu clade C emerged from the first internal split around 8 Myr, in the late Miocene and the lower Medium Xingu clade E diverged only recently, in the Pleistocene. The hypothesis that these two lineages may correspond to unrecognized, sympatric species is stressed out and should be further tested

Thumbless bats are aerial insectivorous and fly close to the ground to catch insects, especially moths during flight (Kalko et al. 1996; Fenton et al. 1999). Scarce information is available on the flight movements of Neotropical bats (Trevelin et al. 2013). Due to the small body size of *Furipterus* we could assume the use of small areas and more restricted foraging behavior, closer to day shelters and its surroundings (Adams & Pedersen 2000, Norberg 1995, Norberg & Rayner 1987) also considering that ecological constraints are particularly expensive in terms of energetic costs for small bats (Lewis 1995). Surprisingly for *Furipterus horrens* recent data on space and habitat use indicating that this bat uses considerable large areas in savannah-like environments (canga) in Carajás, Eastern Amazonia (Tavares et al. subm.). These data indicate that *Furipterus* may be able to endure larger distances per night over open spaces, although it is unclear why. The ability to fly over longer distances could facilitate the historical maintenance of genetic flux in *Furipterus* metapopulations as observed in the populations represented by the larger clades “B” and “C”+ “D” + “E”.

The spatial distribution of the genetic diversity of bat populations of species is correlated to their dispersal abilities and limited by the landscape configuration e.g. by habitat fragmentation (Meyer & Kalko 2008, Ripperger et al. 2013, Ripperger et al. 2015). Future studies including nuclear markers can be helpful to further testing reciprocal monophyly (Centeno-Cuadros et al. 2019, Edwards & Beerli 2000, Pavan et al. 2016, Martins et al. 2009) and other markers such as genomic SNPs for studies of population dynamics and social organization, such as to test hypotheses of philopatry (Edwards & Beerli 2000, Dufresnes et al. 2023) as females tend to be philopatric in many mammalian species as some bat species such as *Myotis sodalis*, *Myotis nattereri*, *Pipistrellus pipistrellus* and others (Kerth et al. 2002, Kurta et al. 2002, Rivers et al. 2005).

A priori cryptic species have been often detected in bats based the analyzes of the mitochondrial markers COI and Cytochrome B, which remain as excellent primary sources to

build testable hypotheses of diversification for Neotropical bats. The use of integrative taxonomy to test these hypotheses has helped to unite evidence and understand this diversity (De Thoisy et al. 2014; Pavan and Marroig 2016; Loureiro et al. 2018; Lim et al. 2020). Our results showed that *F. horrens* is a mosaic of highly divergent populations that likely contains more than one species that remained virtually overlooked for over two centuries. Revisions including Central American populations and the addition of morphological and other molecular datasets is welcome to help further untangling the hidden taxonomic and populational diversity of *Furipterus*.

Furipterus horrens has been listed as vulnerable to extinction in Brazil under the C2a(i) criterium of IUCN, based on rough estimates of proportions of mature individuals/population (ICMBio 2023). According to our field observations and collections over the last decades, pressures over populations of *Furipterus* are particularly high over the Lower Medium Xingu unique populations that occupy rocky outcrops (clade C), an area impacted by the Belo Monte dam. Overall, we suggest that impacts over limestone and iron ore caves used by *Furipterus* populations as well as the impacts to their surroundings need to be understood and constantly monitored. The status as one of the rarest neotropical bat, for *Furipterus horrens* (Handley 1976, Uieda et al. 1980) has at least partially been prior set due to the limitations of capture methods and has been challenged by our rocky roosts' surveys that uncovered large populations occupying caves and river rocky outcrops (Tavares et al. 2012, Arroyo-Cabrales 2019).

The larger populations of *Furipterus* we found are those from southeastern mosaics of iron canga caves and forests, where studies have been conducted to monitor and help conserving this species, which has been considered a model cave species in the Eastern Amazonian Carajas mosaics. On the other hand, virtually anything is known about *Furipterus* biology in limestone systems in the Atlantic forests and Caatinga systems from southeastern and northeastern Brazil.

The description of new species or elucidation of unrecognized diversity in phenotypically similar bats has changed the conservation status for several species (e.g. Tejedor 2011, for *Natalus*, Tavares et al. 2014 for *Vampyressa*). Species with previous wide distributions, when separated into previously unrecognized species usually become more restricted geographically (e.g. Tejedor et al. 2005) which naturally requires a conservation status re-evaluation. Other than focusing on species' taxonomic status only the evaluation of the "conservation unit" represented by the species or one or more of its populations, and for that the consideration of multiple data is important (Allendorf 2022). Gene erosion events have been

identified for populations of *Uroderma bilobatum* and *Carollia perspicillata* due to isolation of populations from forest fragmentation events (Meyer & Kalko 2008, Ripperger et al. 2009).

In the 1990's E. Trajano already advocated about the importance of protecting caves for the conservation of several bat species especially those dependent on rocky environments as shelters (Trajano, 1995). Unfortunately, in Brazil less than 10% of karstic areas are under protection and as far as we known there are no protection laws for the biodiversity of rocky outcrops of clear water rivers. Caves and rock outcrops seem to be intrinsically associated with the subsistence of *Furipterus* populations at least as far as its South American distribution is concerned, and it is necessary to understand the use of different rocky shelter types as conservation constraints for this taxon, and likely for others.

REFERENCES

- Adams, R. A., & Pedersen, S. C. (Eds.). (2000). *Ontogeny, functional ecology, and evolution of bats*. Cambridge University Press.
- Alfaro-Lara, H., Villalobos-Chaves, D., Castillo-Gómez, J. I., Zuñiga-Montero, A. F., & Pineda-Lizano, W. (2019). Rediscovery of *Furipterus horrens* (Chiroptera: Furipteridae) in Costa Rica. *Mammalia*, 83(4), 352-356.
- Amador, L. I., Arévalo, R. L. M., Almeida, F. C., Catalano, S. A., & Giannini, N. P. (2016). Bat systematics in the light of unconstrained analyses of a comprehensive molecular supermatrix. *Journal of Mammalian Evolution*, 25(1), 37-70.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Azevedo, M. S. (2013). Filogeografia Intraespecífica de *Lonchorhina aurita* (Chiroptera, Phyllostomidae) (Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo).
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Bernard, E., & Fenton, M. B. (2003). Bat mobility and roosts in a fragmented landscape in central Amazonia, Brazil. *Biotropica*, 35(2), 262-277.
- Bradley, R. D., & Baker, R. J. (2001). A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of mammalogy*, 82(4), 960-973.
- Bredt, A., Uieda, W., & Magalhães, E. D. (1999). Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia*, 731-770.
- Cabrera, A. (1958). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Rev Mus Argentino de Cienc Nat. Bernardino Rivadavia*, 4(1), 1-307.

- Centeno-Cuadros, A., Razgour, O., García-Mudarra, J. L., Mingo-Casas, P., Sandonís, V., Redondo, A., ... & Echevarría, J. E. (2019). Comparative phylogeography and asymmetric hybridization between cryptic bat species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57(4), 1004-1018.
- Clare, E. L., Lim, B. K., Fenton, M. B., & Hebert, P. D. (2011). Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *PloS one*, 6(7), e22648.
- Corander, J., & Tang, J. (2007). Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205(1), 19-31.
- Czaplewski, N. J. (1996). Opossums (Didelphidae) and bats (Noctilionidae and Molossidae) from the late Miocene of the Amazon Basin. *Journal of Mammalogy*, 77(1), 84-94.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), 879-886.
- De Thoisy, B., Pavan, A. C., Delaval, M., Lavergne, A., Luglia, T., Pineau, K., ... & Catzefflis, F. (2014). Cryptic diversity in common mustached bats *Pteronotus* cf. *parnellii* (Mormoopidae) in French Guiana and Brazilian Amapá. *Acta Chiropterologica*, 16(1), 1-13.
- Dias, C. A. R., Santos Júnior, J. E., Perini, F. A., & Santos, F. R. (2017). Biogeographic scenarios for the diversification of a widespread Neotropical species, *Glossophaga soricina* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Systematics and biodiversity*, 15(5), 440-450.
- Dufresnes, C., Dutoit, L., Brelsford, A. et al. (2023). Inferring genetic structure when there is little: population genetics versus genomics of the threatened bat *Miniopterus schreibersii* across Europe. *Sci Rep* 13, 1523. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27988-4>
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

- Edwards, S., & Beerli, P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6), 1839-1854.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite Ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Fenton, M. B., Whitaker Jr, J. O., Vonhof, M. J., Waterman, J. M., Pedro, W. A., Aguiar, L., & Rautenbach, N. I. (1999). The diet of bats from Southeastern Brazil: the relation to echolocation and foraging behaviour. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(4), 1081-1085.
- Ferreira, W. A. S., Borges, B. D. N., Rodrigues-Antunes, S., Andrade, F. A. G. D., Aguiar, G. F. D. S., Silva-Junior, J. D. S. E., ... & Harada, M. L. (2014). Phylogeography of the dark fruit-eating bat *Artibeus obscurus* in the Brazilian Amazon. *Journal of Heredity*, 105(1), 48-59.
- Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H., & Hilbers, C. W. (1994). A model of the complex between single-stranded DNA and the single-stranded DNA binding protein encoded by gene V of filamentous bacteriophage M13. *Journal of molecular biology*, 240(4), 341-357.
- Gardner, A. L. (Ed.). (2008). *Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. University of Chicago Press.
- Gregorin, R., Moras, L. M., Acosta, L. H., Vasconcellos, K. L., Poma, J. L., dos Santos, F. R., & Paca, R. C. (2016). A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southeastern Brazil and Bolivia. *Mammalian Biology*, 81(3), 235-246.
- Guimarães, M. M., & Ferreira, R. L. (2015). Morcegos cavernícolas do Brasil: novos registros e desafios para conservação. *Revista Brasileira de Espeleologia*, 2(4), 1-33.
- Handley C. O. Jr, (1976) *Mammals of The Smithsonian Venezuelan projects*. Bigham Young Univ. Sci. Bull., 20:1-89
- Handley Jr, C. O. (1966). Checklist of the mammals of Panama. *Ectoparasites of Panama*, 861, 753-795.

- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Hung, C. M., Drovetski, S. V., & Zink, R. M. (2016). Matching loci surveyed to questions asked in phylogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1826), 20152340.
- ICMBio, 2023. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 13 de nov. de 2023.
- Kalko, E. K., Handley Jr, C. O., & Handley, D. (1996). Organization, diversity, and long-term dynamics of a Neotropical bat community. In *Long-term studies of vertebrate communities* (pp. 503-553). Academic Press.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638.
- Kerth, G., & Petit, E. (2005). Colonization and dispersal in a social species, the Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology*, 14(13), 3943-3950.
- Kerth, G., Mayer, F., & Petit, E. (2002). Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology*, 11(8), 1491-1498.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kurta, A., Murray, S. W., & Miller, D. H. (2002). Roost selection and movements across the summer landscape. *The Indiana bat: biology and management of an endangered species* (A. Kurta and J. Kennedy, eds.). Bat Conservation International, Austin, Texas, 118-129.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695-1701.

- Lara-Ruiz, P., Chiarello, A. G., & Santos, F. R. (2008). Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, 141(5), 1332-1342.
- Larsen, P. A., Marchan-Rivadeneira, M. R., & Baker, R. J. (2010). Taxonomic status of Andersen's fruit-eating bat (*Artibeus jamaicensis aequatorialis*) and revised classification of *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Zootaxa*, 2648(1), 45-60.
- LaVal R. K. (1977). Notes on some Costa Rican bats. *Apuntes sobre algunos murciélagos costarricenses*. Brenesia., (10/11), 77-83.
- Leal, E. S. B., Gomes-Silva, F. F., Lira, T. C., Prado Neto, J. G., & Passos Filho, P. B. (2014). Occurrence of *Furipterus horrens* (F. Cuvier, 1828)(Chiroptera: Furipteridae) in the state of Paraíba and update of the distribution of the species in Brazil. *Chiroptera Neotropical*, 20(20), 1280-1287.
- Lewis, S. E. (1995). Roost fidelity of bats: a review. *Journal of Mammalogy*, 76(2), 481-496.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Lopes, S. R., & Ditchfield, A. D. (2009). Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical*, 15(1), 450-455.
- Loureiro, L. O., Lim, B. K., & Engstrom, M. D. (2018). A new species of mastiff bat (Chiroptera, Molossidae, *Molossus*) from Guyana and Ecuador. *Mammalian Biology*, 90(1), 10-21.
- Martins, F. M., Ditchfield, A. D., Meyer, D., & Morgante, J. S. (2007). Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(4), 372-378.

- Martins, F. M., Templeton, A. R., Pavan, A. C., Kohlbach, B. C., & Morgante, J. S. (2009). Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 294.
- Medina, C. E., Gregorin, R., Zeballos, H., Zamora, H. T., & Moras, L. M. (2014). A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southwestern Peru. *Zootaxa*, 3878(1), 19-36.
- Medina-Fitoria, A., Saldaña, O., Martínez, J. G., Aguirre, Y., Silva, W., Chávez, M., ... & Díaz, L. (2015). Nuevos reportes sobre los murciélagos (Mammalia: Chiroptera) de Nicaragua, América Central, con la adición de siete nuevos registros de especies. *Mastozoología Neotropical*, 22(1), 43-54.
- Meyer, C. F. & Kalko, E. K. (2008). Bat assemblages on Neotropical land-bridge islands: nested subsets and null model analyses of species co-occurrence patterns. *Diversity and Distributions*, 14(4), 644-654.
- Miller, M. P. (2005). Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96(6), 722-724.
- Moras, L. M., Gregorin, R., Sattler, T., & Tavares, V. D. C. (2018). Uncovering the diversity of dog-faced bats of the genus *Cynomops* (Chiroptera: Molossidae), with the redescription of *C. milleri* and the description of two new species. *Mammalian Biology*, 89, 37-51.
- Moras, L. M., Tavares, V. D. C., Pepato, A. R., Santos, F. R., & Gregorin, R. (2016). Reassessment of the evolutionary relationships within the dog-faced bats, genus *Cynomops* (Chiroptera: Molossidae). *Zoologica Scripta*, 45(5), 465-480.
- Morgan, G. S., Czaplewski, N. J., & Simmons, N. B. (2019). A New Mormoopid Bat from the Oligocene (Whitneyan and Early Arikareean) of Florida, and Phylogenetic Relationships of the Major Clades of Mormoopidae (Mammalia: Chiroptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2019(434), 1-146.
- Norberg, U. M. (1995). How a long tail and changes in mass and wing shape affect the cost for flight in animals. *Functional Ecology*, 48-54.

- Norberg, U. M., & Rayner, J. M. (1987). Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 316(1179), 335-427.
- Novaes, R. L. M., de França Souza, R., Felix, S., Sauwen, C., Jacob, G., & dos Santos Avilla, L. (2012). New record of *Furipterus horrens* (Cuvier, 1828) (Mammalia, Chiroptera) from the Cerrado of Tocantins state with a compilation of the known distribution within Brazil. *Check List*, 8(6), 1359-1361.
- Pavan, A. C., & Marroig, G. (2016). Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: Pteronotus). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103, 184-198.
- Pavan, A. C., Martins, F. M., & Morgante, J. S. (2013). Evolutionary history of bulldog bats (genus *Noctilio*): recent diversification and the role of the Caribbean in Neotropical biogeography. *Biological Journal of the Linnean Society*, 108(1), 210-224.
- Pavan, A. C., Martins, F., Santos, F. R., Ditchfield, A., & Redondo, R. A. (2011). Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biological journal of the Linnean Society*, 102(3), 527-539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.6: MCMC trace analyses tool.
- Redondo, R. A., Brina, L. P., Silva, R. F., Ditchfield, A. D., & Santos, F. R. (2008). Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 44-58.
- Ripperger, S. P., Kalko, E. K., Rodríguez-Herrera, B., Mayer, F., & Tschapka, M. (2015). Frugivorous bats maintain functional habitat connectivity in agricultural landscapes but rely strongly on natural forest fragments. *PloS one*, 10(4), e0120535.

- Ripperger, S. P., Tschapka, M., Kalko, E. K., Rodriguez-Herrera, B., & Mayer, F. (2013). Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conservation Genetics*, 14(5), 925-934.
- Rivers, N. M., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2005). Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14(14), 4299-4312.
- Rojas, D., Warsi, O. M., & Dávalos, L. M. (2016). Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant neotropical diversity. *Systematic Biology*, 65(3), 432-448.
- Simmons, N. B., & Voss, R. S. (1998). The mammals of Paracou, French Guiana, a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1, Bats. *Bulletin of the AMNH*; n° 237.
- Smith BT, Klicka J (2013) Examining the Role of Effective Population Size on Mitochondrial and Multilocus Divergence Time Discordance in a Songbird. *PLoS ONE* 8(2): e55161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055161>
- Smith, M. F., & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149-177.
- Sorenson, M. D. (2003). Avian mtDNA primers. Boston: Boston University.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tavares, V. C. (2008). Revisionary systematics and phylogeny of *Vampyressa* and *Stenodermatinae* (Chiroptera: Phyllostomidae). City University of New York.
- Tavares, V. D. C., Aguiar, L. M. D. S., Perini, F. A., Falcão, F. C., & Gregorin, R. (2010). Bats of the state of Minas Gerais, Southeastern Brasil. *Chiroptera Neotropical* 16(1) 675-705.

- Tavares, V. D. C., Gardner, A. L., Ramírez-Chaves, H. E., & Velazco, P. M. (2014). Systematics of *Vampyressa melissa* Thomas, 1926 (Chiroptera: Phyllostomidae), with descriptions of two new species of *Vampyressa*. *American Museum Novitates*, 2014(3813), 1-27.
- Tavares, V. D. C., Palmuti, C. F. D. S., Gregorin, R., & Dornas, E. T. T. (2012). Morcegos. *Estudos sobre Vertebrados Terrestres*, 156.
- Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'brien, S. J., & Murphy, W. J. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 307(5709), 580-584.
- Tejedor, A. (2011). Systematics of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2011(353), 1-140.
- Trajano, E. (1995). Protecting caves for bats or bats for caves?. *Chiropt. neotrop.*, 19-21.
- Trevelin, L. C., Silveira, M., Port-Carvalho, M., Homem, D. H., & Cruz-Neto, A. P. (2013). Use of space by frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a restored Atlantic forest fragment in Brazil. *Forest Ecology and Management*, 291, 136-143.
- Uieda W.; Sazima I. & Storti-Filho A. (1980). Aspectos da Biologia do morcego *Furipterus horrens* (Mammalia, Chiroptera, Furipteridae). *Revista Brasileira de Biologia* 40: 49-56.
- Velazco, P.M., 2005. Morphological phylogeny of the bat genus *Platyrrhinus* Saussure, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae) with the description of four new species. *Fieldiana Zool.* 105, 1–53.
- Velazco, P. M., & Lim, B. K. (2014). A new species of broad-nosed bat *Platyrrhinus* Saussure, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Guianan Shield. *Zootaxa*, 3796(1), 175-193.
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2008). Phylogenetics and biogeography of the broad-nosed bats, genus *Platyrrhinus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 749-759.

- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2014). Two new species of yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* Gray, 1842 (Chiroptera, Phyllostomidae) from Costa Rica, Panama and western Ecuador. *ZooKeys*, (402), 43.
- Velazco, P. M., Gardner, A. L., & Patterson, B. D. (2010). Systematics of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae), with descriptions of two new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 159(3), 785-812.
- Wakeley, J. (2003). The evolution of population biology. *Inferences about the structure and history of populations: coalescent and intraspecific phylogeography*, 193-215.
- Wakeley, J. (2009). *Coalescent theory: an introduction* No. 575: 519.2
- Weisrock, D. W., Rasoloarison, R. M., Fiorentino, I., Ralison, J. M., Goodman, S. M., Kappeler, P. M., & Yoder, A. D. (2010). Delimiting species without nuclear monophyly in Madagascar's mouse lemurs. *PLoS One*, 5(3), e9883.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

TABELAS

Table 1. Primers used for amplification and/ or sequencing of *Furipterus horrens*.

Gene	Primers	Sequence (5' – 3')	Length (bp)	Reference
Cyt <i>b</i>	L14121	GACTAATGACATGAAAAATCA	1140	Redondo <i>et al.</i> (2008)
	H15318	TATCCCTTTGCCGGTTTACAAGACC		
Cyt <i>b</i>	MVZ4	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	610	Smith and Patton, 1993
	L14881	GACATAATTCCATTCCACCCCTAC		Redondo <i>et al.</i> (2008)
COI	COX-L2	TGTCTTTAGATTTACAGTCTAATGC	1300	Lara-Ruiz <i>et al.</i> (2008)
	H8121	GGGCAGCCRTGRATTCAATC		Sorenson, 2003
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	657	Folmer <i>et al.</i> 1994
	COXIH	ACTTCAGGGTGTCCGAAGAATCA		Lara-Ruiz <i>et al.</i> (2008)

Table 2. Dataset characteristics and best-fitting models of nucleotide substitution.

Dataset	Terminals	Base pairs/ characters	Invariant sites	Parsimony informative sites	Selected partition	models/
COI	54	657	451	128		
Cyt<i>b</i>	45	1140	701	262		
mtDNA	60	1797	1152	390	K80 + I + G for 1st_COI, HKY + I for 2nd and 3rd_COI; K80 + I + G for 1st_Cyt <i>b</i> , HKY + I for 2nd _ Cyt <i>b</i> , HKY + G for 3rd_Cyt <i>b</i>	

Table 3. Average Kimura 2-parameter distances (%) between the clades of *F. horrens* based on Cyt *b* and COI markers.

	Cyt <i>b</i>	1	2	3	4	5	6
1	Clade A	-					
2	Clade B	0.188	0.029				
3	Clade C	0.190	0.094	0.001			
4	Clade D	0.178	0.098	0.079	0.012		
5	Clade E	0.186	0.105	0.085	0.037	0.003	
6	Clade F	0.189	0.103	0.080	0.036	0.016	0.003
	COI	1	2	3	4	5	6
1	Clade A	-					
2	Clade B	0.194	0.021				
3	Clade C	0.196	0.142	0.001			
4	Clade D	0.203	0.150	0.085	0.018		
5	Clade E	0.219	0.154	0.102	0.042	0.001	
6	Clade F	0.210	0.154	0.096	0.035	0.012	0.004

Table 4. Populational parameter estimates for the markers Cytochrome *b* and COI from *Furipterus horrens* populations. Groups named as in the clades recovered and network analyses). N = number of individuals sampled, H = number of haplotypes, S = number of polymorphic sites, Hd = haplotypic diversity, π = nucleotide diversity, H = haplotypes, K= average number of pairwise differences.

	Parameters	Clade B	Clade C	Clade D	Clade E	Clade F
Cyt <i>b</i>	N	4	4	5	5	23
	S	37	6	31	3	113
	π	0.026	0.002	0.011	0.001	0.011
	H	4	3	4	2	12
	Hd	1.000	0.833	0.900	0.400	0.920
	K	19.167	3.000	12.600	1.200	12.039
COI	N	11	4	4	5	24
	S	41	1	14	1	8
	π	0.018	0.001	0.010	0.001	0.004
	H	9	2	4	2	7
	Hd	0.960	0.500	1.000	0.400	0.797
	K	9.730	0.050	7.667	0.400	2.140

Table 5. F_{ST} values considering Cytochrome *b* (Cytb) and COI, separately of *Furipterus horrens*, with significant values in bold. Upper diagonal corresponds to the geographical distance in kilometers.

		Clade B	Clade C	Clade D	Clade E	Clade F
Cytb	Clade B	*	278	1438	353	0.844
	Clade C	0.832	*	0.776	50	0.516
	Clade D	0.787	1374	*	1301	0.688
	Clade E	0.841	0.976	0.911	*	0.875
	Clade F	653	423	1200	348	*
COI	Clade B	*	278	1438	353	0.926
	Clade C	0.878	*	0.776	50	0.682
	Clade D	0.846	1374	*	1301	0.800
	Clade E	0.874	0.989	0.907	*	0.955
	Clade F	653	423	1200	348	*

Table 6. Tests of neutrality for combined mitochondrial data. N = number of samples, D= Tajima neutrality test, P significance, Ne expected number of alleles, Fs, Fu's neutrality test.

		Clade B	Clade C	Clade D	Clade E	Clade F
	N	13	4	7	6	27
Tajima's D	D	0	0	0	0	0.164
	P	1	1	1	1	0.595
	Ne	1	1	1	1	6.163
Fu's FS	FS	0	-0.824	0	0	-26.867
	P	1	1	1	1	0.01

Table 7. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) including haplotypes of populations of *Furipterus horrens* using and Cyt *b* and COI data.

AMOVA	Variation source	DF	Variation (%)	P-values
Cyt <i>b</i>	Between groups	5	52.04	P<0.0001
	Within groups	37	14.72	P<0.0001
	FST	0.852		
	FSC	0.692		
	FCT	0.520		
COI	Between groups	5	69.20	P<0.0001
	Within groups	43	22.71	P<0.0001
	FST	0.919		
	FSC	0.737		
	FCT	0.692		

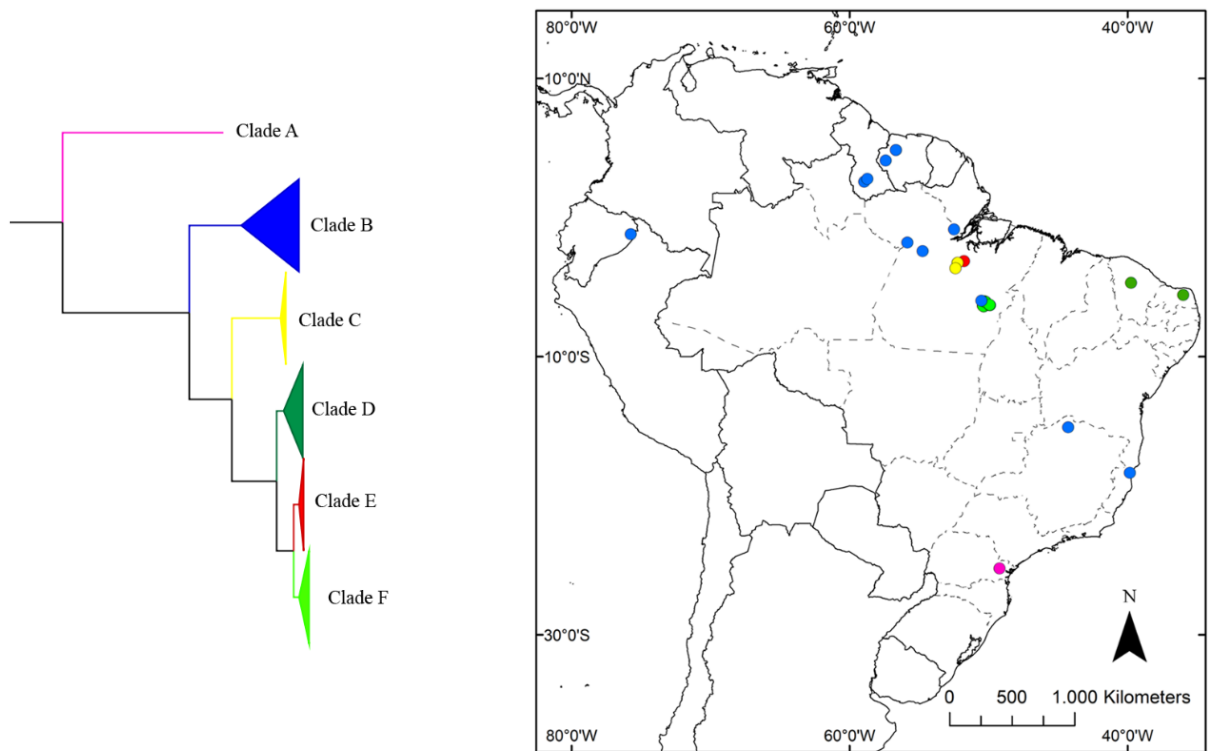


Figure 2. Evolutionary tree derived from the genus *Furipterus* (Furipteridae) lineage relationships. Lineages recovered are illustrated as colored clades in the tree, and as distributional points in the map, to the right. This final tree is derived from fully supported Bayesian trees generated with 1797 base pairs of the concatenated mtDNA markers COI and Cytochrome b. Clade A, single individual from southern Atlantic forest, mosaic with limestone karst; clade B, Eastern Amazonian Forest, Guiana forests, Southeastern Brazil caatinga in mosaic with semideciduous forests and limestone karst; clade C, lower-middle Xingu river rock outcrops, river margin with forest and arenitic formations, Eastern Brazil; clade D, Eastern Brazil mosaic of Caatinga, forests and limestone caves; clade E, lower-middle Xingu river rock outcrops as in C) and clade F, iron-rich caves in savannah like formations (cangas) from Eastern Amazonian mosaic with Amazonian forests, Pará state, Brazil.

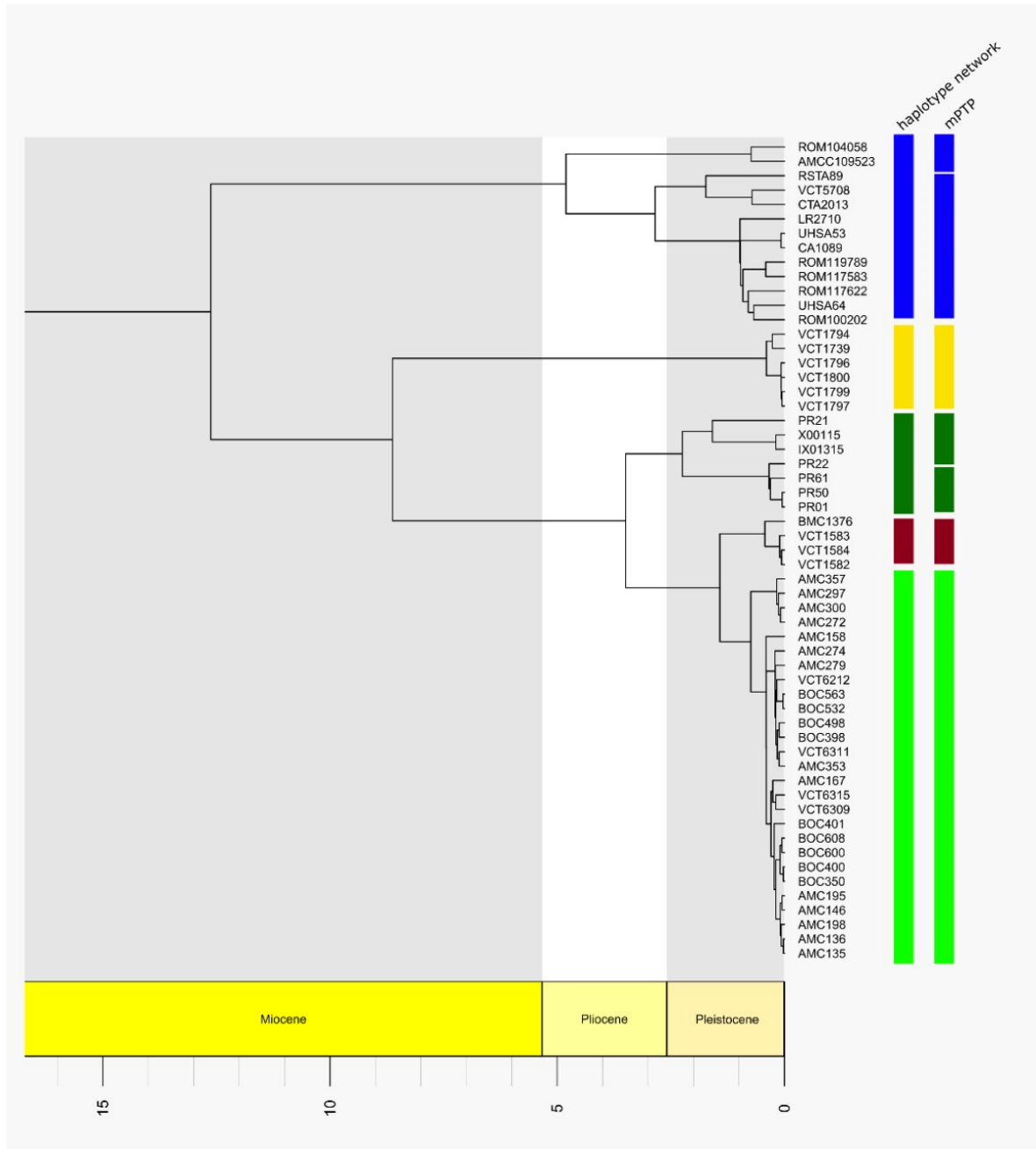


Figure 3. Dated evolutionary tree of lineages within genus *Furipterus* (Furipteridae) and estimated divergence times, using a lognormal relaxed molecular clock. The ultrametric tree was derived from Bayesian inference analyses of 1797 base pairs of mitochondrial DNA with two independent fossil calibrations, the Oligocene mormoopid *Koopmanycteris paleomormoops* and the Miocene noctilionid *Noctilio lacrimaelunaris*. The color-coding vertical bars indicate clades recovered by the phylogeny (to the left) and groups recovered by the mPTP species limits tests (to the right).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S 1. Catalog/tissue, locality, coordinates and genbank numbers for the sequences used in this study. Sequences gathered directly from Genbank are marked with an asterisk on the tissue number.

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates		Genbank accession number	
				Longitud	Latitud	Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	AMB-01/ DZUP- CCMZ 2185	A	Brazil: Gruta do Baetacava, PR	25°13' 55.80"S	49°12' 27.32"W		
<i>F. horrens</i>	CTA- 2013*	B	Brazil: FLONA Rio Preto, Conceição da Barra, ES	18°21' 20.67"S	39° 50'01.02"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 135/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 23' 50° 46.43"S	20' 26.99"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 136/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 23' 50° 46.43"S	20' 26.99"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 146/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 23' 50° 46.43"S	20' 26.99"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 158/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 20' 50° 42.16"S	24' 35.31"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 167/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 21' 50° 47.24"S	23' 03.41"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 195/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 21' 50° 42.96"S	23' 11.98"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 198/ VCT	F	Brazil: Serra Sul, FLONA Carajás, PA	06° 21' 50° 42.96"S	23' 11.98"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 272/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 01' 50° 52.67"S	16' 20.23"W		

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates		Genbank accession number	
				Longitud	Latitud	Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	AMC 274/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 01' 52.67"S	50° 16' 20.23"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 279/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 01' 52.67"S	50° 16' 20.23"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 297/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 01' 16.40"S	50° 18' 05.09"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 300/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 01' 16.40"S	50° 18' 05.09"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 353/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 02' 34.17"S	50° 16' 32.37"W		
<i>F. horrens</i>	AMC 357/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 03' 59.18"S	50° 11' 21.95"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 6311/ MPEG 40956	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 05' 22.37"S	50° 11' 42.03"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 6315/ VCT	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 05' 22.37"S	50° 11' 42.03"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 6212/ MPEG 40781	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 05' 22.37"S	50° 11' 42.03"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 6309/ MPEG 40954	F	Brazil: Serra Norte, FLONA Carajás, PA	06° 05' 22.37"S	50° 11' 42.03"W		
<i>F. horrens</i>	BOC 532/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 18' 38.19"S	49° 54' 40.97"W		

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates		Genbank accession number	
				Longitud	Latitud	Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	BOC 563/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 16' 49° 55' 33.99"S 05.60"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 350/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 18' 49° 53' 04.20"S 09.53"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 398/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 18' 49° 53' 47.75"S 33.62"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 400/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 18' 49° 53' 47.75"S 33.62"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 498/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 18' 49° 53' 03.15"S 08.30"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 600/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 16' 49° 55' 51.64"S 38.75"W			
<i>F. horrens</i>	BOC 608/ VCT	F	Brazil: Serra da Bocaina, FLONA Carajás, PA	06° 16' 49° 55' 51.64"S 38.75"W			
<i>F. horrens</i>	RSTA-89/ UFOPA	B	Brazil: RESEX Tapajós, Santarém, PA	02° 25' 54° 44' 06.95"S 19.15"W			
<i>F. horrens</i>	UHSA 53/ IEPA1864	B	Brazil: Laranjal do Jari, AP	00° 51' 52° 28' 24.97"S 39.52"W			

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates		Genbank accession number	
				Longitud	Latitud	Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	UHSA 64/ IEPA1875	B	Brazil: Laranjal do Jari, AP	00° 51' 24.97"S	52° 28' 39.52"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1582	E	Brazil: Xingu River, PA	03° 53.46"S	15' 01.67"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1583	E	Brazil: Xingu River, PA	03° 53.46"S	15' 01.67"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1584	E	Brazil: Xingu River, PA	03° 53.46"S	15' 01.67"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1739	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 53.46"S	15' 01.67"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1794	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 02.81"S	39' 52° 46.45"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1796	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 02.81"S	39' 52° 46.45"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1797	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 02.81"S	39' 52° 46.45"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1799	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 02.81"S	39' 52° 46.45"W		
<i>F. horrens</i>	VCT 1800	C	Brazil: Cachoeira do Espelho, Xingu River, PA	03° 02.81"S	39' 52° 46.45"W		

