

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação de Mestrado

Filogeografia de *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766), baseada nos genes  
mitocondriais citocromo b e citocromo oxidase I

Autor: Cayo Augusto Rocha Dias

Orientador: Fabrício Rodrigues dos Santos

Belo Horizonte  
Setembro - 2011

**Cayo Augusto Rocha Dias**

Filogeografia de *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766), baseada nos genes mitocondriais citocromo b e citocromo oxidase I

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Genética.

Orientador: Fabrício Rodrigues dos Santos

Belo Horizonte  
Setembro de 2011

## Dedicatória

Aos meus pais: Geraldo e Júlia; e a minha querida namorada Ângela.

## Agradecimentos

- Agradeço primeiro àqueles sem quem nada disto teria sido possível, àqueles cujo exemplo me fez quem sou e permitiu que chegasse até aqui: “Pai, mãe, muito obrigado”!
- À minha irmã, Carine, pelo carinho e apoio.
- À tia Geninha, pelo carinho e aconchego.
- Ao Fabrício por ter aberto as portas do LBEM e pela oportunidade que me concedeu.
- Ao Augusto e as “meninas” do LBEM pela paciência e boa vontade em sanar minhas incontáveis dúvidas.
- Ao José Sandoval pelos ensinamentos e grandes lições.
- Ao Bruno (Bichão) por todas as recomendações (e empréstimo) de bons livros.
- Ao meu grande amigo Zé, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela confiança.
- Aos meus amigos, que (mesmo de longe) sempre me deram força.
- À minha amada amiga, companheira e também namorada, Ângela, por todo carinho, paciência e cumplicidade.
- Aos meus professores (TODOS!!)
- À CAPES e à FAPEMIG pela bolsa de estudos.

## Sumário

Lista de Figuras .....	VI
Lista de Tabelas .....	VIII
Lista de símbolos e abreviaturas.....	IX
Resumo .....	- 10 -
Abstract .....	- 11 -
1. Introdução.....	- 12 -
1.1 Chiroptera .....	- 12 -
1.2 Phyllostomidae .....	- 13 -
1.4.1 A filogeografia e os Quirópteros Neotropicais .....	- 18 -
1.5 Marcadores Moleculares .....	- 20 -
1.6 Relevância e Justificativa .....	- 21 -
2 Objetivos.....	- 21 -
2.1 Objetivos específicos.....	- 21 -
3 Materiais e Métodos.....	- 22 -
3.1 Amostragem.....	- 22 -
3.2 Métodos Moleculares .....	- 23 -
3.3 Montagem e validação das sequências.....	- 25 -
3.4 Análise dos dados .....	- 25 -
3.5 Análises filogenéticas e filogeográficas e estimativa de tempos de divergência .....	- 26 -
4 Resultados.....	- 27 -
4.1 Descrição dos dados .....	- 27 -
4.1.1 Cyt-b.....	- 27 -
4.1.2 COI .....	- 28 -
4.2 Definição dos agrupamentos de indivíduos .....	- 28 -
4.2.1 Cyt-b.....	- 28 -
4.2.2 COI .....	- 32 -
4.3 Padrões de variabilidade .....	- 35 -
4.4 Estimativa do tempo de divergência .....	- 40 -
5 Discussão .....	- 42 -
6 Conclusões.....	- 47 -
7 Referências.....	- 49 -
Anexos.....	- 56 -

## Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica das subespécies de *Glossophaga soricina*: (1) *G. s. antillarum*; (2) *G. s. handleyi*; (3) *G. s. mutica*; (4) *G. s. soricina*; (5) *G. s. valens*. Reproduzido a partir de Alvarez *et al.* 1991 e Gardner 2008..... - 16 -

Figura 2 - Mapa contendo as localidades amostradas. Os círculos negros representam as localidades amostradas para o marcador Cyt-b. Os círculos cinza referem-se às localidades amostradas para o marcador COI. Já os quadrados de cor cinza designam localidades amostradas para ambos marcadores..... - 23 -

Figura 3– O mapa à direita ilustra cada um dos 4 agrupamentos (de modo que cada cor representa um grupo) de indivíduos sugeridos pelo Geneland. As figuras ao lado do mapa representam a probabilidade de cada ponto (localidade amostrada) pertencer àquele grupo. Respeitando-se uma gradação que vai do vermelho ao branco, quanto mais clara a região em que se encontra um determinado ponto, maior a probabilidade do mesmo pertencer àquele grupo. .... - 29 -

Figura 4 – Rede haplotípica construída pelo método de *Median-joining*, a partir de sequência de Cyt-b. H1- representa o haplogrupo principal 1 (que engloba indivíduos da América Central e região Oeste dos Andes); H2- representa o haplogrupo principal 2 (que contém os indivíduos da América do Sul – Leste dos Andes). a) subgrupo *G. s. antillarum*; b) subgrupo *G. s. valens*; c) subgrupo *G. s. handleyi* P; d) subgrupo *G. s. soricina* S; e) subgrupo *G. s. soricina* N. .... - 31 -

Figura 5 – árvore filogenética construída pelo método de distância (NJ) com base no gene Cyt-b para diferentes subespécies de *Glossophaga soricina*. As relações entre os filogrupos, bem como o monofiletismo dos mesmos, são os mesmos apresentados pela análise de MP. Os asteriscos representam valores de *bootstrap* superiores a 90 (para ambos os métodos). .... - 32 -

Figura 6 - O mapa à esquerda ilustra cada um dos 4 agrupamentos (de modo que cada cor representa um grupo) de indivíduos sugeridos pelo Geneland com base no gene COI. As figuras ao lado do mapa representam a probabilidade de cada ponto (localidade amostrada) pertencer àquele grupo. Respeitando-se uma gradação que vai do vermelho ao branco, quanto mais clara a região em que se encontra um determinado ponto, maior a probabilidade do mesmo pertencer àquele grupo..... - 33 -

Figura 7 - Rede haplotípica construída pelo método de MJ, com base no gene COI. A *network* foi dividida em seus dois haplogrupos principais para que pudessem ser verificadas com mais clareza as relações entre os diferentes haplótipos. 1H representa um dos dois haplogrupos principais (México, Guatemala e Panamá). 2H representa o outro haplogrupo principal (América do Sul – leste dos Andes). Os números representam os subgrupos: 1) *G. s. soricina* N (Venezuela, Suriname e Equador); 2) *G. s. soricina* S (Brasil, Guiana e Suriname); 3) *G. s. handleyi* N (México e Guatemala); 4) *G. s. handleyi* P (Panamá)..... - 34 -