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates		Genbank accession number	
				Longitud	Latitud	Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	VCT 5708	B	Brazil: Serra Leste, FLONA Carajás, PA	05° 59' 16.62"S	50° 29' 53.05"W		
<i>F. horrens</i>	BMC 1376	E	Brazil: Vitória do Xingu, Altamira, PA	03° 07' 49.87"S	51° 45' 45.48"W		
<i>F. horrens</i>	CA 1089/ UFLA	B	Brazil: Lapa dos Ossos, PARNA Cavernas do Peruaçu, MG	15° 05' 12.45"S	44° 15' 49.30"W		
<i>F. horrens</i>	IX01315/ UFPE	D	Brazil: João Câmara, RN	05° 34' 11.58"S	35° 59' 14.31"W		
<i>F. horrens</i>	PR 21/ UFPB	D	Brazil: Santa Quitéria, CE	04° 41' 17.00"S	39° 44' 56.30"W		
<i>F. horrens</i>	PR 61/ UFPB	D	Brazil: Santa Quitéria, CE	04° 41' 17.00"S	39° 44' 56.30"W		
<i>F. horrens</i>	PR 01/ UFPB	D	Brazil: Santa Quitéria, CE	04° 41' 17.00"S	39° 44' 56.30"W		
<i>F. horrens</i>	PR 22/ UFPB	D	Brazil: Santa Quitéria, CE	04° 41' 17.00"S	39° 44' 56.30"W		
<i>F. horrens</i>	PR 50/ UFPB	D	Brazil: Santa Quitéria, CE	04° 41' 17.00"S	39° 44' 56.30"W		
<i>F. horrens</i>	X00115/ UFPE	D	Brazil: João Câmara, RN	05° 34' 11.58"S	35° 59' 14.31"W		
<i>F. horrens</i>	ROM1040 58*	B	Ecuador: Yasuni National Park, Napo	01° 11' 34.24"S	75° 43' 26.14"W		
<i>F. horrens</i>	AMCC109 523*	B	Ecuador: Yasuni National Park, Napo	01° 11' 34.24"S	75° 43' 26.14"W		

Taxon	Voucher	Clade ¹	Locality	Coordinates				Genbank accession number	
				Longitud	Latitud			Cyt <i>b</i>	COI
<i>F. horrens</i>	LR-2701/ UFOPA	B	Brazil: Oriximiná, PA	01° 48' 55° 49'	11.93"S	52.52"W			
<i>F. horrens</i>	ROM1002 02*	B	Guyana: East Berbice-Corentyne	04° 06' 57° 24'	24.49"N	53.78"W			
<i>F. horrens</i>	ROM1175 83*	B	Suriname: Sipaliwini	04° 51' 56° 39'	50.90"N	37.37"W			
<i>F. horrens</i>	ROM1197 89*	B	Guyana: Iwokrama forest, Potaro- Siparuni	02° 33' 58° 56'	50.93"N	47.23"W			
<i>F. horrens</i>	ROM1176 22*	B	Suriname: Sipaliwini	04° 51' 56° 39'	50.90"N	37.37"W			
<i>F. horrens</i>	ROM9810 8*	B	Guyana: Upper Takutu-Upper Essequibo	02° 47' 58° 43'	11.01"N	34.01"W			

1 Clade numbers according to the phylogenetic results (see Fig.XX)

Table S 2. List of haplotypes from *Furipterus horrens*. For localities see table S1.

Haplotypes					
Cyt <i>b</i>			COI		
Hap 1:	AMC 135, AMC 136		Hap 1:	AMC135, AMC136, AMC146, AMC195	
Hap 2:	AMC 146, AMC 195, BOC 600, BOC 608		Hap 2:	AMC158	
Hap 3:	AMC 158		Hap 3:	AMC 167, BOC 350, BOC 400, BOC 600, BOC 608, VCT 6309, VCT 6315	
Hap 4:	AMC 272, AMC 300		Hap 4:	AMC 274, AMC 353, BOC 398, BOC 498, BOC 532, BOC 563, VCT 6212, VCT 6311	
Hap 5:	AMC 274		Hap 5:	AMC 279	
Hap 6:	AMC 297		Hap 6:	AMC 297, AMC 300	
Hap 7:	AMC 353, BOC 398, BOC 498, VCT 6212, VCT 6311		Hap 7:	AMC 357	
Hap 8:	BOC 350, BOC 400		Hap 8:	CA1089, UHSA53	
Hap 9:	BOC 532, BOC 563		Hap 9:	CTA-2013	
Hap 10:	VCT 5708		Hap 10:	LR 2710, ROM117622	
Hap 11:	VCT 6309		Hap 11:	ROM100202	
Hap 12:	VCT 6315		Hap 12:	ROM104058	
Hap 13:	AMCC109523		Hap 13:	ROM117583	
Hap 14:	LR 2710		Hap 14:	ROM119789	
Hap 15:	RSTA 89		Hap 15:	RSTA 89	
Hap 16:	UHSA 53		Hap 16:	UHSA 64	

Haplotypes
Cyt *b***COI**

Hap 17:	UHSA 64	Hap 17:	IX01315
Hap 18:	PR 01, PR 50	Hap 18:	PR 21
Hap 19:	PR 21	Hap 19:	PR 61
Hap 20:	PR 22	Hap 20:	X00115
Hap 21:	PR 61	Hap 21:	AMB 01
Hap 22:	AMB 01	Hap 22:	BMC 1376
Hap 23:	BMC 1376	Hap 23:	VCT 1582, VCT 1583, VCT 1584
Hap 24:	VCT 1582, VCT 1584	Hap 24:	VCT 1794
Hap 25:	VCT 1583	Hap 25:	VCT 1796, VCT 1797, VCT 1799, VCT 1800
Hap 26:	VCT 1739		
Hap 27:	VCT 1796, VCT 1797, VCT 1799, VCT 1800		

CAPÍTULO II

Filogenia molecular do gênero *Natalus* (Chiroptera, Natalidae) baseada em DNA mitocondrial, variações populacionais em *N. macrourus* e implicações para a conservação.

RESUMO

Natalidae é uma família de morcegos insetívoros de tamanho pequeno, com olhos diminutos e asas largas, exclusivamente cavernícolas e distribuição neotropical, incluindo representantes na Américas do Sul e Central, no Caribe e nas Antilhas. Espécies de morcegos exclusivamente cavernícolas com ampla distribuição territorial representam potenciais testes de hipóteses de populações estruturadas com diferentes graus de intercâmbio genético ou mesmo complexos de espécies. Pouco se sabe sobre a variação molecular dentro do gênero *Natalus* e a revisão mais recente não incluiu dados moleculares da espécie distribuída na América do Sul, *Natalus macrourus*, que ocorre em grande parte do território brasileiro. Os objetivos desse trabalho são revisitar as relações evolutivas dentro gênero, com base em dados inéditos de marcadores mitocondriais e em amostragens geográficas amplas, revisar o status da espécie *N. macrourus*, que ocorre ao sul do rio Amazonas e cuja maior parte da distribuição está no Brasil e testar a hipótese de estruturação de suas populações, devido a associação aos ambientes cársticos. Análises de Inferência Bayesiana dos dados moleculares suportam a monofilia de *N. macrourus*, com o posicionamento de *N. major* como grupo irmão dos demais *Natalus*. *Natalus tumidirostris* foi recuperado como parafilético e *N. s. saturatus* como sinônimo de *N. mexicanus*, conforme sugerido em estudos morfológicos anteriores. O gênero *Chilonatalus* foi recuperado como irmão dos demais *Natalus*, com valores de divergências compatíveis com as de um gênero distinto. *Natalus stramineus* agrupou-se com *N. tumidirostris* de Trinidad e da Venezuela. As avaliações populacionais de *Natalus macrourus* indicaram moderada estruturação populacional, com haplótipos compartilhados entre localidades distantes. Os valores de divergência genética, populacionais e a filogenia foram compatíveis em corroborar, *a priori*, a ocorrência de uma única espécie para o Brasil, sem isolamento entre as populações amostradas.

Palavras-chave: DNAmít, morcegos cavernícolas, estruturação populacional

ABSTRACT

The family Natalidae is comprised by Neotropical insectivorous bats of a small size, diminute eyes and broad wings. Natalids are exclusively cave dwelling species, and include living representatives in South and Central America, in the Caribbean and in the Lesser Antilles. Bat species associated to the karst occupying large extensions but with their occurrence strongly associated to the disjunct distribution of the karstic conglomerates represent potential hypotheses of structured populations, with varied patterns of genetic interchange or of putative species complexes. Little is known about the molecular variation within the genus *Natalus* and the most recent revision of the genus has not included molecular data of the widespread *Natalus macrourus*, which occurs in South America and in a large part of the Brazilian territory.

The goals of the present study include revisiting the evolutionary relationships within the genus using mitochondrial markers and with a broad geographic coverage, and revise the status of the species *N. macrourus*, which occurs to the South of Orinoco river in South America and have most part of its distribution contained within Brazil, and test for population structure of lineages recovered in the analyses. Analyses of Bayesian Inference support monophyly of *N. macrourus*, with the placement of *N. major* as sister taxon of the other species of *Natalus*. *Natalus tumidirostris* was recovered as paraphyletic and *Natalus s. saturatus* as synonymous of *N. mexicanus* as suggested in previous studies with morphological data. The genus *Chilonatalus* was recovered as sister to *Natalus* with large genetic divergence values compatible with genus differentiation within Natalidae. *Natalus stramineus* formed a paraphyletic assemblage with *N. tumidirostris* from Trinidad and Venezuela. The populational evaluations of *Natalus macrourus* indicated a moderate populational structure with some shared haplotypes between geographically distant localities. The values of genetic divergence, the phylogenetic and populational analyzes concurred to corroborate the occurrence of a single species within Brazil that appear not to have isolated spatially populations.

Keywords: DNAmits, cave-dwelling bats, populational structure

INTRODUÇÃO

Com o aprimoramento e disponibilidade das ferramentas estatísticas e análises moleculares, a biodiversidade dos morcegos tem se elevado substancialmente, contando com números atuais de 2100 espécies (Burgin et al. 2018, Simmons 2005), sendo 250 táxons acrescidos ao total nas últimas décadas. Revisões de famílias e gêneros revelaram elevada variação intraespecífica, especialmente em espécies com ampla distribuição territorial, como observados para *Cynomops* (Moras et al. 2016), *Platyrrhinus* (Velazco & Patterson 2008, Velazco & Lim 2014), *Sturnira* (Velazco & Patterson 2013, 2014) e *Artibeus* (Larsen et al. 2007, Redondo et al. 2008). Com a facilitação de custos e acesso ao material genético, novos padrões de diversidade críptica e delimitação de espécies foram evidenciados, permitindo assim avaliar a estruturação genética populacional (Smith & Klica 2013, Centeno-Cuadros et al. 2019), eventos vicariantes e hibridizações (Bradley & Baker 2001, Centeno-Cuadros et al. 2019).

A filogeografia teve seu início nos anos 2000, utilizando dados genéticos para inferir padrões e processos que governam o surgimento de linhagens genéticas, incluindo a identificação de estruturações e quebras genéticas em populações de uma ou mais espécies (Avice 2000, Edwards & Beerli 2000, Smith & Klica 2013). Para os morcegos, devido às características de capacidade de voo e relações sociais dentro das colônias, são importantes modelos para estudos filogeográficos (Altringham 2011, Centeno-Cuadros et al. 2019, Jones & Purvis 1997, Neuweiller 2000, Thoisy et al. 2014). Estudos filogeográficos utilizando morcegos apresentam padrões diversificados de estruturação, apontando desde baixa estruturação populacional (Ditchfield 2000) até forte estruturação (Ferreira et al. 2013, Lopes et al. 2009), revelando inclusive diversidade críptica para espécies, como *Desmodus rotundus* (Martins et al. 2009), *Artibeus obscurus*, *Artibeus jamaicensis* (Larsen et al. 2007, Redondo et al. 2008) e *Carollia brevicauda* (Pavan et al. 2011).

A família Natalidae é composta por morcegos com ocorrência restrita à região neotropical, incluindo representantes fósseis e viventes, estando mais proximamente relacionados às famílias Molossidae e Vespertilionidae (Amador et al. 2018, Teeling et al. 2005). O número de gêneros reconhecidos para a família variou historicamente desde um único gênero (*Natalus*) até quatro gêneros distintos, *Natalus*, *Phodotes*, *Chilonatalus* e *Nyctielus* (Arroyo-Cabrales et al. 1997, Dávalos 2005, Morgan & Czaplewsky 2003, Tejedor 2007,

Tejedor 2011). Até duas décadas atrás, grande parte da diversidade dos natalídeos estava grandemente subestimada, em especial pela alta similaridade morfológica observada dentro dos táxons inseridos na família (Ottenwalder & Genoways 1982, Tejedor 2011). Morgan e Czaplewski (2003) revisaram o gênero e descreveram a espécie fóssil *Primonatalus prattae*, revalidando também os gêneros *Chilonatalus* e *Nyctiellus*, arranjo esse que foi corroborado por estudos com marcadores moleculares e caracteres morfológicos (Dávalos 2005, Tejedor 2011).

Natalus são morcegos insetívoros, com orelhas em formato de funil e pequeno tamanho corporal (antebraço 27- 45 mm) com asas largas, cauda e pernas longas, olhos pequenos e inconspícuos, com pelagem longa e lanosa, crânio globular e rostró alongado (Gardner, 2008, Tejedor 2007, Tejedor 2011) (Figura 4). O gênero está distribuído desde o norte do México (Baixa Califórnia), na América Central, amplamente distribuído em diversas ilhas, incluindo as Antilhas, Bahamas e Caribe e, na América do Sul, com registros na Colômbia, Guianas, Brasil, Bolívia e Paraguai (Gardner 2008, Morgan & Czaplewski 2003, Tejedor 2007– Figura 5).

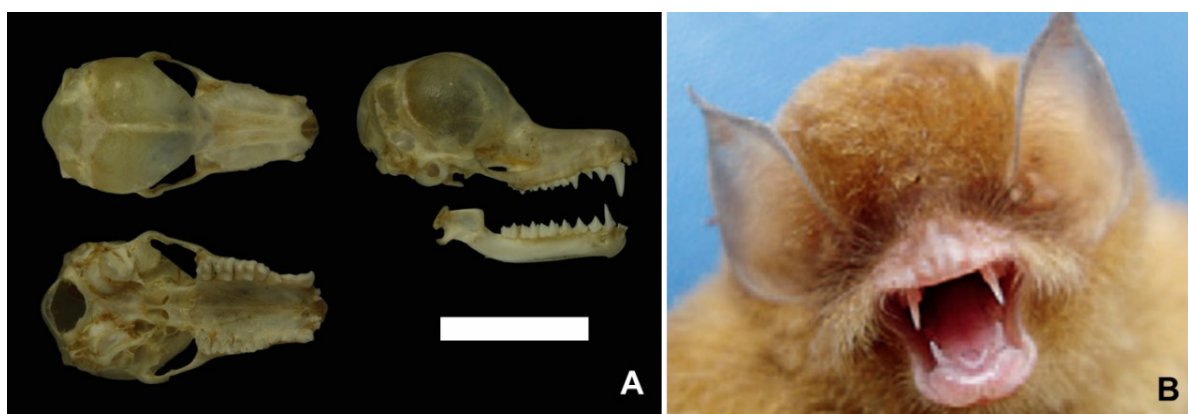


Figura 4. Indivíduo de *Natalus macrourus* (VCT 2662): crânio em vista dorsal e lateral. Escala: 10mm (A) (foto: P. Pilatti), indivíduo capturado na FLONA Carajás (B) (foto: V. Tavares).

Miller (1907) listou três espécies para o gênero *Natalus* (*N. stramineus*, *N. mexicanus* e *N. major*). Dalquest (1950), Goodwin (1959), Hall (1981) e Koopman (1994) consideraram apenas um único gênero (*Natalus*), com as demais espécies inseridas em subgêneros (*Natalus*, *Chilonatalus* e *Nyctiellus*). Simmons (2005), por sua vez, considerou cada subgênero como um gênero pleno e listou cinco espécies de *Natalus* (*N. stramineus*, *N. major*, *N. jamaicensis*, *N. primus* e *N. tumidirostris*). Por fim, Tejedor (2007, 2011) com base em dados morfológicos, reconheceu quatro gêneros (*Natalus*, *Chilonatalus*, *Nyctiellus* e *Primonatalus*), com *Natalus* apresentando oito espécies (*N. stramineus*, *N. major*, *N. jamaicensis*, *N. primus*, *N. tumidirostris*, *N. espiritosantensis*, *N. mexicanus* e *N. lanatus*). Posteriormente, em estudos com as duas espécies registradas para o México, observou-se que não há divergência filogenética e

molecular entre *N. lanatus* e *N. mexicanus* (Lopez-Wilchis et al. 2012), sugerindo-se a sinonimização de ambas.

Os estudos filogenéticos da família Natalidae, realizados até o momento, consideraram pouca ou nenhuma amostragem em território brasileiro, não havendo dados moleculares disponíveis, até o momento para *Natalus macrourus* brasileiros (Dávalos 2005, Tejedor 2007, Tejedor 2011), sendo que o Brasil abrange grande parte da distribuição de *Natalus macrourus*. O posicionamento de *N. macrourus* dentro da família o coloca na base dos clados contendo *N. stramineus* e *N. tumidirostris*, quando considerados os caracteres morfológicos e moleculares (Tejedor 2007) e apresenta-se como grupo irmão de *N. tumidirostris* (Tejedor 2011) considerando apenas caracteres morfológicos para o gênero (Figura 6).

Natalus macrourus (Gervais, 1856) espécie do gênero com ocorrência para a América do sul abaixo do rio Amazonas, abrangendo grande parte do território brasileiro, foi inicialmente descrito como *Myotis espiritosantensis* (Ruschi, 1951), posteriormente sinonimizado com *Natalus stramineus* Gray, 1838, táxon que apresentava ampla distribuição, incluindo as Antilhas Menores, México e América do Sul (Gardner 2008). Tejedor (2011) na mais recente revisão da família Natalidae, subdividiu *N. stramineus* em três táxons distintos, restringindo a ocorrência de *N. mexicanus* ao México, Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá, *N. stramineus* restrito as Antilhas menores (Anguilla, Antígua e Barbuda, Dominica, Guadalupe, Martinica, Montserrat e São Cristóvão e Nevis) e *N. espiritosantensis* (Ruschi, 1951) distribuído abaixo do Rio Amazonas, na América do Sul (Tejedor 2011). Garbino & Tejedor (2013) reconheceram que *N. espiritosantensis* (Ruschi, 1951) trata-se de um sinônimo-júnior de *N. macrourus* (Gervais, 1856).



Figura 5. Distribuição do gênero *Natalus* na América do Sul (Fonte: IUCN 2018, Rocha et al. 2013, Delgado-Jaramillo et al. 2018).

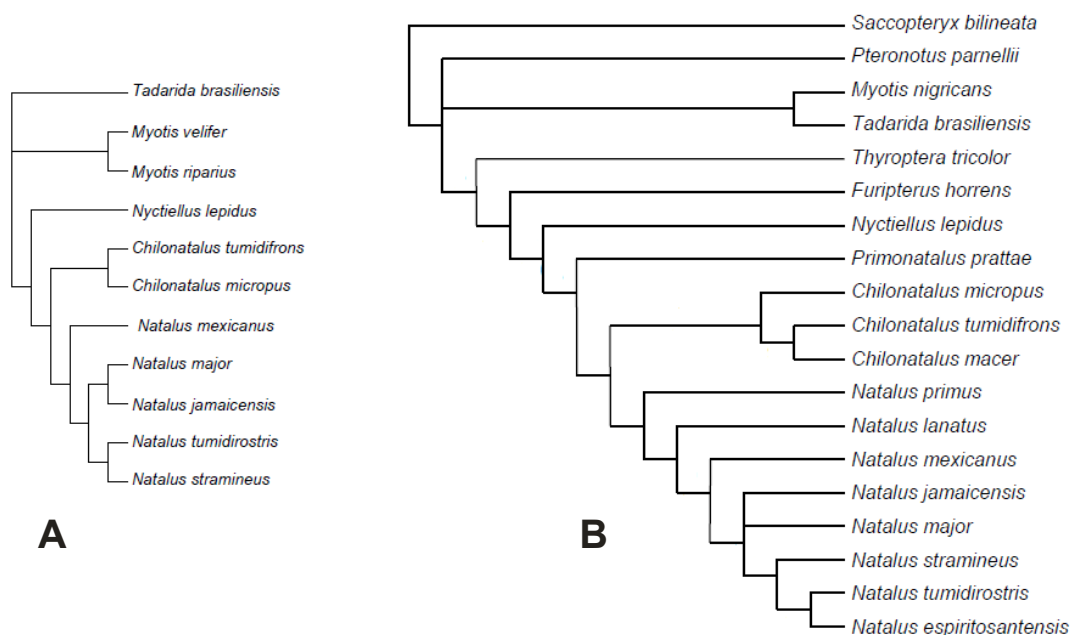


Figura 6. Filogenias prévias da família Natalidae. Adaptado de Dávalos 2005 (A) e adaptado de Tejedor 2007 (B).

No Brasil, há registros de *Natalus macrourus* para os diversos biomas brasileiros, incluindo os ambientes amazônicos (Mok et al. 1982, Taddei & Uieda 2001, Tavares et al. 2012, Tavares et al. 2017, Trajano & Moreira 1991, Zortéa et al. 2015), em áreas mais secas, como ambientes de Caatinga e Cerrado (Delgado-Jaramillo et al. 2018, Esbérard et al. 2005, Feijó & Langguth 2011, Feijó & Rocha 2017, Gregorin & Mendes 1999, Novaes & Laurindo 2014, Rocha et al. 2013, Sbragia & Cardoso 2008, Taddei & Uieda 2001, Tavares et al. 2010, Tejedor 2011, Trajano & Gimenez 1998, Willig 1983) e também em áreas de Mata Atlântica (Esbérard et al. 2010, Ruschi 1951, Taddei & Uieda 2001, Tejedor 2011).

A espécie é exclusivamente cavernícola, com todos os seus registros associados às cavidades (Delgado-Jaramillo et al. 2018, Guimarães & Ferreira 2015, Rocha et al. 2013, Taddei & Uieda 2001, Tejedor 2011). Apesar de apresentar ampla ocorrência na América do Sul, é considerada rara ao longo de sua distribuição, com registros escassos e usualmente associados a determinadas cavernas (Guimarães & Ferreira 2015, Rocha et al. 2013, Tavares et al. 2012) sendo raramente registradas através de capturas por meio de redes de neblina fora, ou longe desse tipo de abrigo (Rocha et al. 2013, Tavares et al. 2012). *Natalus macrourus* organiza-se em colônias que variam em tamanho, de acordo com a literatura, de cinco a 100 indivíduos (Guimarães & Ferreira 2015, Rocha et al. 2013). Estudos em andamento apontam que, para a espécie, apenas 43,2% dos registros publicados, em território brasileiro estão inseridas em

Unidades de Conservação de âmbito estadual ou federal e, excluindo-se os dados referentes às Áreas de Preservação Ambiental (APAs), o valor reduz para 29,7% (Martins et al. In Litt.).

Atualmente, *Natalus macrourus* consta como vulnerável na lista nacional (MMA 2014, MMA 2018), de acordo com o critério A3c, devido ao fato de suas populações correrem o risco de serem reduzidas, por conta de sua associação com os ambientes cavernícolas e a pressão que tais ambientes vêm sofrendo (MMA 2018). Pouco se conhece sobre a biologia de *Natalus* e a sua capacidade de dispersão, sendo o estudo populacional dessa espécie ameaçada de extinção, aliada a avaliação do seu status taxonômico de extrema relevância para compreensão de como as populações estão distribuídas e quais áreas são prioritárias para conservação da espécie.

Os ambientes cársticos no Brasil estão distribuídos esparsamente ao longo do território, formando aglomerados de cavidades em áreas com maior potencial (de acordo com a litologia do terreno) cercados por grandes extensões de áreas sem afloramentos rochosos (CECAV 2013). A espacialização da ocorrência das cavidades ao longo do país pode estar associada a distribuições disjuntas de populações de morcegos que dependem exclusivamente de tais ambientes como abrigo diurno, como hipoteticamente é o caso de *Natalus macrourus*. Ocorrências de espécies de morcegos essencialmente cavernícolas ocupando grandes extensões, aliadas às distribuições disjuntas das áreas cársticas, representam, portanto, potenciais testes de hipóteses de (1) populações estruturadas com diferentes graus de intercâmbio genético (2) potenciais complexos de espécies (Tavares et al. in litt.). De posse dessas informações, os objetivos desse trabalho incluem revisitar a filogenia molecular de Natalidae, com base em dados inéditos de marcadores mitocondriais, incluindo uma amostragem geográfica ampla e com ênfase nos espécimes ocorrentes no Brasil e testar o status da espécie *N. macrourus* e de suas populações de forma a subsidiar ações de conservação e manejo para a espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Analisado

Foram obtidas amostras de DNA de 98 indivíduos de 44 localidades, sendo dez dessas em território brasileiro. A amostragem incluiu indivíduos distribuídos conforme a Figura 7. As amostras incluem indivíduos de áreas cársticas inseridas em litologias ferríferas (áreas de itabiritos e canga), litologias siliciclásticas e litologia carbonáticas, Tabela 8). *Eumops auripendulus* (Shaw, 1800) foi incluído como grupo externo, de acordo com as filogenias mais recentes (Amador et al. 2018, Dávalos 2005, Tejedor 2011). As amostras obtidas foram fornecidas pelas instituições: Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, Manaus, Brasil (INPA); Coleção da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil (CMUFLA); Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (CCT-UFMG); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (MZUSP); Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil (UFPE), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).



Figura 7. Mapa de distribuição das amostras analisadas nesse estudo. Em vermelho estão as sequencias produzidas e em verde as sequencias obtidas via Genbank.

Tabela 8. Lista de amostras utilizadas, localização e marcadores sequenciados.

Amostra	Espécie	Localidade	País	Cyt b	COI	Fonte
Cmic_DR_at158	<i>C. micropus</i>	Barahona	Republica Dominicana	1140		Esse estudo
Cmic_DR_at188	<i>C. micropus</i>	Samaná	Republica Dominicana	1140		Esse estudo
Chilo_21	<i>C.macer</i>	Guanahacabibes	Cuba	1140		Esse estudo
Cmac_CU_Gua	<i>C.macer</i>	Guanahacabibes	Cuba	1140		Esse estudo
Cmac_CU_Maj	<i>C.macer</i>	Galalón	Cuba	1140		Esse estudo
ST372509	<i>N. macrourus</i>	Serra do Tarzan, Carajás	Brasil		611	Esse estudo
ST562519	<i>N. macrourus</i>	Serra do Tarzan, Carajás	Brasil	1091	615	Esse estudo
ST562522	<i>N. macrourus</i>	Serra do Tarzan, Carajás	Brasil	1086	608	Esse estudo
AMC02	<i>N. macrourus</i>	Carajás	Brasil	1135	616	Esse estudo
AMC565	<i>N. macrourus</i>	Carajás	Brasil	1122	580	Esse estudo
VCT1736W	<i>N. macrourus</i>	Carajás	Brasil	502	650	Esse estudo
VCT6251	<i>N. macrourus</i>	Carajás	Brasil	502	645	Esse estudo
AGFC11	<i>N. macrourus</i>	Montividiu, Goiás	Brasil	1076	456	Esse estudo
IAS119	<i>N. macrourus</i>	Chapada Diamantina	Brasil		647	Esse estudo
IAS120	<i>N. macrourus</i>	Chapada Diamantina	Brasil		651	Esse estudo
IAS121	<i>N. macrourus</i>	Chapada Diamantina	Brasil	502		Esse estudo
IAS123	<i>N. macrourus</i>	Chapada Diamantina	Brasil	502	636	Esse estudo
IAS124	<i>N. macrourus</i>	Chapada Diamantina	Brasil	502	648	Esse estudo
PMP174	<i>N. macrourus</i>	Gruta Olhos D'agua, Peruaçu	Brasil	502	654	Esse estudo

Amostra	Espécie	Localidade	País	Cyt b	COI	Fonte
MB2293	<i>N. macrourus</i>	Rio G Norte	Brasil	502		Esse estudo
TE06	<i>N. macrourus</i>	Rio Madeira, Rondonia	Brasil	502	595	Esse estudo
PR169	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1119	567	Esse estudo
PR170	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1122	591	Esse estudo
PR171	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1092	587	Esse estudo
PR172	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1120	569	Esse estudo
PR173	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1120	591	Esse estudo
PR174	<i>N. macrourus</i>	Gruta do Fumaça Sergipe	Brasil	1120	565	Esse estudo
BMC1451	<i>N. macrourus</i>	Altamira, Xingu	Brasil	1076	523	Esse estudo
VCT1811	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil	502	616	Esse estudo
VCT1812	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil	502	463	Esse estudo
VCT1813	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil	502	562	Esse estudo
VCT2402	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil		611	Esse estudo
VCT2662	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil	1085	622	Esse estudo
VCT3491	<i>N. macrourus</i>	Xingu	Brasil	502		Esse estudo
NmajROM125378	<i>N. major</i>	Cueva la Chepa	República Dominicana		657	Genbank
Nmex_STDosd11	<i>N. mexicanus</i>	Michoacán,	México	1140		Esse estudo
Nsmexhap1	<i>N. mexicanus</i>	Juxtlahuaca	México	500		Genbank
Nsmexhap2	<i>N. mexicanus</i>	Juxtlahuaca	México	500		Genbank
Nsmexhap3	<i>N. mexicanus</i>	Juxtlahuaca	México	500		Genbank
Nsmexhap4	<i>N. mexicanus</i>	Etzatlán	México	500		Genbank
Nsmexhap5	<i>N. mexicanus</i>	Etzatlán	México	500		Genbank

Amostra	Espécie	Localidade	País	Cyt b	COI	Fonte
Nsmexhap6	<i>N. mexicanus</i>	Rosario	México	500		Genbank
Nsmexhap7	<i>N. mexicanus</i>	Pescadero	México	500		Genbank
Nsmexhap8	<i>N. mexicanus</i>	Pescadero	México	500		Genbank
Nsmexhap9	<i>N. mexicanus</i>	Troncones	México	500		Genbank
Nsmexhap10	<i>N. mexicanus</i>	Troncones	México	500		Genbank
Nsmexhap11	<i>N. mexicanus</i>	Tuxtla	México	500		Genbank
Nsmexhap12	<i>N. mexicanus</i>	Tuxtla	México	500		Genbank
Nsmexhap13	<i>N. mexicanus</i>	Sán Sebastian	México	500		Genbank
Nsmexhap14	<i>N. mexicanus</i>	Sán Sebastian	México	500		Genbank
Nsmexhap15	<i>N. mexicanus</i>	Sán Sebastian	México	500		Genbank
Nsmexhap16	<i>N. mexicanus</i>	Sán Sebastian	México	500		Genbank
Nsmexhap17	<i>N. mexicanus</i>	Sán Sebastian	México	500		Genbank
Nsmexhap18	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap19	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap20	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap21	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap22	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap23	<i>N. mexicanus</i>	Cántaro	México	500		Genbank
Nsmexhap24	<i>N. mexicanus</i>	Santiago	México	500		Genbank
Nsmexhap25	<i>N. mexicanus</i>	Santiago	México	500		Genbank
Nsmexhap26	<i>N. mexicanus</i>	Cardona	México	500		Genbank
Nsmexhap27	<i>N. mexicanus</i>	Cardona	México	500		Genbank

Amostra	Espécie	Localidade	País	Cyt b	COI	Fonte
NsatROM112172	<i>N. saturatus</i>	Rivas	Nicaragua	1140	657	Genbank
NsAVB08032725	<i>N. mexicanus</i>	Campeche	México		406	Genbank
NsROM95708	<i>N. mexicanus</i>	Campeche	México		657	Genbank
NsROM97440	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97441	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97442	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97443	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97444	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97445	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97518	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM97519	<i>N. mexicanus</i>	Quintana Roo	México		657	Genbank
NsROM99652	<i>N. stramineus</i>	El Progreso	Guatemala		657	Genbank
Nstra_Sb_117119	<i>N. stramineus</i>	Saba	Antilhas Holandesas	628		Genbank
Nstra_Sb_117622	<i>N. stramineus</i>	Saba	Antilhas Holandesas	1140		Genbank
Ntum_AY621008	<i>N. tumidirostris</i>	Tamana Cave	Trinidad	1140		Genbank
Ntum_CO_Z_at88	<i>N. tumidirostris</i>	Sucre	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at103	<i>N. tumidirostris</i>	La Chara	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at106	<i>N. tumidirostris</i>	La Chara	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at108	<i>N. tumidirostris</i>	La Chara	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at113	<i>N. tumidirostris</i>	Paraguana	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at115	<i>N. tumidirostris</i>	Yacaral	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at132	<i>N. tumidirostris</i>	Lagunita	Venezuela	1140		Esse estudo

Amostra	Espécie	Localidade	País	Cyt b	COI	Fonte
Ntum_VE_at133	<i>N. tumidirostris</i>	Lagunita	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at133	<i>N. tumidirostris</i>	Lagunita	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_at136	<i>N. tumidirostris</i>	Lagunita	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_p1	<i>N. tumidirostris</i>	Paraguana	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_p3	<i>N. tumidirostris</i>	Paraguana	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_t2z2	<i>N. tumidirostris</i>	Yacaral	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_z1	<i>N. tumidirostris</i>	La Chara	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_VE_z3	<i>N. tumidirostris</i>	Yacaral	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_ZU_VE_t11	<i>N. tumidirostris</i>	Zulia	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_ZU_VE_t2	<i>N. tumidirostris</i>	Zulia	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_ZU_VE_t3	<i>N. tumidirostris</i>	Zulia	Venezuela	1140		Esse estudo
Ntum_ZU_VE_t4	<i>N. tumidirostris</i>	Zulia	Venezuela	1140		Esse estudo
NtumROM119143	<i>N. tumidirostris</i>	Upper Takutu	Guiana		657	Genbank

Obtenção dos dados

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando kits de extração DNeasy® extraction kits (Qiagen®). Todas as amplificações foram obtidas em reações contendo entre 40-60 ng de DNA, 1.5 U de Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 19 Platinum Taq PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs set (Invitrogen) e 0.3 μ L de cada primer. Os protocolos de amplificação e sequenciamento de DNA estiveram de acordo com Moras (2015) e Tejedor (2007), utilizando os *primers* descritos na Tabela 9, ajustando a temperatura de anelamento para 50°C. Todas as sequências produzidas serão depositadas no Genbank.

Tabela 9. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento das espécies do gênero *Chilonatalus* e *Natalus*, tamanho da sequência de DNA gerada.

Gene	Primers	Sequência (5'-3')	Comprimento bp	Referencia
Cyt b	L14121	GACTAATGACATGAAAAAT CA	1140	Redondo et al. 2008
Cyt b	H15318	TATTCCTTTGCCGGTTTAC AAGACC	1140	Redondo et al. 2008
Cyt b	MVZ4	GCAGCCCCTCAGAATGATA TTTGTCTCTC	610	Smith & Patton 1993
Cyt b	L14881	GACATAATTCCATTCCACC CCTAC	610	Redondo et al. 2008
COI	COX- L2	TGTCTTTAGATTACAGTCT AATGC	1300	Lara-Ruiz et al. 2008
COI	H8121	GGGCAGCCRTGRATTCA YT C	1300	Sorenson 2003
COI	LCO14 90	GGTCAACAAATCATAAAGA TATTGG	657	Folmer et al. 1994
COI	COXIIH	ACTTCAGGGTGTCCGAAGA ATCA	657	Lara-Ruiz et al. 2008

A qualidade de todas as sequências produzidas foi checada por meio dos softwares Geneious 8.1.6 (www.geneious.com) e DNA Baser Sequence Assembler v4 (Heracle BioSoft 2013). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o algoritmo Muscle (Edgar 2004) implementado no MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016) e checada quanto a sua tradução.

Análises

Análises filogenéticas

Para obter os modelos de evolução melhor ajustados aos dados, incluindo partições por códon foi utilizado o software Partition Finder 1.1.1 (Lanfear et al. 2012), utilizando o critério de informação bayesiana (BIC). As análises foram realizadas com os dados de cada marcador em separado (Cyt B e COI) e concatenando os dois marcadores. As sequências foram concatenadas utilizando-se o software Mesquite 3.6 (Maddison & Maddison, 2018).

As análises de inferência bayesiana (IB) para estimar as relações filogenéticas foram feitas utilizando o software MrBayes 3.2.3 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) conforme implementado na plataforma CIPRES (Miller, Pfeifer & Schwartz 2010). Quatro cadeias Markov simultâneas foram analisadas por 20 milhões de gerações, com árvores amostradas a cada 200 delas, sendo os primeiros 10% descartadas como *burn-in*. O número de gerações necessárias para a corrida e para o *burn-in* foram determinadas após análise do lnL (log-likelihood) no software Tracer 1.6 (Rambaut e Drummond, 2007).