Figura 8 - árvore filogenética construída pelo método de distância (NJ) com base no COI. As relações entre os filogrupos, bem como o monofiletismo dos mesmos, são os mesmos apresentados pela análise de MP. Os asteriscos representam valores de *bootstrap* superiores a 90 (para ambos os métodos). .... - 35 -

- Figura 9 – Estimativas do tempo de divergência para os principais filogrupos em *G. soricina*, baseados no gene Cyt-b. Próximo a cada nó estão representados os intervalos de confiança (95%). maa = milhões de anos ..... - 41 -
- Figura 10 – Filogrupos de *Schiffornis turdina* (reproduzido a partir de Nyári, 2007) refletem a áreas de endemismo propostas por Cracraft e Prum (1988)..... - 45 -
- Figura 11 – Árvore filogenética construída pelo método MP (para o gene Cyt-b), ilustrando os diferentes filogrupos (representados aqui por diferentes cores). As barras verticais relacionam os filogrupos de *G. soricina* e *Schiffornisturdina* (apresentado na figura anterior)..... - 46 -

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas etapas de PCR ..... - 24 -

Tabela 2 – Distância genética (K2P) interespecífica para espécies de *Glossophaga*, com base no gene Cyt-b. Os valores, em negrito, abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de espécies, seguidos de seus respectivos desvios..... - 36 -

Tabela 3 – Distância genética (K2P) interespecífica para espécies de *Glossophaga*, com base no gene COI. Os valores, em negrito, abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de espécies, seguidos de seus respectivos desvios..... - 36 -

Tabela 4 – Distância genética (K2P) intraespecífica entre filogrupos de *G. soricina* para o gene o gene Cyt-b. Os valores abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de filogrupos, seguidos de seus respectivos desvios. Já os valores em negrito representam as distância média dentro de cada filogrupos. .... - 37 -

Tabela 5 – Distância genética (K2P) intraespecífica entre filogrupos de *G. soricina* para o gene o gene COI. Os valores abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de filogrupos, seguidos de seus respectivos desvios. Já os valores em negrito representam as distância média dentro de cada filogrupos. .... - 37 -

## Lista de símbolos e abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido etilenodiaminotetracético	EDTA
Alleles in Space	AIS
American Museum of Natural History	AMNH
Ancestral common ancestor	MRCA
Citocromo b	Cyt-b
Citocromo oxidase I	COI
Deoxirribonucleotídeos fosforados	dNTP
DNA mitocondrial	DNAm
Field Museum of Natural History - Chicago	FMNH
Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular	LBEM
Máxima parcimônia	MP
Median Joining	MJ
Milhões de anos atrás	maa
Neighbor Joining	NJ
Poli(etil)enoglicol	PEG
Polymerase Chain Reaction	PCR
Recombinating Activating Gene - 2	RAG-2
Royal Ontario Museum	ROM
Temperatura de annealing	Tm
United States National Museum	USNM

## Resumo

*Glossophaga soricina* é um filostomídeo nectarívoro que ocorre desde o México até o sul da Argentina. Pode ser encontrados nos mais diferentes hábitats, que vão do semi-árido nordestino à quente e úmida Floresta Amazônica. No Brasil, esta parece ser uma das espécies de morcego que se alimenta de néctar mais frequentemente encontrada em estudos de levantamento de fauna. *G. soricina* atua como polinizador de diversas espécies de plantas neotropicais. Com o intuito de estudar o padrão filogeográfico e avaliar a configuração da diversidade genética de *G. soricina*, foram realizadas análises utilizando-se os genes mitocondriais citocromo b e citocromo oxidase I. Para ambos marcadores foram registrados altos valores de diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica. Os resultados corroboram trabalhos anteriores, confirmando a existência de duas linhagens principais muito divergentes que parecem ter sido separadas pelos Andes (de modo similar ao que foi relatado para outras espécies de morcegos). Análises filogenéticas e filogeográficas revelam que as subespécies correspondem a grupos monofiléticos e que duas subespécies parecem ser constituídas de duas linhagens bem definidas. As duas linhagens principais desta espécie parecem ter se divergido entre 2,59 e 5,08 milhões de anos atrás, coincidindo com o tempo estimado para ocorrência dos eventos geológicos que deram aos Andes sua configuração altitudinal atual. As demais linhagens tiveram sua origem no Pleistoceno, época em que as modificações no clima foram acompanhadas de mudanças nos ecossistemas e no nível dos mares que propiciaram fenômenos como dispersão e vicariância, ambos associados à diversificação intraespecífica em *G. soricina*.

## **Abstract**

*Glossophaga soricina* is a nectarivorous phyllostomid bat occurring from Mexico to south Argentina. It inhabits the most different kinds of habitats, ranging from Brazilian northeastern semi-arid caatinga to the moist Amazon rainforest. In Brazil, it seems to be the most frequent found nectar-feeding bat in field surveys. *G. soricina* acts as pollinator of several Neotropical plant species. Several analysis using cytochrome b and cytochrome oxidase I were performed in order to understand the phylogeographic pattern and to assess the genetic diversity of *G. soricina*. High haplotipic diversity and low nucleotidic diversity were registered for both markers. The results corroborate previous works, confirming the existence of two major lineages that has been separated by Andes (as reported for other bat species). Phylogenetic and Phylogeographic analyses revealed that subspecies correspond to monophyletic groups. Two subspecies appear to be constituted of two distinct lineages. The two major lineages of this species appear to be diverged between 2.59 and 5.08 million years ago, which is the same inferred time to the occurrence of geological events that gave Andes their current altitudinal configuration. The other minor lineages originated in Pleistocene, an epoch when changes in climate were accompanied by changes in ecosystems and sea levels that have led to phenomena such as dispersal and vicariance, both related to intraspecific diversification in *G. soricina*.