Limites interespecíficos

Para testar limites interespecíficos foi empregado uma derivação (multi-rate, mPTP) do método PTP, “Poisson Tree Process” utilizado para inferir espécies putativas levando-se em conta o input de uma árvore filogenética sem a necessidade de árvores ultramétricas (Zang et al. 2013). O teste mPTP também promove uma análise da diversidade genética a partir da história evolutiva, mas foi considerado mais preciso com relação a definição taxonômica de espécies (Kapli et al. 2017).

Variação Genética, Populacional e Filogeografia

Para estimar as distâncias genéticas intraespecíficas entre os clados recuperados nas análises filogenéticas, para cada gene separadamente, foi utilizado o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P, Kimura 1980), que considera as probabilidades diferentes das taxas de

transições e transversões nas sequências analisadas, conforme implementado no software MEGA7.0 (Tamura et al. 2013).

As análises populacionais também foram conduzidas para cada marcador avaliado, por meio do software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). As redes de haplótipos foram geradas a partir do algoritmo de median joining (Bandelt et al. 1999), e elaboradas no software Haplotype viewer (Ewing 2016).

Os seguintes parâmetros populacionais foram aferidos:

Tamanho amostral (N) número de indivíduos de cada grupo (e.g. clados recuperados na filogenia);

Número de haplótipos (H), número de indivíduos de uma mesma população com sequências de DNA diferentes entre eles;

Diversidade haplotípica, H_d , probabilidade de que, dadas duas sequências, essas sejam diferentes em uma população;

Número de sítios polimórficos, S, variações nas posições de mutações;

Diversidade nucleotídica, π , número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio entre sequências e;

Média de diferenças nucleotídicas (mutações) par a par, K.

Para estimar a diversidade molecular utilizando parâmetros de genética de populações foram ainda calculados os valores de **FST** e para testar a neutralidade (ausência de seleção e informações sobre expansão e retração populacional) foram feitos o teste **D** de Tajima (1989) e o **F** de Fu (1997) conforme implementados no programa DNAsp (Librado & Rozas 2009).

Finalmente, testes exatos e análises de variância molecular (AMOVA, Excoffier & Lischer 2010) foram elaborados para avaliar estruturação genética em *Natalus macrourus*, a partir dos grupos recuperados pelas análises filogenéticas e populacionais, ambos realizados no software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). As análises espaciais da variância molecular foram produzidas através do software SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al. 2002). Para avaliar a variação genética com relação às distâncias geográficas foram realizados testes de Mantel por

meio de estimativa do algoritmo de Monmonier conforme implementado no software Alleles in Space (Miller 2005).

As Análises Bayesianas de Estruturação Populacional (Bayesian Analysis of Genetic Population Structure) foram realizadas por meio do software BAPS 4.14 (Corander et al. 2007). Nesta análise, o número de grupos é definido usando-se um algoritmo que estima a distribuição das frequências alélicas de todas as populações em teste. Populações homogêneas são agrupadas a cada análise, sendo feitas novas distribuições usando populações combinadas até encontrar a partição ideal (Corander et al. 2007).

RESULTADOS

Análises filogenéticas

Como a distribuição dos dados foi distinta para cada marcador apresento uma breve análise dos resultados obtidos por marcador e depois por meio das análises concatenadas. De modo geral, diferentes espécies de *Natalus*, conforme atualmente reconhecidas, estão distribuídas parafileticamente ao longo da árvore, ora dispersas ao longo dos clados, ora formando clados de baixo suporte.

Os resultados obtidos a partir dos dados de Cyt B apontam as espécies de *Chilonatalus* como grupos irmãos do gênero *Natalus*, sendo *C. macer* táxon-irmão de *C. micropus*, que é, por sua vez, irmão de *Natalus*. As espécies de *Natalus*, conforme atualmente reconhecidas, estão distribuídas em dois grandes clados com baixo suporte: os *N. mexicanus* e um clado incluindo espécimes atribuídos a *N. macrourus*, *N. stramineus* e *N. tumidirostris* (clado 02, Figura 8). Um indivíduo de *N. macrourus*, coletado em Rondônia ramifica-se em separado de indivíduos e agrupamentos de *N. tumidirostris*, *N. stramineus* e *N. macrourus* (clados 03-06, Figura 8). *N. tumidirostris* é parafiletico de acordo com os dados e análises, dividindo-se em um clado contendo indivíduos de diferentes localidades da Venezuela e outro clado, incluindo indivíduos de *N. tumidirostris* de Sucre, Venezuela e um de Trinidad e *N. stramineus* de Saba, nas Antilhas menores (clado 06, Figura 8). Dentro de *Natalus macrourus*, observou-se um clado unindo espécimes do nordeste (Sergipe, clado 07, Figura 8) como grupo irmão dos demais *N. macrourus* (clado 08, Figura 8).

Os dados de Citocromo oxidase (COI) colocam *Natalus major* (endêmico de Espanha) na base de um grande clado praticamente sem suporte de *Natalus* que se bifurca em um clado contendo *N. mexicanus* e *N. s. saturatus* (sinônimo de *N. mexicanus*, Tejedor 2011), e no clado irmão contendo *N. tumidirostris* da Guiana como táxon irmão de *Natalus macrourus* (clado 13, Figura 8). O indivíduo de *N. macrourus* de Rondônia é o ramo sucessivo a *N. tumidirostris* da Guiana, sendo irmão de um grande clado que inclui todos *N. macrourus* brasileiros restantes (clado 14, Figura 8). Os *macrourus* estão organizados de forma similar ao que foi recuperado de acordo com as análises de Cyt B (à exceção do ramo de Rondônia): um clado do NE brasileiro (Sergipe) e os demais indivíduos agrupados (clado 17, Figura 8).

Na árvore combinada (Figura 9), aparece a relação de *Chilonatalus* como grupo irmão de *Natalus*, refletindo os resultados obtidos para a árvore produzida a partir da análise do citocromo B. Da mesma forma, *N. major* é irmão dos demais *Natalus*, conforme aparece na árvore resultante a partir da análise de COI, uma vez que somente obtivemos dados de COI dessa espécie. *Natalus*, à exceção de *N. major*, forma um grande clado efêmero, sem suporte (0.55). Dentro desse clado, *mexicanus*, *stramineus* e *saturatus* se encontram dispersos e sem definição em termos de topologia, constituindo, de modo geral, uma politomia, com algumas exceções - nesses casos, a topologia é similar aos resultados obtidos com os marcadores separados: forma-se o clado com um indivíduo de *tumidirostris* de Sucre, Venezuela e um de Trinidad e de *N. stramineus* de Saba, nas Antilhas menores, como na árvore baseada nos dados de citocromo B; o ramo do indivíduo de *macrourus* de Rondônia é irmão de todos os demais *macrourus*, conforme recuperado pelos dados de COI. Os demais *macrourus* estão organizados formando um clado de Sergipe, um pequeno clado com um indivíduo de Sergipe e um indivíduo do Rio Grande do Norte e um grande clado contendo indivíduos do baixo-médio Xingu, da Chapada Diamantina (Bahia) e do Vale do Peruaçu, no norte de Minas Gerais, Sudeste brasileiro.

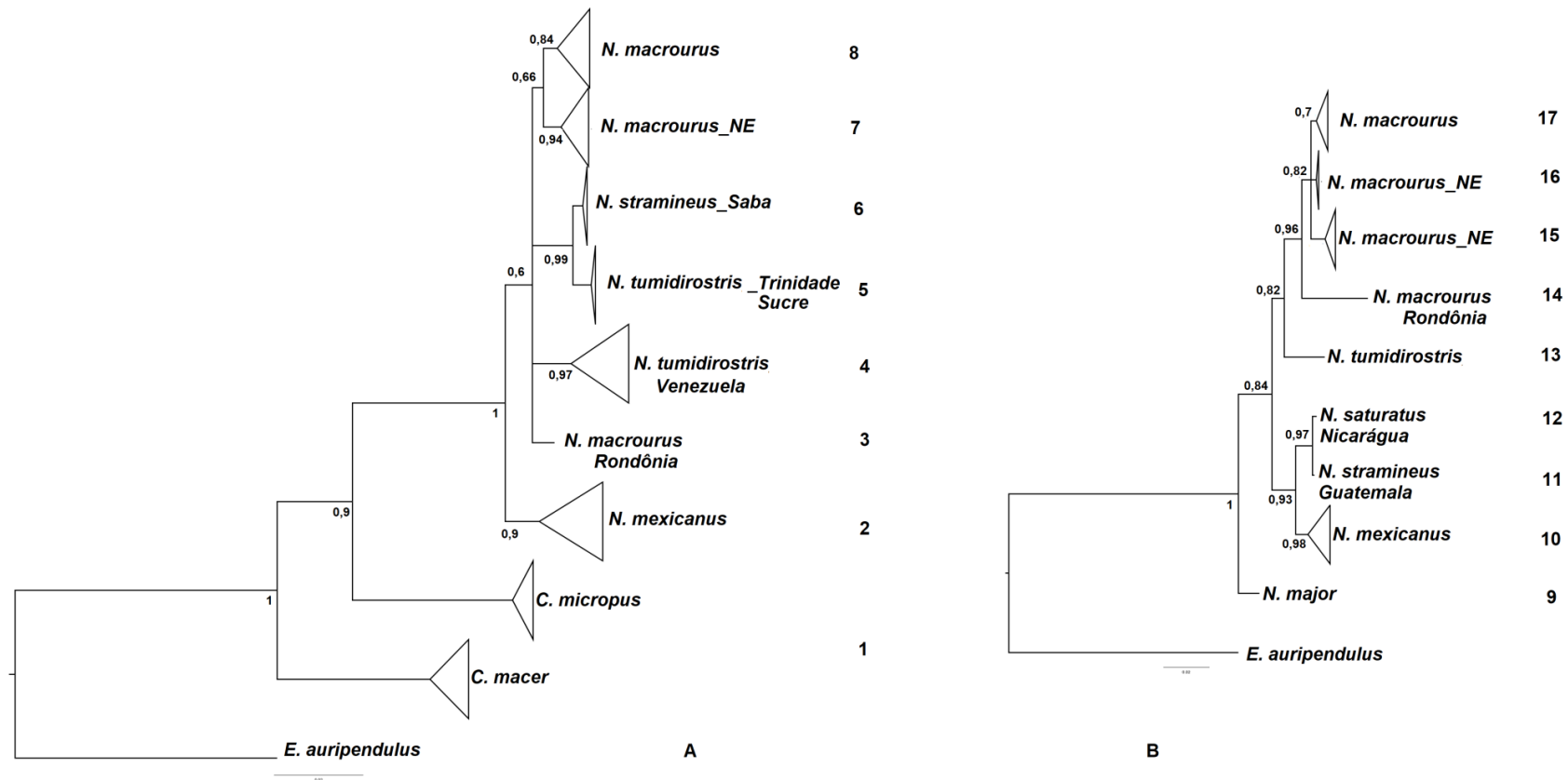


Figura 8. Filogenia da família Natalidae e grupo externo inferida a partir de análises Bayesianas de 1140pb para Cyt B (A) e 657pb de COI. Números na base representam valores de probabilidade posterior (PP) e números após os taxa terminais indicam, a saber: (1) *Chilonatalus macer*, *Chilonatalus micropus* (2) *N. mexicanus* (3) *N. macrourus* (RO), (4) *N. tumidirostris* Venezuela (5) *N. tumidirostris* Trinidad e Venezuela (6) *N. stramineus* (7) *N. macrourus* Nordeste brasileiro, (8) *N. macrourus* FLONA Carajás- Pará, Altamira-Pará, Peruaçu-MG, Chapada Diamantina-BA, Montividiu, GO, (9) *N. major*, (10) *N. mexicanus*, (11) *N. stramineus* Guatemala, (12) *N. saturatus* Nicarágua, (13) *N. tumidirostris* (14) *N. macrourus* (RO), (15) *N. stramineus* Nordeste brasileiro, (16) *N. stramineus* Nordeste brasileiro e (17) *N. macrourus*, demais localidades.

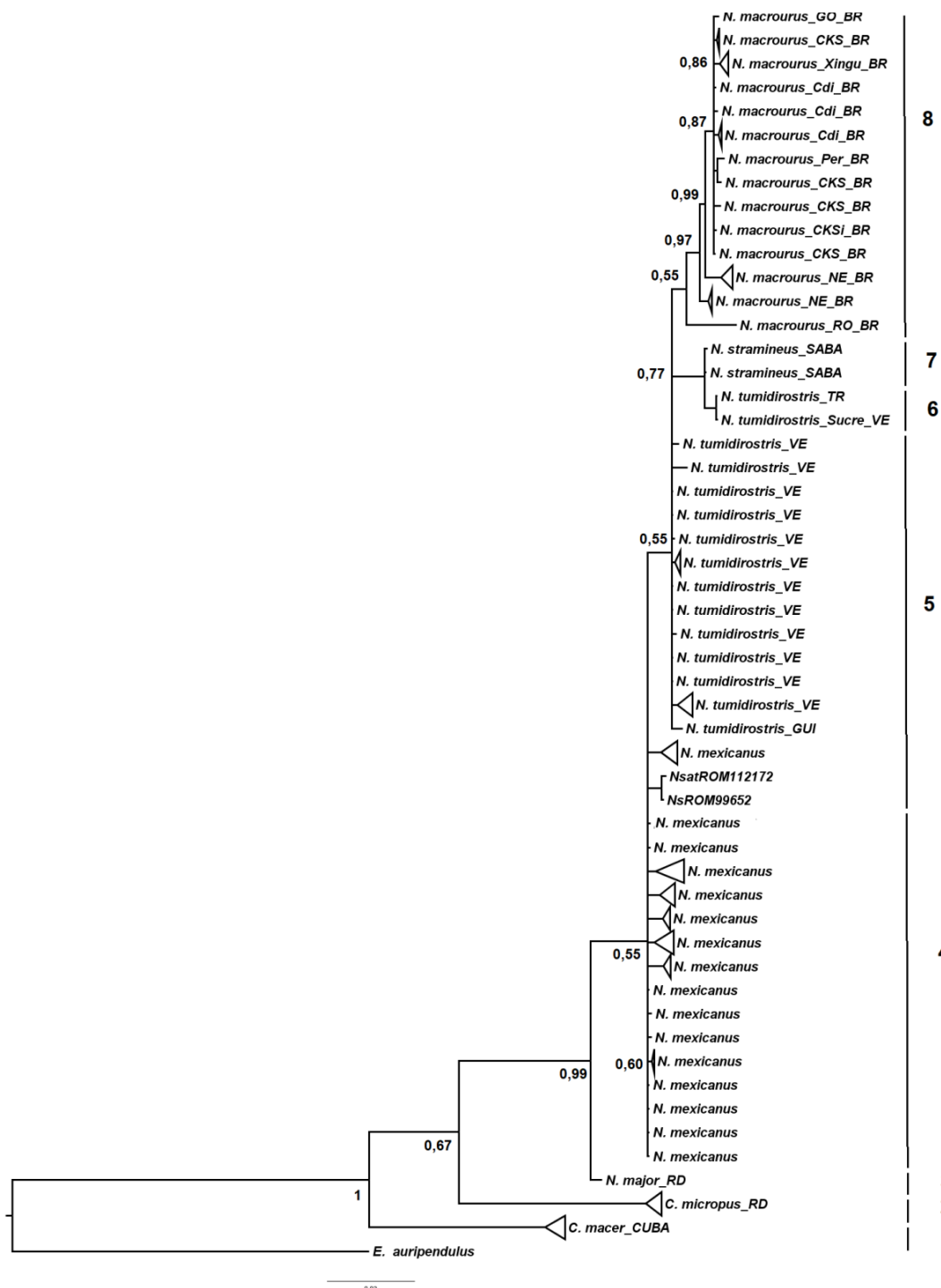


Figura 9. Filogenia da família Natalidae e grupo externo inferido a partir de análises Bayesianas baseada em 1797 loci mitocondriais. Números à esquerda da árvore representam valores de probabilidade posterior (PP) e à direita os cladogramas (1) *Chilonatalus macer*, Cuba (2) *Chilonatalus micropus*, República Dominicana (3) *Natalus major*, República Dominicana (4) *Natalus mexicanus*, (5) *Natalus tumidirostris*, Venezuela (6) *Natalus tumidirostris*, Trinidad e Sucre, Venezuela (7) *Natalus stramineus*, Saba (8) *Natalus macrourus*, Brasil.

O gênero *Chilonatalus* divergiu de *Natalus* em cerca de 12% em termos do Cit B. Os testes de divergência genética entre as espécies de *Natalus* conforme a taxonomia corrente apontam valores moderados a baixos de diferenciação para ambos os marcadores mitocondriais, entre 2 e 4% para citocromo B e entre 1 e 5% para o COI. Dentro de *Natalus* as menores divergências foram observadas entre *N. mexicanus* e *N. s. saturatus* (COI 1%) e *N. stramineus* e *N. tumidirostris* (Cyt B 2% e COI 3%) e as maiores divergências foram, para o Cyt B e o COI, cerca de 4% entre os pares de *N. mexicanus* e as outras duas espécies continentais (*macrourus* e *tumidirostris*) e entre *mexicanus* e *stramineus* e somente para o COI entre a espécie endêmica da ilha de Espanhola (República Dominicana e Haiti) (*N. major*) e *macrourus* (5%) (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de divergência genética considerando os marcadores Citocromo B e COI entre espécies conforme a taxonomia corrente e de acordo com Kimura 2P. Linhagens: Outgroup (*Eumops auripendulus*); Chilo: *Chilonatalus micropus*; Nmac: *Natalus macrourus*; Nmex: *N. mexicanus*; Nstr; *N. stramineus*, Ntum: *N. tumidirostris*.

Citocromo B	Out	Chilo	Nmac	Nmex	Nstr	Ntum
Outgroup	*					
Chilo	0,20	*				
Nmac	0,21	0,12	*			
Nmex	0,2	0,12	0,04	*		
Nstra	0,19	0,12	0,03	0,04	*	
Ntum	0,20	0,12	0,03	0,04	0,02	*

COI	Out	Nmac	Nmaj	Nsat	Nstr	Ntum
Outgroup	*					
Nmac	0,22	*				
Nmaj	0,21	0,05	*			
Nsat	0,21	0,04	0,04	*		
Nmex**	0,21	0,04	0,04	0,01	*	
Ntum	0,23	0,04	0,04	0,03	0,03	*

** As sequências estão identificadas juntos ao Genbank como pertencentes a *Natalus stramineus*, mas são provavelmente indivíduos de *N. mexicanus*, tendo sido depositadas previamente a revisão do gênero que restringiu *N. stramineus* às Antilhas menores (Tejedor 2011).