# 1. Introdução

## 1.1 Chiroptera

A ordem Chiroptera (do grego “*cheir*”, mão e “*pteron*”, asa) encerra em seu nome a principal característica que distingue seus membros, os morcegos, dos demais mamíferos: as asas. Esta importante modificação dos membros anteriores trouxe consigo uma extraordinária habilidade, o voo batido, que pode ter sido o principal responsável por um dos maiores eventos de radiação adaptativa observada para o grupo Mammalia (Nowak, 1994; Sears *et al.*, 2006). Somando mais de 1150 espécies distribuídas em 18 famílias (Simmons, 2005), os quirópteros constituem a segunda maior ordem de mamíferos, perfazendo cerca de um quinto do total de mamíferos descritos.

Estudos filogenéticos realizados na década de noventa, sugeriam que primatas (Primates), morcegos (Chiroptera), colugos (Dermoptera) e musaranhos-arborícolas (Scandentia) constituíam a superordem Archonta (Adkins & Honeycutt, 1991; Novacek, 1992; Allard *et al.*, 1996). Contudo, aceita-se, atualmente, que os quirópteros façam parte de um clado, Laurasiatheria, cujo nome remete à origem do mesmo, que provavelmente se deu no antigo continente da Laurásia. Fazem, também, parte desse grupo as ordens: Carnivora, Pholidota, Cetartiodactyla, Perissodactyla e Eulipotyphla (Nikaido *et al.* 2000, Delsuc, 2002; Springer *et al.*, 2007)

O crescente acúmulo de dados moleculares tem possibilitado a realização de estudos filogenéticos baseados na comparação de sequências de DNA. Os novos resultados têm apontado para um panorama diferente daquele tradicionalmente traçado por trabalhos fundamentados principalmente em caracteres morfológicos. Nesse contexto, é questionada a clássica divisão dos morcegos nas subordens Megachiroptera (constituída apenas pela família Pteropodidae) e Microchiroptera (englobando as demais), uma vez que ela não reflete a história evolutiva dos quirópteros (Simmons, 2005; Reis, 2011; Teeling *et al.*, 2000,2005). Atualmente a divisão ainda é baseada em duas subordens, contudo, elas agora contam com nomes e arranjos diferentes: Yinpterochiroptera, que além da família Pteropodidae, também é constituída pela superfamília Rhinolophoidea, as quais não possuem representantes no continente americano; e Yangochiroptera (englobando as demais espécies) (Teeling *et al.*,2005).

## 1.2 Phyllostomidae

No Brasil, nove famílias de morcegos são conhecidas. Elas englobam 172 espécies (Simmons, 2005, Gardner, 2008; Reis *et al.*, 2011), das quais 89 pertencem a uma única família, Phyllostomidae (Peracchi *et al.*, 2006; Gardner, 2008). Os filostomídeos constituem um grupo endêmico do continente americano, cuja característica morfológica mais marcante é a presença da folha nasal (apêndice dérmico nasal associado à ecolocalização), muito embora ela se apresente reduzida ou modificada em algumas espécies, como nos morcegos hematófagos (Myers *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2011).

A família Phyllostomidae, cuja distribuição se estende do oeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina, (Nowak, 1994; Simmons, 2005; Gardner, 2008; Reis, 2011); chama atenção não apenas pelo número de espécies (são mais de 160 espécies reconhecidas em 57 gêneros – Simmons, 2005; Reis, 2007, 2011), mas principalmente pela incrível diversidade de hábitos alimentares (Ferrarezzi & Gimenez, 1996), que, segundo Kunz & Fenton (2003) é superior aquela encontrada em qualquer outra família de Chiroptera. Existem filostomídeos: insetívoros, carnívoros, frugívoros, folívoros, granívoros, nectarívoros, onívoros e mesmo hematófagos (Ferrarezzi & Gimenez, 1996, Wetterer *et al.*, 2000, Nogueira & Peracchi, 2003; Simmons & Connaway, 2003).

Ainda que algumas espécies utilizem diferentes itens alimentares como forma de complementação da dieta (Fleming, 1993; Ferrarezzi & Gimenez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000), a maioria dos táxons que compartilham especializações alimentares constituem grupos monofiléticos, que diversas vezes coincidem com subfamílias tradicionalmente reconhecidas em Phyllostomidae (Ferrarezzi & Gimenez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000), embora as relações filogenéticas não sejam bem compreendidas, levantando algumas discussões a esse respeito. Wetterer *et al.* (2000), em um estudo baseado em diferentes conjuntos de dados (moleculares, morfológicos e cromossômicos) propõem um arranjo em que seriam reconhecidas sete subfamílias (Desmodontinae, Brachyphyllinae, Phyllonycterinae, Phyllostominae, Glossophaginae, Caroliinae e Stenodermatinae). Estudos posteriores, fundamentados em dados moleculares, sugerem uma classificação distinta, onde os filostomídeos são agrupados em 11 subfamílias (Desmodontinae, Phyllostominae, Glossophaginae, Caroliinae, Stenodermatinae, Lonchorhininae, Macrochinae, Micronycterinae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae e Rhinophyllinae) (Baker *et al.*, 2003).

À extensa diversidade de hábitos alimentares estão associadas variações morfológicas de iguais proporções (Ferrarezzi & Gimenez, 1996), principalmente no que concerne à

morfologia craniana. É possível também observar uma enorme variação no tamanho corporal, com espécies tão pequenas como *Ectophylla alba* (pesando pouco mais 5 g e medindo até 5 cm – Nowak, 1994) até a maior espécie de morcego das américas *Vampyrum spectrum* (pesando até 200 g e com 100 cm de envergadura) (Navarro & Wilson, 1982).

Características como alta diversidade (fisiológica, morfológica, alimentar e específica), endemismo, ampla distribuição, fazem desse grupo um interessante modelo para estudos para os mais diversos campos da Biologia, tais como: Fisiologia, Ecologia, Evolução e Genética de Populações.

### **1.3 *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766)**

Os filostomídeos que se alimentam de néctar constituem o maior evento de radiação de nectarívoros dentre os mamíferos (Carstens *et al.*, 2002). Alguns dos esquemas de classificação mais recentes, como aquele proposto por Wetterer *et al.* (2000) e presente em Simmons (2005), sugerem que os morcegos nectarívoros estejam distribuídos em três subfamílias: Brachyphyllinae, Phyllonycterinae e Glossophaginae, esta última composta por duas tribos: Lonchophyllini e Glossophagini. Contudo essas ideias não são um consenso, uma vez que outros estudos (Baker *et al.*, 2000, 2003; De La Mar, 2001; Gardner, 2008; Datzman *et al.*, 2010) sugerem que os nectarívoros estariam agrupados em duas subfamílias: Lonchophyllinae, proposta inicialmente por Griffiths (1982), e Glossophaginae (que incluiria as subfamílias Brachyphyllinae e Phyllonycterinae *sensu* Wetterer - 2000).