Os testes de delimitação de espécies recuperam as espécies do gênero *Chilonatalus*,

Natalus major e *N. mexicanus* como distintas e *N. stramineus*, *N. s. saturatus* e *N. tumidirostris* como parte de uma mesma espécie, exceto pelo espécime de Rondônia de *Natalus macrourus* que aparece como uma espécie diferente (Figura 10). Os agrupamentos gerados pelo teste de delimitação se repetiram nas análises populacionais realizadas (apresentadas no próximo tópico).

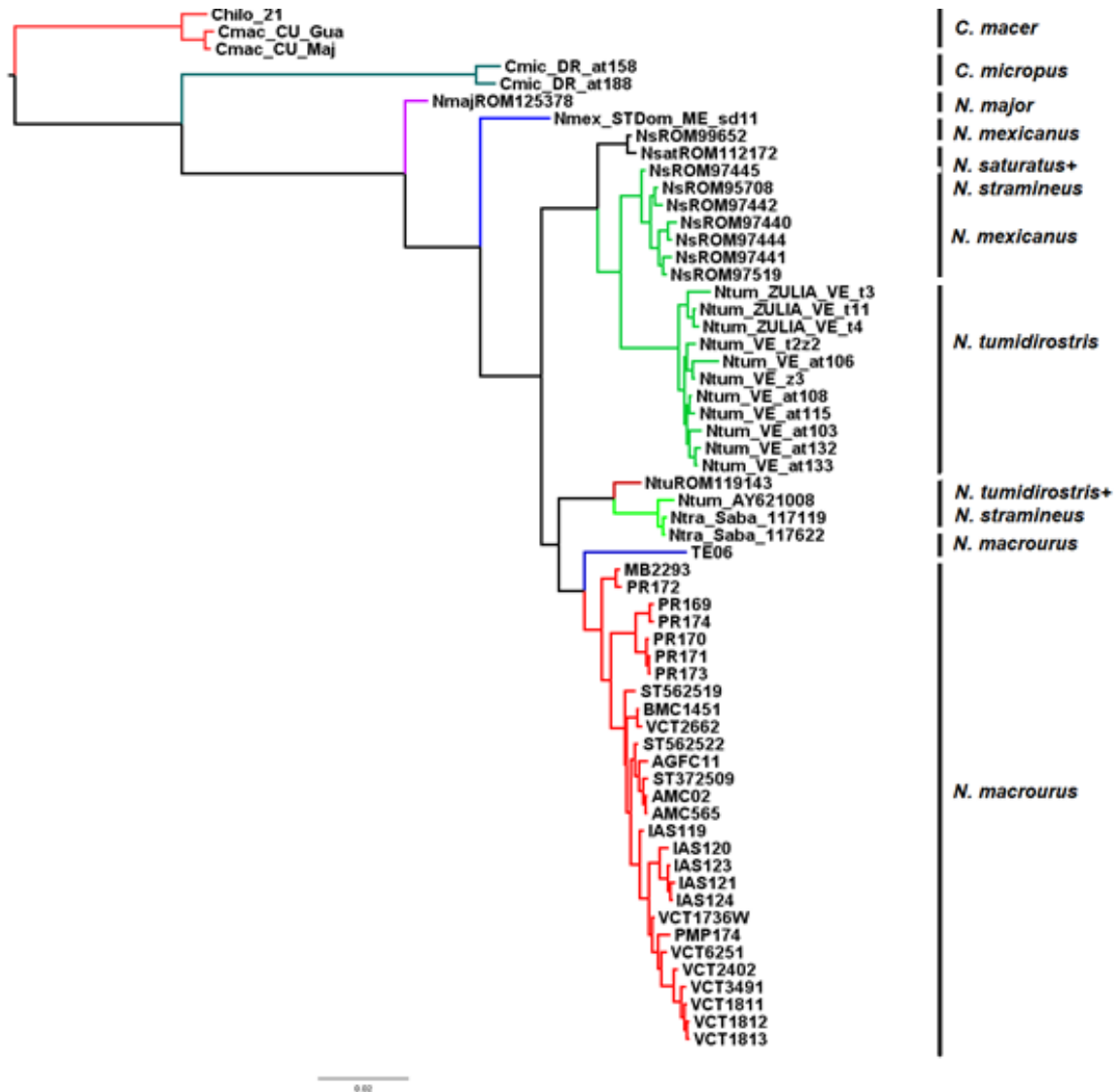


Figura 10. Resultados dos testes mPTP para delimitação de espécies a partir dos dados concatenados de COI e CitB, para os gêneros *Chilonatalus* e *Natalus*.

Análises Populacionais

Para *Natalus macrourus* foram identificados 13 haplótipos do gene citocromo B e 15 haplótipos do marcador citocromo oxidase. A listagem dos haplótipos de cada marcador está na Tabela 11 e as redes haplotípicas estão representadas nas Figura 12 e Figura 13. Em sua maioria os haplótipos são únicos e apenas um haplótipo citocromo b (Hap_1, Goiás+Carajás) foi compartilhado entre localidades (Tabela 11). A listagem de haplótipos identificada para cada indivíduo (Tabela 11) aponta compartilhamento entre localidades distintas para Citocromo B, Hap 1 (Goiás e Carajás) e para o Citocromo Oxidase os haplótipos Hap 4 e Hap 6 (Chapada Diamantina e Carajás).

Tabela 11. Lista dos espécimes de *Natalus macrourus* e respectivos haplótipos identificados.

Haplótipos	
Citocromo B	COI
Hap 1: AGFC11, AMC02, AMC565	Hap 1: AGFC11
Hap 2: BMC1451, VCT2662	Hap 2: AMC02, AMC565, ST372509
Hap 3: IAS121, IAS123, IAS124	Hap 3: BMC1451
Hap 4: PMP174	Hap 4: IAS119, VCT1736W, VCT6251
Hap 5: PR169, PR174	Hap 5: IAS120
Hap 6: PR170, PR171, PR173	Hap 6: IAS123, IAS124, ST562522
Hap 7: PR172	Hap 7: MB2293, PR172
Hap 8: ST562519	Hap 8: PMP174
Hap 9: ST562522	Hap 9: PR169
Hap 10: TE06	Hap 10: PR170, PR171, PR173
Hap 11: VCT1736W	Hap 11: PR174
Hap 12: VCT1811, VCT1812, VCT1813, VCT3491	Hap 12: ST562519
Hap 13: VCT6251	Hap 13: TE06
	Hap 14: VCT1811, VCT1813, VCT2402, VCT2662
	Hap 15: VCT1812

Os testes de neutralidade para os dados mitocondriais concatenados de *Natalus*

macrourus não apresentaram, para o valor do teste Tajima's D e de Fu's significância na amostragem, conforme Tabela 12.

Tabela 12. Testes de neutralidade para os dados mitocondriais concatenados. N= número de amostras, D teste de neutralidade Tajima, P valor de significância, Ne número esperado de alelos, Fs teste de neutralidade Fu

		Carajás	Xingu	Chapada Diamantina	Nordeste
Tajima's D	N amostras	6	6	4	6
	Tajima's D	-0,060	1,124	0	-0,398
	P	0,481	0,880	1	0,388
Fu's FS	Exp. N Alelos	5	3	1	5
	FS	-1,565	0,61	0	0,48
	P	0,06	0,57	1	0,48

Os valores de FST calculados par a par para cada uma das populações apresentaram significância apenas para os dados entre as populações de Carajás e Xingu, e Carajás e Chapada Diamantina, de citocromo b (Tabela 13) e Carajás e Xingu, Carajás e Nordeste, e Xingu e Chapada Diamantina. Os valores de FST obtidos foram compatíveis com projeções de contatos genéticos entre as populações, apontando assim uma baixa estruturação, variando de valores significativos de zero para COI (Carajás-Xingu, Carajás-Nordeste, Xingu-Nordeste) até 0,018 (Carajás-Chapada Diamantina, Carajás-Xingu). A baixa amostragem para as populações apresentadas pode reduzir a robustez dos testes populacionais.

Tabela 13. Valores de F_{ST} para os marcadores Citocromo b e COI de *Natalus macrourus* e distância geográfica em km (diagonal superior).

		Carajás	Xingu	Chapada Diamantina	Nordeste
Citocromo b	Carajás	*	450	1446	1498
	Xingu	0,02	*	1747	1773
	C. Diamantina	0,02	0,054	*	2038
	Nordeste	0,99	0,99	0,99	*
COI	Carajás	*			
	Xingu	0	*		
	C. Diamantina	0,252	0,027	*	
	Nordeste	0	0	0	*

As estimativas bayesianas de estruturação populacional, incluindo todos os táxons, apontam para um grande compartilhamento de haplótipos, inclusive com alguns ocorrendo em mais de uma espécie (e.g. *N. stramineus*, *N. tumidirostris* e *N. macrourus* - Figura 11). As populações de *N. macrourus* apresentaram, além de um elevado compartilhamento de haplótipos dentro da espécie, alguns haplótipos observados compartilhados com a espécie *N. mexicanus*. Assim como nas análises filogenéticas e as de delimitação de espécies, as análises populacionais apontaram para uma alta similaridade entre táxons de espécies distintas.

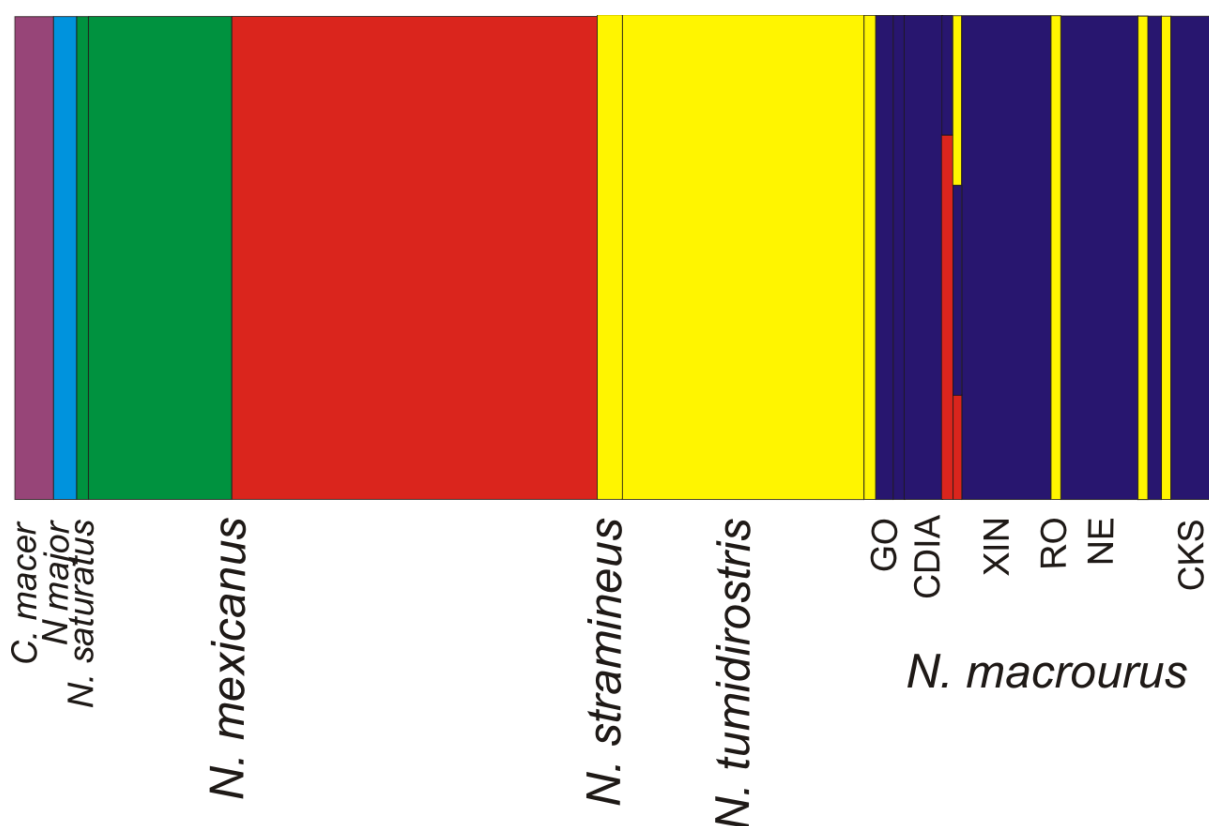


Figura 11. Resultado da análise espacial de estruturação genética utilizando os dados concatenados (Cyt B+COI) do gênero *Natalus*. Para *Natalus macrourus*, Go - Goiás, CDIA - Chapada Diamantina, XIN – Xingu, RO – Rondônia, NE – Nordeste, CKS – Carajás.

A rede gerada para os dados de citocromo B mostra o compartilhamento de um haplótipo (Hap 1) entre o indivíduo registrado em Goiás e dois indivíduos de Carajás, capturados em Serra Norte (AMC02 e AMC565). O número de passos mutacionais acumulados entre os haplótipos foi baixo, apontados entre os clados do nordeste, com os haplótipos identificados para Goiás, Carajás, Xingu e Chapada Diamantina, estando proximamente alinhado, conforme pode ser observado na Figura 12.

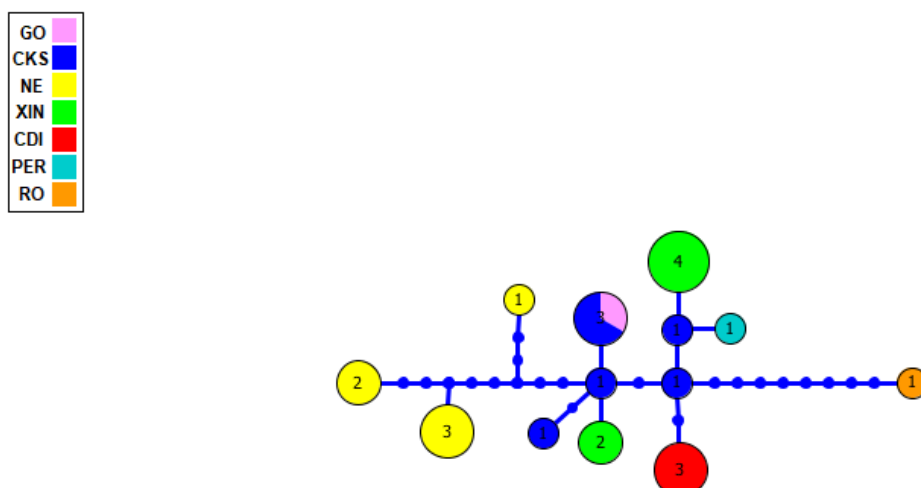


Figura 12. Rede de haplótipos gerada a partir dos dados de Citocromo B para *Natalus macrourus*: GO, Montividiu, Goiás, CKS (FLONA Carajás, Serra Norte de Sul), NE Nordeste (Rio Grande do Norte e Sergipe), Xingu (Altamira, Baixo e médio Xingu), CDI (Chapada Diamantina), PER, PARNA Cavernas do Peruaçu, RO, Rondônia, rio Madeira.

Em relação aos dados haplotípicos do marcador Citocromo oxidase é possível observar uma maior similaridade (e.g. menor número de sítios polimórficos) entre os haplótipos existentes nas localidades do Nordeste, parte da Chapada Diamantina e Xingu. Adicionalmente, parte dos haplótipos registrados para a Chapada Diamantina, Peruaçu e Carajás apresentaram também baixos números de mutações (Figura 13). O espécime registrado em Rondônia apresentou o maior número acumulativo de mutações, sendo o mais divergente na rede gerada.

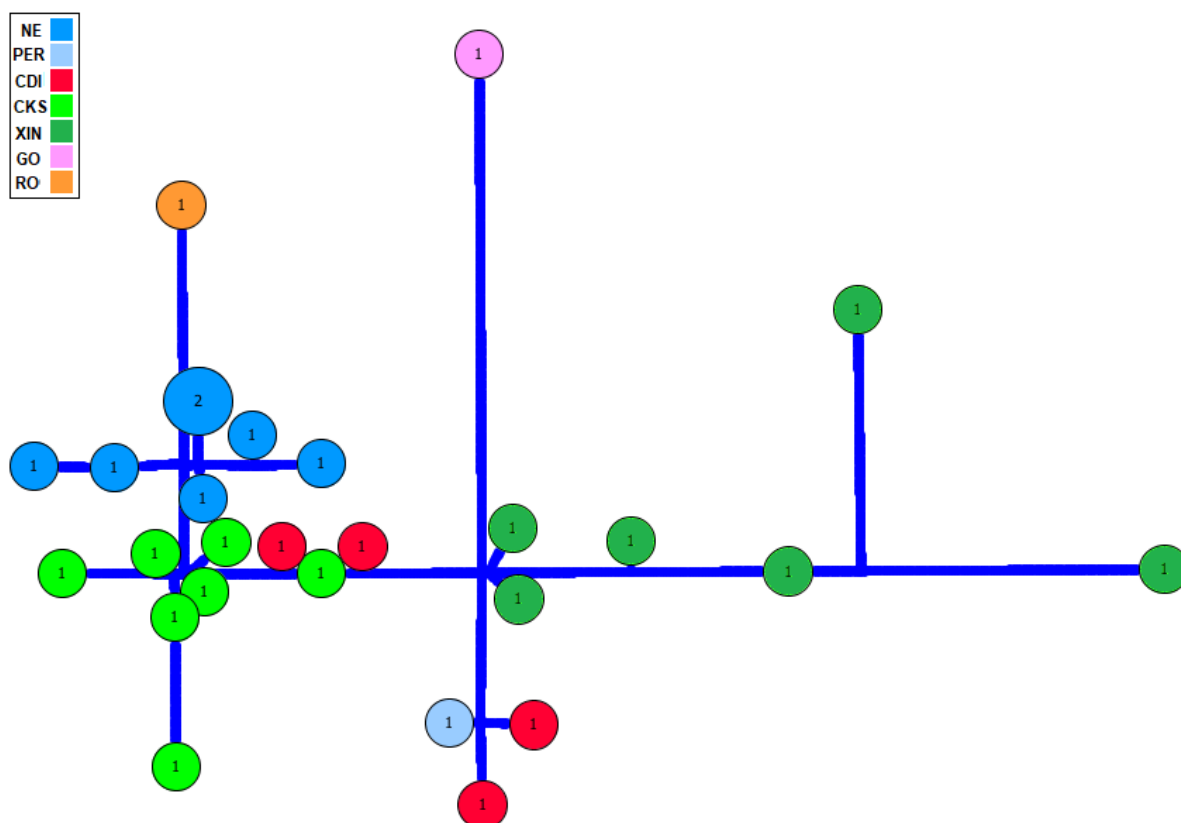


Figura 13. Rede de haplótipos gerada a partir dos dados de Citocromo Oxidase (COI) para *Natalus macrourus*: GO, Montividiu, Goiás, CKS (FLONA Carajás, Serra Norte de Sul), NE Nordeste (Rio Grande do Norte e Sergipe), Xingu (Altamira, Baixo e médio Xingu), CDI(Chapada Diamantina), PER, PARNA Cavernas do Peruaçu, RO, Rondônia, rio Madeira.