Os glossofagíneos são morcegos de pequeno porte (massa corporal, normalmente inferior a 20 g) que exibem inúmeras características associadas ao hábito nectarívoro. Alguns desses traços são bem marcantes, como: modificações na musculatura da garganta o rostro alongado, estrutura dentária modificada (como no caso dos incisivos inferiores, que em algumas espécies, apresentam-se deslocados lateralmente ou ausentes), folha nasal reduzida (Wille, 1954; Griffiths, 1978; Gardner, 2008; Reis *et al.*, 2007), língua longa e extensível (podendo ser tão longa quanto o tamanho do corpo) e dotada de cerdas papilares, além de uma característica comportamental que os assemelha aos beija-flores, o voo pairado (Carstens, 2002; Reis *et al.* 2011).

Os membros dessa subfamília desempenham um papel essencial nos ecossistemas onde são encontrados, atuando como polinizadores de inúmeras espécies de plantas neotropicais. Algumas espécies vegetais, inclusive, têm nesses morcegos o principal, quando não o único, vetor de pólen (Sazima, 2009). Isso faz com que muitas plantas dependam,

determinantemente, desses morcegos para sua reprodução (Sazima *et al.*, 1999; Muchhala, 2006; Sazima, 2009). No Brasil, o gênero *Glossophaga* contém uma das espécies de nectarívoros mais frequentemente registradas em estudos de levantamento (Reis *et al.*, 2007): *Glossophaga soricina*.

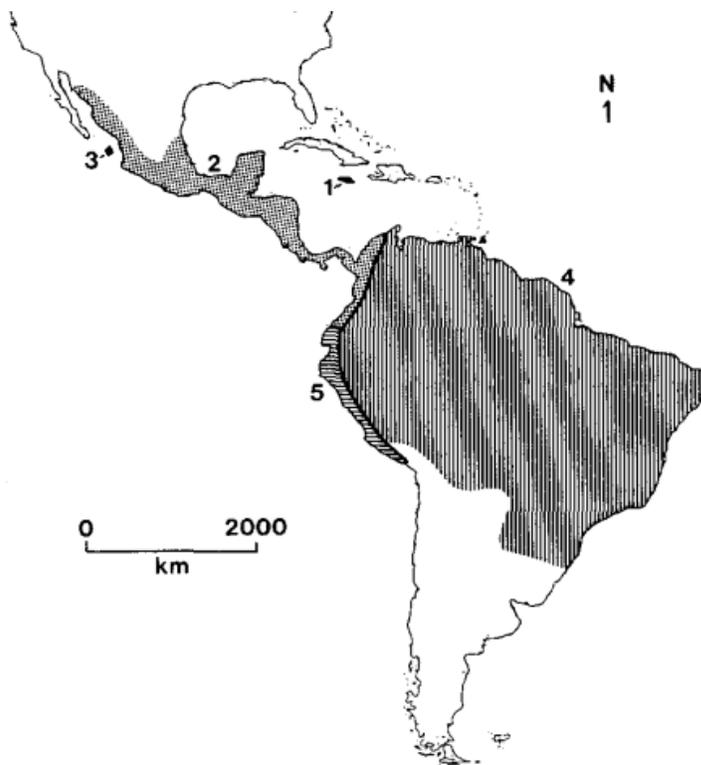
O gênero *Glossophaga*, cujo nome é uma referência ao uso efetivo da língua para a obtenção do alimento, é composto por cinco espécies (Webster, 1983), das quais três ocorrem no Brasil: *G. soricina*, *G. commissarisi*, *G. longirostris*. Ao contrário de *G. commissarisi* e *G. longirostris*, que, em território brasileiro, estão restritas à região amazônica, *G. soricina*, cuja distribuição se estende do México até o norte da Argentina (Webster, 1983; Gardner, 2008), pode ser encontrada nos mais distintos ecossistemas: florestas primárias (Reis & Peracchi, 1987; Reis, 2006) e secundárias (Esbérard, 2003, 2011), pomares (De Knecht *et al.*, 2005) e fragmentos florestais (Reis *et al.*, 2003; Faria, 2006). Pode ser encontrada, ainda, em zonas rurais (Kotait *et al.*, 2003) e mesmo em grandes centros urbanos (Perini *et al.*, 2003; De Knecht, 2005).

Embora *G. soricina* possa alimentar-se de frutos e até insetos em períodos em que há redução da disponibilidade de recursos, sua dieta é predominantemente nectarívora ao longo do ano, (Webster, 1983; Tschapka, 2002; Lopez & Vaughan, 2007). Dieta essa, que inclui uma grande variedade de plantas, distribuídas em diferentes famílias vegetais (Reis *et al.*, 2007). Alguns exemplos, como destacado por Reis *et al.* 2007, ressaltam sua importância como agente polinizador: a participação de *G. soricina* na polinização de *Dyssochroma viridiflorum*, Solanaceae epífita endêmica de Mata Atlântica (Sazima *et al.*, 2003) e de *Pitcairnia albiflos*, bromeliácea rara e endêmica de afloramentos rochosos no estado do Rio de Janeiro (Wendt *et al.*, 2001).

Webster (1983) registrou diferenças morfométricas entre indivíduos de *G. soricina* suficientes para confirmar a validade das cinco subespécies historicamente reconhecidas, cuja distribuição encontra-se na figura 1. As análises realizadas por Webster (1983) com base em caracteres morfológicos (medidas cranianas - maior comprimento do crânio, comprimento côndilo-basal; comprimento da mandíbula, comprimento do rostró, entre outros - e corporais - comprimento do antebraço, comprimento do metacarpo) revelaram a existência de variação geográfica desses caracteres em *G. soricina*.

As cinco subespécies reconhecidas atualmente (Gardner, 2008) para *G. soricina*, bem como suas principais características segundo Webster (1983) são: ***G. s. antillarum*** - apresenta medidas corporais e cranianas grandes e possui distribuição insular (Jamaica). Sua pelagem é mais clara que a de *G. s. handleyi* e *G. s. soricina*. ***G. s. mutica*** - possui medidas externas e

cranianas grandes, incisivos superiores muito procumbentes e distribuição insular (Ilhas Três Marias). ***G. s. handleyi*** - apresenta medidas externas e cranianas moderadas e sua pelagem é mais clara que a de *G. s. soricina*, porém mais escura que a de *G. s. antillarum*, *G. s. mutica* e *G. s. valens*. Sua distribuição vai do norte do México até a região oeste da Colômbia, passando pela América Central. ***G. s. soricina*** - caracterizada por apresentar menores dimensões corporais e cranianas (sendo considerada a menor das subespécies), pelagem com coloração mais escura e rosto mais curto e estreito. Webster (1983) ainda chama a atenção para a anatomia craniana dessa subespécie, cujo crânio apresenta formato abobadado, contrastando com linhas mais retas que caracterizam as demais subespécies. ***G. s. valens*** - esta subespécie pode ser distinguida de *G. s. handleyi* e *G. s. soricina* por apresentar maiores dimensões, bem como pela presença de incisivos superiores extremamente procumbentes. Sua distribuição a diferencia das demais subespécies.



**Figura 1** – Distribuição geográfica das subespécies de *Glossophaga soricina*: (1) *G. s. antillarum*; (2) *G. s. handleyi*; (3) *G. s. mutica*; (4) *G. s. soricina*; (5) *G. s. valens*. Reproduzido a partir de Alvarez *et al.* 1991 e Gardner 2008.

Estudos evolutivos com base em isozimas revelaram baixos níveis de variação intraespecífica nas espécies de *Glossophaga*, exceto em *G. soricina* (Webster, 1983). Ditchfield (2000), em um estudo de filogeografia comparada de mamíferos, utilizando um segmento com pouco mais de 400 pb do gene citocromo b para 23 amostras de *G. soricina*, registrou a existência de dois grupos de haplótipos separados geograficamente. Grupos esses que estariam separados pela cadeia de montanhas andinas e que corresponderiam às subespécies *G. s. soricina* e *G. s. handleyi*. Resultados similares foram encontrados por Hoffman & Baker (2001), que realizaram suas análises com base no mesmo marcador, porém, desta vez ampliando a amostragem de indivíduos (38) e subespécies, compreendendo quatro das cinco subespécies. Esses resultados (Hoffman & Baker, 2001) sugerem ainda que as linhagens, uma correspondendo à subespécie *G. s. soricina* e a outra compreendendo as demais subespécies, possam se tratar, na verdade de duas espécies, corroborando os estudos morfométricos realizados por Webster (1983).

## 1.4 Filogeografia

Empregado pela primeira vez em 1987, por Avise *et al.*, em uma publicação pioneira, o termo filogeografia designa uma disciplina que tem por finalidade compreender os princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, primordialmente em âmbito intraespecífico (Avise, 1998). Por combinar informações de diferentes campos da biologia tais como genética de populações, filogenética, evolução molecular e biogeografia histórica, a filogeografia pode ser considerada uma abordagem integradora na investigação das relações entre a história da Terra, ecologia e a diversificação da vida (Arbogast, 2001).

Avise (1987) afirmou que os eventos macroevolutivos são uma extrapolação de processos microevolutivos e que uma maneira interessante de compreender essa conexão estaria no estudo conjunto de disciplinas que lidam com ambas as escalas evolutivas: genética de populações (microevolução) e filogenia/sistemática (macroevolução), que até então permaneciam como campos incomunicáveis. A filogeografia, por apresentar raízes na genética de populações, filogenética e biogeografia, foi considerada a ponte entre os eventos micro e macroevolutivos (Bermingham & Mortiz, 1998; Bernatchez & Wilson, 1998). Foi essa fusão que tornou possível verificar o efeito de eventos históricos na composição genética e estrutura de populações modernas (Bernatchez & Wilson, 1998).

As inferências filogeográficas são baseadas na reconstrução da genealogia de genes (as chamadas filogenias ou árvores de genes) individuais amostrados em diferentes populações (Knowles & Maddison, 2002). Desse modo, ela vem sendo utilizada como importante ferramenta no delineamento de padrões evolutivos em segmentos distintos dentro de uma determinada espécie, bem como na investigação de processos demográficos históricos: fluxo gênico, tamanho populacional efetivo, trajetórias evolutivas (Wilson *et al.*, 1985), efeito gargalo de garrafa e expansão populacional, responsáveis por modelar o padrão atual de distribuição geográfica da variação genética.

Bermingham & Mortiz (1998) destacaram que a filogeografia visa testar a congruência entre as histórias evolutiva e demográfica da distribuição de um táxon, e a configuração geológica e ecológica de uma região e determinar a cronologia da diversificação evolutiva. É possível, então, sugerir que essa disciplina tem contribuído para uma melhor compreensão da biogeografia neotropical, uma vez que ela permite avaliar modelos biogeográficos que tentam explicar a enorme biodiversidade encontrada nos trópicos (Pavan *et al.* 2011).

Em termos práticos, a filogeografia pode ser empregada como ferramenta de análise em estudos taxonômicos, uma vez que é capaz de detectar espécies crípticas ou diferenciadas cujas relações não puderam ser resolvidas pela taxonomia atual. O fato de permitir a detecção de linhagens divergentes em nível intraespecífico possibilita seu uso na biologia da conservação, já que auxilia na definição de Unidades Evolutivas Significativas (ESU, na sigla em inglês), em outras palavras, possibilita identificar de maneira precisa unidades de manejo que refletem a importância evolutiva das linhagens dentro de uma espécie (Moritz, 1994; Domínguez-Domínguez & Vásquez-Domínguez, 2009).

#### **1.4.1 A filogeografia e os Quirópteros Neotropicais**

Naqueles que foram alguns dos primeiros estudos de filogeografia para morcegos neotropicais (Ditchfield & Burns, 1998; Ditchfield, 2000), foram comparados padrões filogeográficos de 17 espécies de morcegos àqueles encontrados para pequenos mamíferos não voadores e aves da mesma região. Os resultados, de modo geral, revelaram um padrão que está de acordo com aquele que poderia ser esperado para animais com grande potencial de dispersão: Baixa divergência intraespecífica, normalmente inferior a 4%. Uma exceção foi *G. soricina*, espécie em que as diferenças chegaram a 7% entre populações.