A análise de variância molecular (AMOVA) aponta uma maior variação entre os grupos formados (Cyt B 55%; COI 72%) que dentro dos grupos (Cyt B 31%; COI 33%) com valores moderados de F_{ST} para ambos os marcadores, sugerindo um médio grau de divergência entre as populações testadas, conforme os valores apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre haplótipos das populações de *Natalus macrourus* utilizando sequências de Citocromo B e COI.

AMOVA	Fonte de Variação	GL	Variação (%)	P-valores
Citocromo b	Entre Grupos	4	55,37	P<0,0001
	Dentro de Grupos	17	31,3	P<0,0001
	F_{ST}	0,687		
	F_{SC}	0,298		
	F_{CT}	0,553		

AMOVA	Fonte de Variação	GL	Variação (%)	P-valores
COI	Entre Grupos	4	72,28	P<0,0001
	Dentro de Grupos	20	33,27	P<0,0001
	FST	0,667		
	FSC	-0,20		
	FCT	0,772		

De acordo com os dados, as populações de *Natalus macrourus* do Nordeste apresentaram divergência com valores entre 1-2,3% em relação aos demais *N. macrourus* do país (Tabela 15). O espécime coletado no estado de Rondônia, às margens do rio Madeira, apresentou maior divergência em relação ao demais espécimes, entre 2,2 e 4,7% de variação.

Tabela 15. Valores de divergência genética considerando os marcadores Citocromo B e COI entre as populações de *N. macrourus*, de acordo com Kimura 2P. Populações: OUT, *outgroup* (*E. auripendulus*), CKS&SE (FLONA Carajás e Sudeste), XIN (Pedrais do Baixo e médio Xingu), CDI (Chapada Diamantina), NE (Rio G Norte+Sergipe, RO (Rondônia).

		CKS&SE	XIN	CDI	NE	RO	OUT
Cyt B	CKS&SE						
	XIN	0,007					
	CDI	0,007	0,009				
	NE	0,017	0,019	0,023			
	RO	0,023	0,023	0,022	0,022		
	OUT	0,213	0,211	0,206	0,220	0,203	
COI	CKS&SE						
	XIN	0,005					
	CDI	0,001	0,004				
	NE	0,010	0,011	0,009			
	RO	0,041	0,041	0,041	0,047		
	OUT	0,230	0,230	0,228	0,230	0,241	

O teste de mantel executado para avaliar se a divergência genética observada entre as amostras moleculares está relacionada com a distância geográfica apontou uma correlação moderada entre as matrizes de distância geográfica e distância genética entre as amostras de *N. macrourus* ($R=0,504$, $P<0,01$). O correlograma entre as matrizes geradas aponta que há correlação espacial entre as populações testadas, sugerindo aumento da distância genética com aumento da distância geográfica (Figura 14).

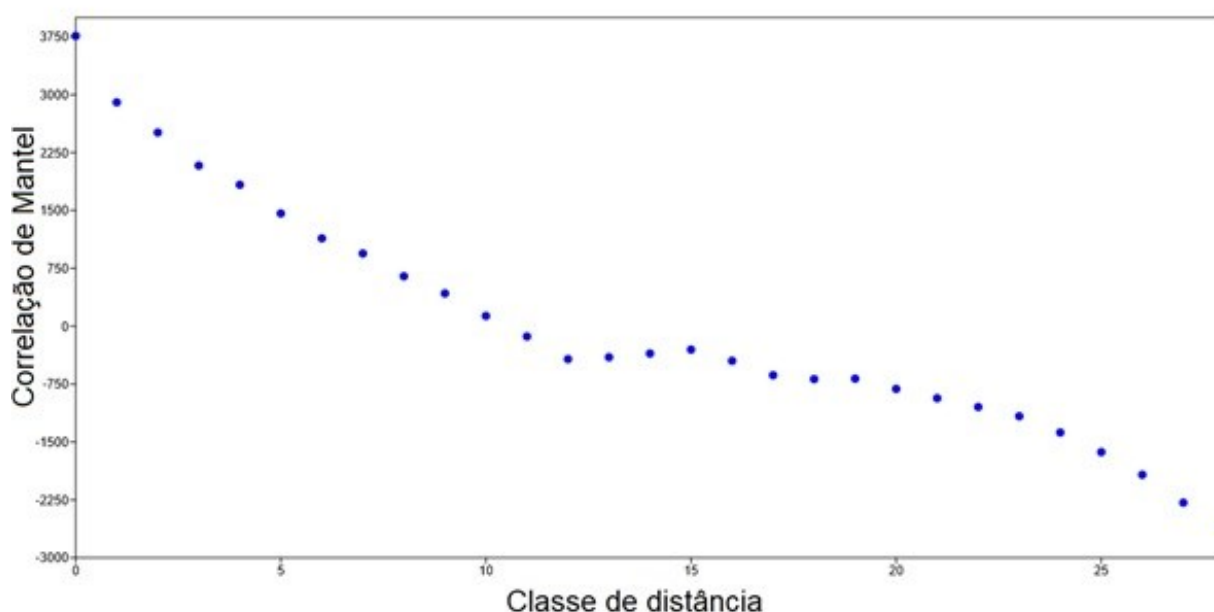


Figura 14. Correlograma de mantel mostrando correlação espacial (Correlação de mantel) para os dados concatenados (Cyt B+COI), distribuídos de acordo com as classes de distância, após progressiva correção de Bonferroni ($R=0,504$, $p<0,01$).

DISCUSSÃO

Grande parte da diversidade da família Natalidae encontra-se distribuída em ilhas (Tejedor et al. 2005, Tejedor 2011), incluindo a ocorrência de quatro espécies endêmicas do Caribe, *Natalus primus* (Guanahacabibes, Cuba), *Natalus jamaicensis* (Jamaica), *Natalus stramineus* (Antilhas, Antígua e Barbuda, Dominica, Martinica e Guadalupe) e *Natalus major* (Ilha de Espanhola; Republica Dominicana e Haiti) (IUCN 2019, Tejedor 2011) e, apesar da América do Sul apresentar maior extensão territorial, há o registro de apenas duas espécies: *N. tumidirostris* e *N. macrourus* (Dávalos 2005, Tejedor 2007, Tejedor 2011). Estudos previamente realizados incluíram poucos marcadores moleculares de um número restrito de

espécies. Arroyo-Cabrales et al. (1997) utilizou alozimas para avaliar populações continentais e insulares de *Natalus mexicanus* e *N. stramineus*. Dávalos (2005) propôs uma filogenia molecular para o gênero, incluindo parte dos táxons conhecidos e López-Wilchis et al. (2012) testaram estruturação populacional em *Natalus mexicanus*, invalidando o táxon *N. lanatus*, descrito como espécie nova por Tejedor (2005). Dados que consideraram sequências ou a variação molecular de *Natalus macrourus* não foram utilizados em tais análises.

Os resultados suportam a monofilia da família Natalidae, corroborando com as filogenias prévias do grupo, tanto para dados morfológicos quanto genéticos (Dávalos 2005, Morgan & Czaplewsky 2003, Tejedor 2007). Nas análises filogenéticas, o gênero *Chilonatalus* como recuperado como irmão em relação às demais espécies do gênero *Natalus*. Os clados incluindo *Chilonatalus* e *Natalus* foram, respectivamente, fortemente e fracamente suportados (1 e 0,87 IB). Dávalos (2005) e Morgan e Czaplewsky (2003) obtiveram valores moderados de bootstrap (76% e 58%, respectivamente) de diferenciação entre *Chilonatalus* e *Natalus* e, no passado, já foram tratados como únicos (Dalquest 1950, Goodwin 1959, Hall 1982, Koopman, 1994, Varona 1974).

Considerando apenas os dados morfológicos e dados morfológicos concatenados com moleculares, os gêneros são marcadamente divergentes (Dávalos 2005, Morgan & Czaplewski 2003, Tejedor 2007). Os dados aqui analisados, considerando os marcadores mitocondriais, não recuperaram *Chilonatalus* como um grupo monofilético, apresentando *C. macer* como irmão de *C. micropus* e dos demais *Natalus*. Os resultados divergem dos obtidos com dados morfológicos e concatenados (Dávalos 2005, Tejedor 2007), onde ambos os táxons formaram um clado monofilético, mas, ao considerar apenas o marcador mitocondrial (Cítocromo B), a monofilia do gênero não foi recuperada em estudo anterior (Dávalos 2005). Marcadores genéticos com taxas de evolução rápidas como observado nos genes mitocondriais podem ocasionar os padrões observados, corroborando a hipótese de que o gênero divergiu mais cedo na história evolutiva da família (Allio et al. 2017, Avise 2000, Dávalos 2005, Mendes et al. 2016).

Analisando o clado referente ao gênero *Natalus*, *N. major* foi recuperado como táxon irmão dos demais dentro do grupo, com elevado grau de suporte (0,99 IB). Arroyo-Cabrales et al. (1997), utilizando alozimas, também encontrou *N. major* como basal aos demais *Natalus* analisados. Para López-Wilchis et al. (2012), o táxon também aparece como irmão dos demais *Natalus*, se posicionando como grupo irmão de *N. jamaicensis*. Morgan & Czaplewsky (2003),

considerando dados morfológicos, recuperaram *N. major* como grupo irmão de *N. tumidirostris* e *N. stramineus*, enquanto Tejedor (2007) recuperou o táxon como grupo irmão de *N. stramineus*, *N. tumidirostris* e *N. macrourus*. O resultado obtido nas análises diverge de Dávalos (2005) que recupera *N. mexicanus* como táxon irmão dos demais, dentro do gênero, mas recupera o táxon como irmão de *N. jamaicensis*, também obtido por López-Wilchis et al. (2012), mas divergindo na posição mais basal do clado.

Previamente, a espécie *Natalus stramineus* era considerada amplamente distribuída, ocorrendo desde o México até o sul da América do Sul (Tejedor 2011). Dávalos (2005), analisando os primeiros dados moleculares da família, elevou três dos subgêneros à espécie e Tejedor (2011) considerando dados morfológicos, considerou todas as subespécies de *N. stramineus* como espécies válidas, incluindo o táxon com ocorrência para o Brasil, *Natalus espiritosantensis* (sinônimo júnior de *Natalus macrourus* Garbino & Tejedor 2014). *Natalus s. saturatus* é recuperado dentro do clado de *Natalus mexicanus*, reforçando que *N. s. saturatus* é um sinônimo júnior de *mexicanus*.

As delimitações reforçam os dados, agrupando *N. s. saturatus* com “*N. stramineus*” da Guatemala (possivelmente *mexicanus*, senso Tejedor 2011) contra Dávalos (2005), que considerando, sobretudo dados moleculares elevou *Natalus saturatus* ao *status* de espécie. Apesar de termos incluído apenas uma sequência atribuída a *saturatus* (a mesma analisada por Dávalos), merece destaque que o táxon se aninha com *mexicanus*, com valores de distância genética baixa (1%). Os dados moleculares, portanto, corroboram as conclusões de Tejedor (2011), baseadas em morfologia, considerando *N. saturatus* como *N. mexicanus*.

Os resultados põem também em questão o *status* da espécie *Natalus tumidirostris*, que surge como parafilética, já que parte dos *tumidirostris* forma um clado com os indivíduos provenientes da Venezuela e os espécimes de *N. tumidirostris* (Trinidade+Venezuela) formam grupo irmão com *N. stramineus* das Antilhas Holandesas. Os testes de delimitação apontam que o indivíduo capturado na Guiana seria uma espécie distinta dos demais *N. tumidirostris*. Tejedor (2007) aponta divergências entre os *N. tumidirostris* em duas populações do leste e oeste, agrupando os indivíduos de Trinidade e Sucre com os demais *N. stramineus*.

Tejedor (2011) sugere que *Natalus tumidirostris* seria a espécie que apresenta maior variação morfológica dentro do gênero. Dávalos (2005) considerou amostras de *N. tumidirostris* apenas de Trinidade, não testando, portanto, uma possível divergência entre os táxons

continentais e insulares. Os dados sugerem que *N. tumidirostris* pode se tratar de espécies distintas, conforme já explicitado por estudos moleculares prévios (Tejedor 2007). Os dados morfológicos não corroboram, até então, as linhagens recuperadas para o táxon (Tejedor 2007), sugerindo assim que ou novas análises morfológicas e que novos marcadores nucleares poderão elucidar a divergência observada. Dados mitocondriais tendem a acumular um maior número de mutações as quais, muitas vezes, não se refletem nos marcadores nucleares, ou mesmo na morfologia do táxon (Avice 2000, Martins et al. 2009, Pavan et al. 2011). Hipotetiza-se que, em tal cenário, pode ter havido eventos de recolonização tardia em uma das localidades, sendo necessário então realizar análises de relógio molecular para a família, visando responder sobre o tempo de divergência entre as linhagens e traçar se há correspondências entre as árvores de genes.

O táxon *Natalus macrourus* foi recuperado como monofilético e distinto das demais espécies do gênero. Tanto Morgan & Czaplewsky (2003) quanto Dávalos (2005) não consideraram *N. macrourus* em suas análises, sendo essa a primeira abordagem considerando os dados moleculares dessa espécie. Como previamente a espécie era considerada uma subespécie de *Natalus stramineus*, as filogenias antigas não consideraram a ocorrência como um táxon distinto (Arroyo-Cabrales et al. 1997, Morgan & Czaplewsky 2003, Simmons 2005, Dávalos 2005), sendo alçado à espécie por Tejedor (2011).

Não foram identificadas linhagens divergentes ao longo da sua distribuição no Brasil. Os valores de divergência obtidos sugerem se tratar de uma espécie distinta (3-5%), conforme critérios de divergência estabelecidos por Baker & Bradley (2006), replicado em outros estudos de morcegos (Pavan et al. 2016, Moras et al. 2016). *Natalus macrourus* se apresentou como grupo irmão de *N. tumidirostris*, em sua maioria, com indivíduos localizados na Venezuela e Guianas. Nas análises concatenadas, Tejedor (2007) posicionou a espécie como irmã dos demais *N. stramineus* e *N. tumidirostris*, similar ao observado para os dados apresentados.

O espécime de *Natalus macrourus* capturado às margens do rio Madeira, em Rondônia, apresentou os maiores valores de divergência genética dentro da espécie (cerca 2,5%). Dávalos (2005) aponta que divergências entre as espécies de *Natalus* variam entre 2,5-4,7% entre os *Natalus* considerando os dados de Citocromo B. Estudos morfológicos do espécime de Rondônia e a coleta e análises de material adicional poderão revelar se essa é, de fato, uma população de *N. macrourus* muito divergente na região.

A inclusão de dados moleculares de espécies com ampla distribuição territorial é frequentemente esclarecedora acerca do posicionamento da espécie dentro da família. A inclusão de informações de espécies com ampla distribuição no Brasil foi elucidativa para estudos de revisão, como para *Cynomops* (Moras et al. 2016) e *Eumops* (Gregorin 2009, Gregorin et al. 2016), para *Pteronotus* (Pavan et al. 2016), *Uroderma* (Souza 2015) e *Peropteryx* (Costa, 2018).

As análises populacionais da espécie *Natalus macrourus*, evidenciaram a ocorrência de três agrupamentos dentro da espécie, um grande clado agrupando os indivíduos amplamente distribuídos, com espécimes capturados na Amazônia (e.g. pedrais do Xingu, FLONA Carajás, PARNA Cavernas do Peruaçu, Chapada Diamantina e Goiás), um segundo grupo com os indivíduos do Nordeste (capturas de Sergipe e Rio Grande do Norte) e, por fim, um espécime capturado às margens do rio Madeira, estado de Rondônia. Foi observado também um moderado compartilhamento de haplótipos, por espécimes de localidades que distavam entre si cerca de 1300 km. A variância molecular foi maior entre os grupos que dentro dos grupos, sugerindo que as populações são moderadamente estruturadas, conforme também pode ser observado com os valores do índice de fixação para as populações. Os testes de neutralidade apresentaram valores não significativos, possivelmente devido ao restrito número amostral e contrário à hipótese de estruturação populacional associada à restrição de deslocamento e da extrema dependência de ambientes cavernícolas, a espécie *Natalus macrourus* parece dispor de fraco fluxo gênico entre as populações distribuídas no Brasil, evidenciado pelo compartilhamento de poucos haplótipos.

A despeito dos resultados obtidos, em estudos de populações de morcegos, é frequente observar que há a ocorrência de expansão populacional recente, contando com haplótipos centrais originando outros haplótipos. Esse padrão foi observado para as populações amazônicas de *Natalus macrourus*, que contaram com maior número amostral por localidade e também com maior diversidade haplotípica, sugerindo que, com o aumento amostral de algumas linhagens poderão surgir novos padrões de diversidade (Hung et al. 2016, Smith & Klica 2013). Moderada estruturação populacional foi evidenciada para outra espécie do gênero, onde López-Wilchis et al. (2012) verificaram estruturação para as populações de *Natalus mexicanus* (FST=0,794), similares aos resultados obtidos para a espécie com ocorrência para o Brasil e também compatíveis com a ocorrência de uma única espécie com estruturação populacional.

Outros estudos apontam padrões de estruturação para morcegos, associados aos biomas brasileiros (Ferreira et al. 2014, Lopes et al. 2009, Pavan et al. 2011), diferentemente do que foi observado para *Natalus macrourus*, onde haplótipos de localidades distintas apresentaram-se mais próximos nas redes de haplótipos, independentemente do bioma de ocorrência. A adição de marcadores nucleares e ligados ao cromossomo Y poderão trazer informações sobre se divergência observada nos marcadores mitocondriais está refletida na árvore de genes, atingindo ou não o monofiletismo recíproco (Centeno-Cuadros et al. 2019, Edwards & Beerli, Pavan et al. 2016, Martins et al. 2009), e também avaliar a ocorrência de filopatria, caso as fêmeas de *Natalus macrourus* tendam a permanecer no local de nascimento e os machos apresentem padrões de deslocamento e/ou migração distintos (Avice 2000, Edwards & Beerli 2000, Martins et al. 2009). Filopatria já foi identificada para as espécies *Myotis sodalis*, *Myotis nattereri*, *Pipistrellus pipistrellus* e outras (Kerth et al. 2002, Kurta & Murray 2002, Rivers et al. 2005).