Posteriormente, Hoffman & Baker (2001), realizaram estudos evolutivos envolvendo o gênero *Glossophaga*, dando um enfoque para a filogeografia de *G. soricina*, que dentre as

cinco espécies do gênero foi a que apresentou maiores valores de divergência intraespecífica, levando-os a retomar a sugestão de Webster (1983) de que se tratavam, na verdade, de duas espécies. Hoffman & Baker conduziram em 2003 um estudo de filogenia comparada para espécies do gênero *Carollia*. Os resultados obtidos, como eles deixam claro na conclusão, foram similares aos obtidos por Ditchfield (2000). Hoffman & Baker (2003) ainda sugeriram que o efeito combinado do soerguimento dos Andes e a formação do istmo do Panamá seriam eventos associados à origem da grande biodiversidade atual dos neotrópicos.

Com o intuito de testar hipóteses acerca do isolamento entre populações de ilhas nas Pequenas Antilhas, Carstens *et al.* (2004), compararam o padrão de diversificação em três espécies de filostomídeos (*Artibeus jamaicensis*, *Brachyphylla cavernarum* e *Ardops nichollsi*) com base em sequências de Cyt-b. Seus resultados não corroboraram a hipótese que supunha monofiletismo para populações de diferentes ilhas. Contudo, para *B. cavernarum* e *Ardops nichollsi*, esses resultados não significam que haja fluxo gênico entre populações de diferentes ilhas. Em *B. cavernarum*, por exemplo, parece haver manutenção de polimorfismo ancestral. Já em *Artibeus jamaicensis*, o fluxo gênico parece explicar a inexistência de linhagens específicas para cada ilha.

Em 2007, Larsen *et al.*, estudando o complexo *Artibeus jamaicensis*, com base em DNA mitocondrial, propuseram que três das 13 subespécies fossem elevadas ao status de espécie. Os autores chegaram a tal conclusão após terem verificado a existência de três clados bastante divergentes (distância média de 6%) e o não compartilhamento de haplótipos específicos. Ainda nesse mesmo ano, Martins *et al.* (2007), relataram a existência de quatro clados delimitados geograficamente, associados a diferentes biomas brasileiros, para a espécie de morcego vampiro *Desmodus rotundus*. Com base na divergência entre grupos, que variou de 6 a 10%, os autores sugeriram que talvez esta não se tratasse de uma única espécie.

Já em 2009, Martins *et al.*, dando continuidade a estudos com *D. rotundus*, empregaram uma amostragem mais abrangente tanto em número de indivíduos como de localidades e marcadores, desta vez, fazendo uso também de marcadores nucleares (RAG2 e DBR). O padrão filogeográfico descrito, similar àquele encontrado para outras espécies neotropicals, bem como os tempos de divergência estimados, caracterizam eventos de vicariância que ocorreram no Pleistoceno. Os autores relataram ainda uma clara divisão no sentido entre Leste e Oeste da América do Sul, provavelmente devido a ambientes áridos que separavam a Floresta Atlântica da região Amazônica e do Pantanal, durante o Pleistoceno.

Estudos filogeográficos envolvendo 18 populações mexicanas do morcego *Pteronotus davyi* foram realizados com base no domínio hipervariável II da região controle do DNAm

(Guerava-Chumacero *et al.*, 2010). As distâncias genéticas entre as populações variaram entre 1.7 e 2%, sendo que grande parte era devido à variação intrapopulacional. No entanto, os autores ressaltaram a existência de elevada variância inter-regional, confirmada por valores significativos de  $F_{st}$  (0.23 e 0.42, ambos para  $P < 0,05$ ). Os resultados ainda sugeriram que os padrões de diversidade genética para *P. davyi* pode ter sofrido influência dos eventos pleistocênicos.

Mais recentemente, foram analisados os padrões de diversificação em duas espécies do gênero *Carollia*, *C. perspicillatae* e *C. brevicauda* (Pavan *et al.* 2011). As distâncias genéticas entre linhagens de uma mesma espécie, bem como o relato da existência de dois clados distintos em *C. brevicauda* foram similares àquela encontrada em trabalhos anteriores. O tempo de divergência estimado entre *C. perspicillatae* e *C. brevicauda* corroboraram a hipótese de Hoffman & Baker (2003), que sugeriram que estas espécies teriam se originado durante o Pleistoceno. Os resultados corroboraram ainda a importância de eventos, que ocorreram no Pleistoceno, na diversificação e especiação na América do Sul.

## 1.5 Marcadores Moleculares

Um marcador molecular é um caráter mensurável que permite detectar variação existente entre sequências de DNA. Desde seu surgimento, os marcadores moleculares têm sido empregados em diversos estudos com o intuito de resolver diferentes questões biológicas, tais como mapeamento genético, genética de populações e filogenética (Schlotterer, 2004).

Em um estudo filogeográfico são usados um ou mais marcadores genéticos (Arbogast & Kenagy, 2001), usualmente segmentos de DNA, a partir dos quais são quantificadas diferenças entre indivíduos ao longo da área de distribuição de uma determinada espécie. Desse modo, torna-se possível a reconstrução de genealogias moleculares, cujas relações espaciais podem ser dispostas geograficamente e analisadas para se deduzir a história evolutiva de populações, subespécies e espécies (Emerson & Hewitt 2005). O marcador mais comumente usado na primeira geração de estudos filogeográficos foi o DNA mitocondrial (DNAmt) (Arbogast & Kenagy, 2001). Os vários tipos de marcadores moleculares (polimorfismos de sequências, nucleotídeos únicos – SNPs, RFLPs, microssatélites etc.) de diferentes regiões genômicas (DNAmt, DNA nuclear autossômico, cromossomos sexuais de mamíferos) podem gerar informações de forma diversa sem que se perca a possibilidade de comparação relativa dos resultados obtidos.

## 1.6 Relevância e Justificativa

Embora já tenham sido realizados estudos abordando a filogeografia e sistemática de *G. soricina*, é possível supor que a utilização de uma amostragem com maior abrangência do território nacional aliada ao uso de um marcador adicional pode melhorar a resolução da história de diversificação dessa espécie. Isso por que o Brasil corresponde à maior parte do território por onde se distribui a subespécie *G. s. soricina*, que segundo Webster (1983) é a subespécie que mais facilmente pode ser diferenciada das demais e que, segundo estudos (Ditchfield, 2000; Hoffman & Baker, 2001), constitui uma linhagem distinta das demais subespécies.

Este trabalho justifica-se ainda por constituir parte de uma linha de pesquisa em ecologia molecular que visa caracterizar geneticamente a diversidade de quirópteros fitófagos brasileiros que são importantes como agentes dispersores de sementes e polinizadores. Portanto, garantindo a preservação destas espécies de morcegos garantem-se também os processos naturais de manutenção e regeneração de florestas.

## 2 Objetivos

O principal objetivo desse estudo foi testar hipóteses acerca da evolução e taxonomia de *G. soricina*, por meio de análises baseadas em nos marcadores moleculares citocromo b e citocromo oxidase I.

### 2.1 Objetivos específicos

- Testar a existência de estrutura populacional associada a linhagens mitocondriais;
- Testar a existência de um padrão filogeográfico para *G. soricina*;
- Investigar os processos responsáveis pela diversificação interpopulacional;
- Testar se as subespécies tradicionalmente propostas para o táxon correspondem à estruturação identificada.
- Testar a existência de duas linhagens principais em *G. soricina* (Ditchfield, 2000; Hoffman & Baker, 2001).
- Estimar o tempo de divergência entre as principais linhagens de *G. soricina*.

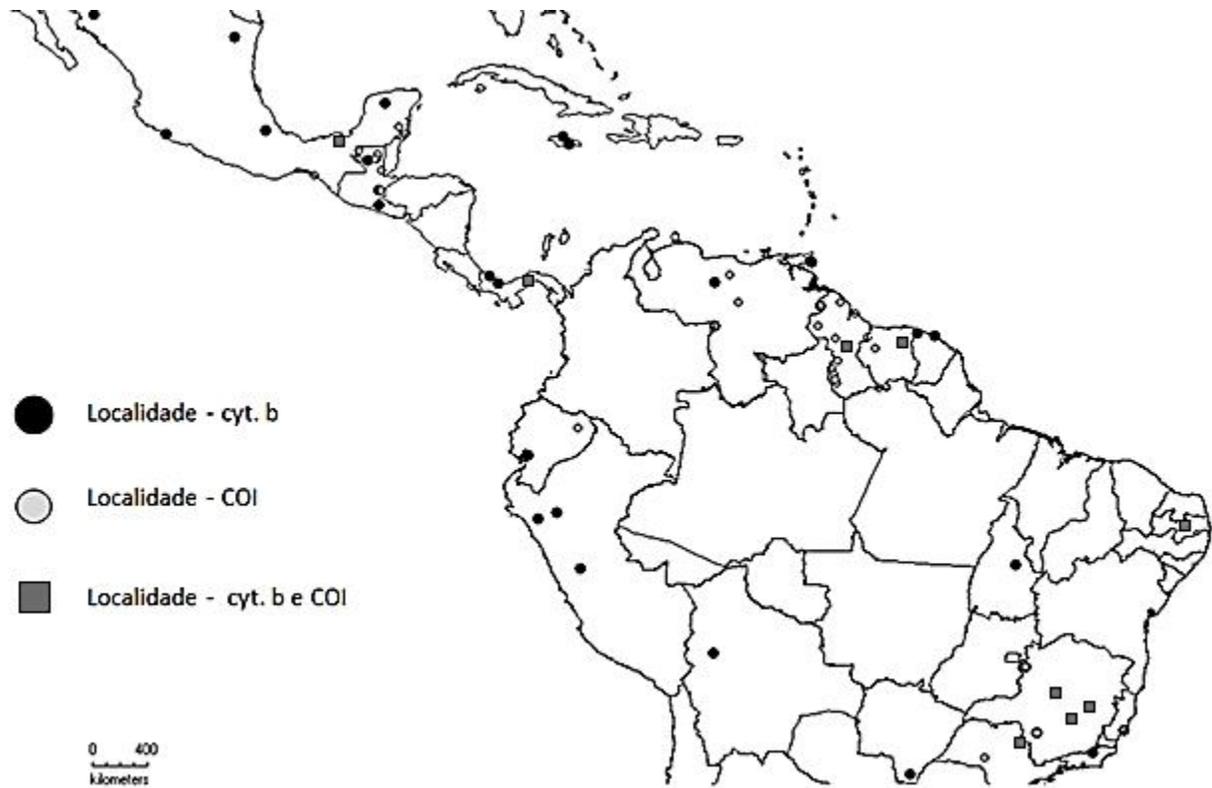
## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Amostragem

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas amostras de DNA de espécimes de *G. soricina*, que foram coletados em diferentes pontos da sua área de ocorrência em território nacional e cujo material genético encontra-se depositado no Banco de DNA do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) da Universidade Federal de Minas Gerais (Santos *et al.*, 2002). Para este trabalho foram, também, utilizadas sequências depositadas no *Genbank*. Estas correspondem tanto a amostras de *G. soricina* (espécimes coletados em diferentes países da América Latina), como amostras de outros gêneros e espécies empregados nas diferentes análises.

Nas análises envolvendo o gene Cyt-b foram utilizados 72 indivíduos, dos quais 25 foram sequenciados a partir de amostras depositadas no banco de DNA do LBEM. Foram incluídas também 32 sequências usadas em Hoffman & Baker (2001) e 16 sequências submetidas diretamente. Para as análises envolvendo o gene COI, foram utilizados 100 indivíduos, dos quais 26 foram sequenciados a partir de amostras depositadas no banco de DNA do LBEM. As demais sequências foram obtidas a partir do *Genbank* (Clare *et al.*, não publicado);

Os indivíduos amostrados, seus respectivos locais de coleta (figura 2) e número de acesso no *Genbank* (quando for o caso) encontram-se listados nos anexos 1 e 2.



**Figura 2** - Mapa contendo as localidades amostradas. Os círculos negros representam as localidades amostradas para o marcador Cyt-b. Os círculos cinza referem-se às localidades amostradas para o marcador COI. Já os quadrados de cor cinza designam localidades amostradas para ambos marcadores.