Taddei e Uieda (2001) e Tejedor (2011) apontam que a subespécie originalmente descrita como *N. s. natalensis* (Goodwin, 1959) para o leste do Brasil (de Lagoa Santa, Minas Gerais a Natal, Rio Grande do Norte, segundo Goodwin, 1959) apresentam tamanho corporal menor em relação às demais localidades com ocorrência do táxon. Os dados moleculares apontam uma tendência dos espécimes provenientes do Nordeste de se agruparem como população separada, ou como clado, embora na filogenia, o clado de espécimes do NE tenha baixo suporte e a divergência genética seja pequena (1,7-2,3%) em relação aos *N. macrourus* das demais localidades. Uma investigação da morfologia dessas populações seria importante para testar possíveis diferenças associadas aos clusters populacionais detectados. De toda forma, os dados apresentados não sugerem a existência de espécies crípticas para *Natalus macrourus*.

Conservação de *Natalus macrourus*

O gênero *Natalus* apresenta quatro espécies listadas como quase ameaçadas (*N. major*, *N. macrourus*), vulneráveis (*N. primus*) ou criticamente ameaçadas (*N. jamaicensis*) de acordo com a IUCN (2018). Ainda dentro da família, *Chilonatalus micropus* está relacionado como vulnerável e *C. tumidifrons* como quase ameaçado. Pouco é conhecido para a espécie *Natalus macrourus*, incluindo aspectos da sua biologia (Taddei & Uieda 2001, Gardner 2008), *status* de

conservação (Delgado-Jaramillo et al. 2016) e taxonomia (Tejedor 2007, Tejedor 2011) e, atualmente, *Natalus macrourus* está listada como vulnerável (critério A3c) no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção (MMA 2018), devido às projeções de redução populacional nas próximas gerações. A maioria dos registros de *N. macrourus* estão associados às áreas cársticas (Guimarães & Ferreira, 2015), estando esses ambientes intrinsecamente relacionados com a subsistência da espécie e da manutenção da sua variabilidade genética.

O acesso ao material genético da espécie apontou a ocorrência de haplótipos exclusivos das localidades estudadas, com moderado compartilhamento entre áreas distintas. Os dados moleculares dos marcadores mitocondriais sugerem que *Natalus macrourus* não estão, por ora, isolados na paisagem, a despeito de se tratar de uma espécie exclusivamente cavernícola, com ocorrência em ambientes distribuídos de forma espacialmente heterogênea. Um maior número amostral poderá evidenciar com mais clareza qual o padrão estruturação das populações da espécie em território brasileiro.

No Brasil, o fato de uma espécie constar como vulnerável faz com que as cavernas que utiliza como abrigo não possa ser alvo de supressão (Decreto 6640/2008). Ainda assim, de acordo com a mesma norma, apenas a caverna e sua área de influência devem ser preservados e, há diversas situações, especialmente vinculadas aos empreendimentos minerários, onde a caverna com ocorrência de espécie ameaçada encontra-se envolta por estrutura operacional. Sabe-se que a remoção da vegetação e alteração do ambiente poderá ocasionar isolamento de tais populações, como evidenciado em estudos de fragmentação em ambientes florestais (Campbell et al. 2009, Ripperger et al. 2009) e, considerando os requerimentos e especializações de cada uma das espécies poderá resultar na redução do fluxo gênico, como observado para *Myotis macropus* (Campbell et al. 2009). Ripperger et al. (2013) observaram estruturações em populações de *Dermanura watsoni* em uma distância de 20km, ocasionadas por fragmentação na paisagem. O isolamento, quando efetivo, poderá ocasionar além da perda haplotípica, erosão genética, eventualmente favorecendo a redução na sua variabilidade genética de cada população, que já foram relatados na literatura para populações de *Carollia perspicillata* devido a eventos de fragmentação aliadas à menor capacidade de deslocamento da espécie, em comparação com *Uroderma bilobatum* (Meyer et al. 2009, Ripperger et al. 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allio, R., Donega, S., Galtier, N., & Nabholz, B. (2017). Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker. *Molecular biology and evolution*, 34(11), 2762-2772.
- Altringham, J. D. (2011). *Bats: from evolution to conservation*. Oxford University Press.
- Amador, L. I., Arévalo, R. L. M., Almeida, F. C., Catalano, S. A., & Giannini, N. P. (2018). Bat systematics in the light of unconstrained analyses of a comprehensive molecular supermatrix. *Journal of Mammalian Evolution*, 25(1), 37-70.
- Arroyo-Cabrales, J., & Van Den Bussche, R. A. (1997). Genic variation of mainland and island populations of *Natalus stramineus* (Chiroptera: Natalidae). Museum of Texas Tech University.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Bernard, E., Tavares, V. D. C., & Sampaio, E. (2011). Updated compilation of bat species (Chiroptera) for the Brazilian Amazonia. *Biota Neotropica*, 11(1), 35-46.
- Bichuette, M. E., do Amaral Gimenez, E., Arnone, I. S., & Trajano, E. (2018). An important site for conservation of bats in Brazil: Passa Três cave, São Domingos karst area, with an updated checklist for Distrito Federal (DF) and Goiás state. *Subterranean Biology*, 28, 39.
- Bradley, R. D., & Baker, R. J. (2001). A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of mammalogy*, 82(4), 960-973.
- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there?. *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1-14.

- Campbell, S., Guay, P. J., Mitrovski, P. J., & Mulder, R. (2009). Genetic differentiation among populations of a specialist fishing bat suggests lack of suitable habitat connectivity. *Biological Conservation*, 142(11), 2657-2664.
- Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas CECAV – CANIE. <<<http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie.html>>> Acessado em 07/05/2019.
- Centeno-Cuadros, A., Razgour, O., García-Mudarra, J. L., Mingo-Casas, P., Sandonis, V., Redondo, A., ... & Juste, J. (2019). Comparative phylogeography and asymmetric hybridization between cryptic bat species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57(4), 1004-1018.
- Corander, J., & Tang, J. (2007). Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205(1), 19-31.
- Dalquest, W. W. (1950). The genera of the chiropteran family Natalidae. *Journal of Mammalogy*, 31(4), 436-443.
- Dávalos, L. M. (2005). Molecular phylogeny of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1), 91-103.
- Delgado-Jaramillo, M., Barbier, E., & Bernard, E. (2018). New records, potential distribution, and conservation of the Near Threatened cave bat *Natalus macrourus* in Brazil. *Oryx*, 52(3), 579-586.
- Ditchfield, A. D. (2000). The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*, 9(9), 1307-1318.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Edwards, S., & Beerli, P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6), 1839-1854.

- Esbérard, C. E., Motta, J. A., & Perigo, C. (2005). Morcegos cavernícolas da Área de Proteção Ambiental (APA) Nascentes do Rio vermelho, Goiás. *Revista Brasileira de Zoociências*, 7(2).
- Esbérard, C. E., Baptista, M., Moraes Costa, L. D., Lins Luz, J., & Captivo Lourenço, E. (2010). Morcegos de Paraíso do Tobias, Miracema, Rio de Janeiro. *Biota Neotropica*, 10(4).
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Feijó, J. A., & Langguth, A. (2011). Lista de Quirópteros da Paraíba, Brasil com 25 novos registros. *Chiroptera Neotropical*, 17(2), 1055-1062.
- Feijó, A., & da Rocha, P. A. (2017). Morcegos da Estação Ecológica Aiuaba, Ceará, nordeste do Brasil: uma unidade de proteção integral na caatinga. *Mastozoología Neotropical*, 24(2), 333-351.
- Ferreira, W. A. S., Borges, B. D. N., Rodrigues-Antunes, S., Andrade, F. A. G. D., Aguiar, G. F. D. S., Silva-Junior, J. D. S. E., ... & Harada, M. L. (2013). Phylogeography of the dark fruit-eating bat *Artibeus obscurus* in the Brazilian Amazon. *Journal of Heredity*, 105(1), 48-59.
- Folmer, Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294-9.
- Garbino, G. S., & Tejedor, A. (2013). *Natalus macrourus* (Gervais, 1856) (Chiroptera: Natalidae) is a senior synonym of *Natalus espiritosantensis* (Ruschi, 1951).
- Gardner, A. L. (Ed.). (2008). *Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats (Vol. 2)*. University of Chicago Press.
- Gervais, P. 1856b. Documents zoologiques pour servir à la monographie de Chéiroptères sud-américains. *C. R. Acad. Sci. Paris* 42: 1–11.
- Goodwin, G. G. (1959). Bats of the subgenus *Natalus*. American Museum of Natural History.

- Gregorin, R., & Mendes, L. D. F. (1999). Sobre quirópteros (Emballonuridae, Phyllostomidae, Natalidae) de duas cavernas da Chapada Diamantina, Bahia.
- Gregorin, R., Moras, L. M., Acosta, L. H., Vasconcellos, K. L., Poma, J. L., dos Santos, F. R., & Paca, R. C. (2016). A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southeastern Brazil and Bolivia. *Mammalian Biology*, 81, 235-246.
- Guimarães, M. M., & Ferreira, R. L. (2015). Morcegos cavernícolas do Brasil: novos registros e desafios para conservação. *Revista Brasileira de Espeleologia*, 2(4), 1-33.
- Hall, E.R. 1981. The mammals of North America. Vol. 1. 2nd ed. New York: John Wiley.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- IUCN (2019) The IUCN Red List of Threatened Species Version 2019-1. <https://www.iucnredlist.org>
- Jones, K. E., & Purvis, A. (1997). An optimum body size for mammals? Comparative evidence from bats. *Functional Ecology*, 11(6), 751-756.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638.
- Kerth, G., Mayer, F., & König, B. (2000). Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. *Molecular Ecology*, 9(6), 793-800.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Koopman, K. F. (1994). Chiroptera: systematics. *Handbook of Zoology*, 1-217.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.

- Kurta, A., & Murray, S. W. (2002). Philopatry and migration of banded Indiana bats (*Myotis sodalis*) and effects of radio transmitters. *Journal of Mammalogy*, 83(2), 585-589.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.
- Larsen, P. A., Hoofer, S. R., Bozeman, M. C., Pedersen, S. C., Genoways, H. H., Phillips, C. J., ... & Baker, R. J. (2007). Phylogenetics and phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* complex based on cytochrome-b DNA sequences. *Journal of Mammalogy*, 88(3), 712-727.
- Lara-Ruiz, P., Chiarello, A. G., & Santos, F. R. (2008). Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, 141(5), 1332-1342. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.03.002>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Lopes, S. R., & Ditchfield, A. D. (2009). Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical*, 15(1), 450-455.
- López-Wilchis, R., Guevara-Chumacero, L. M., Pérez, N. Á., Juste, J., Ibáñez, C., & Sosa, I. B. D. (2012). Taxonomic status assessment of the Mexican populations of funnel-eared bats, genus *Natalus* (Chiroptera: Natalidae). *Acta Chiropterologica*, 14(2), 305-316.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., ... & Chen, S. M. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13039-13044.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2018). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 0.992, 2002.
- Martins, F. M., Ditchfield, A. D., Meyer, D., & Morgante, J. S. (2007). Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat,

- Desmodus rotundus (Phyllostomidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 45(4), 372-378.
- Mayer, F., & Helversen, O. V. (2001). Cryptic diversity in European bats. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 268(1478), 1825-1832.
- Meyer, C. F., & Kalko, E. K. (2009). Bat assemblages on Neotropical land-bridge islands: nested subsets and null model analyses of species co-occurrence patterns. Diversity and Distributions, 14(4), 644-654.
- Miller, G.S. 1907. The families and genera of bats. Bull. US Nat. Mus. 57: 1–282.
- Miller, M. P. (2005). Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. Journal of Heredity, 96(6), 722-724.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In 2010 gateway computing environments workshop (GCE) (pp. 1-8).
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). (2014): Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Accessed at <http://www.icmbio.gov.br/portal/>, 06 June 2019
- Ministério do Meio Ambiente (2018) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. Volume II: Mamíferos. 625p.
- Moras, L. M. (2015) Phylogeny and Revisionary Systematics of Cynomops (Chiroptera: Molossidae) (PhD thesis, Universidade Federal de Minas Gerais).
- Moras, L. M., Tavares, V. D. C., Pepato, A. R., Santos, F. R., & Gregorin, R. (2016). Reassessment of the evolutionary relationships within the dog-faced bats, genus Cynomops (Chiroptera: Molossidae). Zoologica Scripta, 45(5), 465-480.
- Mok, W. Y., Wilson, D. E., Lacey, L. A., & Luizão, R. C. (1982). Lista atualizada de quirópteros da Amazônia Brasileira. Acta Amazonica, 12(4), 817-823.

- Morgan, G. S., & Czaplewski, N. J. (2003). A new bat (Chiroptera: Natalidae) from the early Miocene of Florida, with comments on natalid phylogeny. *Journal of Mammalogy*, 84(2), 729-752.
- Neuweiler, G. (2000). *The biology of bats*. Oxford University Press.
- Novaes, R. L. M., & de Souza Laurindo, R. (2014). Morcegos da Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Papéis avulsos de Zoologia*, 54(22).
- Ottenwalder, J. A., & Genoways, H. H. (1982). Systematic review of the Antillean bats of the *Natalus micropus*-complex (Chiroptera: Natalidae).
- Pavan, A. C., Martins, F., Santos, F. R., Ditchfield, A., & Redondo, R. A. (2011). Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102(3), 527-539.
- Pavan, A. C., & Marroig, G. (2016). Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: *Pteronotus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103, 184-198.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901-904.
- Redondo, R. A., Brina, L. P., Silva, R. F., Ditchfield, A. D., & Santos, F. R. (2008). Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 49(1), 44-58.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.001>
- Ripperger, S. P., Tschapka, M., Kalko, E. K., Rodriguez-Herrera, B., & Mayer, F. (2013). Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conservation Genetics*, 14(5), 925-934.
- Rivers, N. M., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2005). Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14(14), 4299-4312.

- Rocha, P. A. D., Mikalauskas, J. S., Bocchiglieri, A., Feijó, J. A., & Ferrari, S. F. (2013). An update on the distribution of the Brazilian funnel-eared bat, *Natalus macrourus* (Gervais, 1856)(Mammalia, Chiroptera), with new records from the Brazilian Northeastern. Check List.
- Ruschi, A. 1951. Morcegos do estado do Espírito Santo. Família Vespertilionidae, chave analítica para os Gêneros e espécies representadas no E. Santo. Descrição de *Myotis nigricans* e *Myotis espiritosantensis* n. sp. e algumas observações a seu respeito. Bol. Mus. Biol. Mello Leitão, Zool. 4: 1–11.
- Sambrook, J. (2001) A laboratory manual. Molecular cloning, v. 1,
- Sbragia, I. A., & Cardoso, A. (2008). Quiroptero fauna (Mammalia: Chiroptera) cavernícola da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Chiroptera Neotropical*, 14(1), 360-365.
- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 312-529.
- Sorenson, M. D. (2003). Avian mtDNA primers. Boston: Boston University.
- Souza, E. M. S. D. (2015). Revisão sistemática de *Uroderma bilobatum* (Chiroptera: Phyllostomidae) baseada em dados moleculares e morfológicos.
- Smith, M. F., & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(3), 149-177.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Taddei, V. A., & Uieda, W. (2001). Distribution and morphometrics of *Natalus stramineus* from South America (Chiroptera, Natalidae). *Iheringia. Série Zoologia*, (91), 123-132.
- Tavares, V. D. C., Aguiar, L. M. D. S., Perini, F. A., Falcão, F. C., & Gregorin, R. (2010). Bats of the state of Minas Gerais, southeastern Brasil.

- Tavares, V. D. C., Palmuti, C. F. D. S., Gregorin, R., & Dornas, e. T. T. (2012). 7. Morcegos. Estudos sobre vertebrados terrestres, 156.
- Tavares, V. D. C., Nobre, C. C., de S, P., Cesar, F., Nogueira, E. D. P., Gomes, J. D., ... & Bobrowiec, P. E. (2017). The bat fauna from southwestern Brazil and its affinities with the fauna of western Amazon. *Acta Chiropterologica*, 19(1), 93-106.
- Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'brien, S. J., & Murphy, W. J. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 307(5709), 580-584.
- Tejedor, A., Tavares, V. D. C., & Silva-Taboada, G. (2005). A revision of extant Greater Antillean bats of the genus *Natalus*. *American Museum Novitates*, 1-22.
- Tejedor, A. (2006). The type locality of *Natalus stramineus* (Chiroptera: Natalidae): implications for the taxonomy and biogeography of the genus *Natalus*. *Acta Chiropterologica*, 8(2), 361-380.
- Tejedor, A. (2007). Systematics and phylogeny of the New World bat family Natalidae (Doctoral dissertation, City University of New York).
- Tejedor, A. (2011). Systematics of funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2011(353), 1-140.
- Thoisy, B., Pavan, A. C., Delaval, M., Lavergne, A., Luglia, T., Pineau, K., ... & Catzeflis, F. (2014). Cryptic diversity in common mustached bats *Pteronotus* cf. *parnellii* (Mormoopidae) in French Guiana and Brazilian Amapa. *Acta Chiropterologica*, 16(1), 1-13.
- Trajano, E. (1982). New records of bats from southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 63(3), 529-529.
- Trajano, E., & Moreira, J. D. A. (1991). Estudo da fauna de cavernas da província espeleológica arenítica Altamira-Itaituba, Pará. *Revista brasileira de Biologia*, 51(1), 13-29.
- Trajano, E., & Gimenez, E. E. (1998). Bat community in a cave from eastern Brazil, including a new record of *Lionycteris* (Phyllostomidae, Glossophaginae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 33(2), 69-75.

- Varona, L. S. (1974). Catálogo de los mamíferos vivientes y extinguidos de las Antillas (No. 599 V37).
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2008). Phylogenetics and biogeography of the broad-nosed bats, genus *Platyrrhinus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 749-759.
- Velazco, P. M., & Lim, B. K. (2014). A new species of broad-nosed bat *Platyrrhinus* Saussure, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Guianan Shield. *Zootaxa*, 3796(1), 175-193.
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2013). Diversification of the yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 68(3), 683-698.
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2014). Two new species of yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* Gray, 1842 (Chiroptera, Phyllostomidae) from Costa Rica, Panama and western Ecuador. *ZooKeys*, (402), 43.
- Willig, M. R. (1983). Composition, microgeographic variation, and sexual dimorphism in Caatingas and Cerrado bat communities from northeast Brazil. *Carnegie Museum of Natural History*.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.
- Zortéa, M., Bastos, N. A., & Acioli, T. C. (2015). The bat fauna of the Kararaô and Kararaô Novo caves in the area under the influence of the Belo Monte hydroelectric dam, in Pará, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 168