### 3.2 Métodos Moleculares

Em alguns casos, as amostras depositadas no banco de DNA não apresentavam quantidade suficiente para serem utilizadas nesse estudo. Nessa situação, optou-se por extrair o DNA de amostras de tecido depositadas em banco específico, com base no protocolo de extração com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (Sambrook *et al.*, 2001).

As amplificações por PCR (reação em cadeia da polimerase) foram realizadas para ambos os marcadores em 12  $\mu$ L de solução final, contendo: entre 10 e 20 ng de DNA genômico, 1X de tampão de reação (Invitrogen®), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,3  $\mu$ M de iniciadores (tabela 1), 0,25 U de Taq Platinum (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®). Para o marcador Cyt-b foi usado o seguinte esquema de ciclos de reações: 94°C por 5' (etapa inicial de desnaturação), seguidos por 35 ciclos caracterizados por 30" a 94°C, 30" a 50°C e 1'20" a 72°C, além de uma etapa final de extensão de 9' a 72°C (Redondo *et al.*, 2008). Já para o

marcador COI, os esquemas foram modificados a partir de Folmer *et al.* (1994): 5' a 94°C, seguidos por 35 ciclos compreendidos por 45'' a 94°C, 40'' a 50°C e 1'' a 72°C, além de uma etapa final de extensão de 9' a 72°C.

**Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas etapas de PCR**

Iniciador	Iniciadores utilizados na amplificação dos genes COI e Cyt-b			
	Sequência (5'->3')	Gene	Tamanho	Referência
L14121 (F)	GACTAATGACATGAAAAATCA	Cyt-b	1062	Redondo <i>et al.</i> 2008
H15318 (R)	TATTCCTTTGCCGGTTTACAAGACC	Cyt-b		Redondo <i>et al.</i> 2008
LCO1490 (F)	GGTGCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	COI	633	Folmer <i>et al.</i> 1994
HCO2198 (R)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COI		Folmer <i>et al.</i> 1994

Para a obtenção de resultados mais precisos durante o sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados com o intuito de eliminar o excesso de iniciadores e dNTPs. Essa etapa envolveu a precipitação do DNA amplificado em uma solução contendo polietilenoglicol 8000 (PEG) 20% (m/v) e cloreto de sódio (NaCl) 2,5 M . Após precipitados, os amplicons foram submetidos a sucessivas lavagens com etanol 80% que, após secarem, foram diluídos em água Milli-Q.

As reações de sequenciamento foram realizadas em 10 µL de solução final contendo: 4µL da solução de sequenciamento (ET DYE Terminator Kit – Amersham Biosciences), 3 µL de água Milli-Q, 2 µL de produto da PCR purificado e 1µL de iniciador específico em concentração igual a 5µM. Foram utilizados os mesmos iniciadores empregados nas reações de PCR (Tabela 1), de modo que apenas um iniciador, direto (F) ou reverso (R), foi utilizado em cada reação.

Após sequenciamento, foram seguidas as recomendações de purificação sugeridas pela fabricante do kit de sequenciamento. As amostras foram purificadas usando acetato de amônio e etanol e posteriormente diluídas em solução contendo formamida e EDTA e foram analisadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

### 3.3 Montagem e validação das sequências

Esta etapa foi realizada com o auxílio dos softwares Phred (Ewing & Green, 1998), Phrap (Green, 1994), e Consed (Gordon et al., 1998). Inicialmente o programa Phred foi utilizado para determinar, a partir dos dados gerados pelo sequenciador, as sequências com base no parâmetro  $Q \geq 20$  (onde  $Q$  é o valor de qualidade associado a uma determinada base. Variando de 0 a 100, ele é tanto maior, quanto menor for a probabilidade de erro associada a uma base em uma determinada posição).

Os fragmentos sequenciados (conhecidos como *reads*) foram montados e alinhados no programa Phrap (Green, 1994), que permite a construção de uma sequência consenso, a partir das regiões de *reads* que apresentem alta qualidade. A visualização e edição das sequências obtidas nas etapas anteriores foram feitas no programa Consed (Gordon et al., 1998).

### 3.4 Análise dos dados

Uma vez determinadas as sequências consenso de alta qualidade para ambos os marcadores utilizados no presente estudo, elas foram alinhadas juntamente com as obtidas no *Genbank*. Os conjuntos de sequências para cada um dos marcadores foram analisados separadamente, uma vez que a amostragem diferencial das localidades e indivíduos não possibilitou o concatenamento dessas sequências. Nesta etapa foi utilizando o algoritmo *Muscle* (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Como muitos dos programas empregados nas análises requerem arquivos de entrada específicos, cuja confecção pode ser trabalhosa e demorada se realizadas manualmente, foi utilizado o programa DNAsp 5 (Librado & Rozas, 2009) para facilitar esse processo e garantir maior confiabilidade. Este programa também foi empregado na determinação dos haplótipos individuais.

Algumas análises, como aquelas conduzidas no Alequin, requerem a definição *a priori* das populações ou grupos de populações. Para realizar essa tarefa foram utilizados os programas: AIS – *Alleles in Space* (Miller, 2005), Barrier 2.2 (Manni et al. 2004), Geneland 3.3.0 (Guillot et al. 2005, 2008, 2009; Guillot, 2008; Guillot & Santos, 2010; Guedj & Guillot, 2011) e SAMOVA 1.0 – *Spatial Analysis of Molecular Variance* (Dupanloup et al. 2002). Tanto o AIS como o Barrier têm suas análises baseadas no algoritmo de máxima diferença de Monmonier (Monmonier, 1973), que permite identificar áreas onde a diferença entre pares de populações é elevada e que podem ser interpretadas como barreiras genéticas. Contudo, eles utilizam

métodos distintos para contabilizar as diferenças genéticas. O programa Geneland, que implementa algoritmos de agrupamento, pode ser operado de modo que diferentes modelos genéticos sejam combinados ou não a modelos espaciais. Já o SAMOVA apresenta uma abordagem que define grupos de populações para os quais a proporção da variação genética total é decorrente da diferença entre grupos é máxima (Dupanloup *et al.* 2002).

Após serem definidas as populações, diferentes estimativas populacionais, intra- e interpopulacionais, foram inferidas com o auxílio dos programas como Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), DNAsp 5 e MEGA 5. Dentre as estimativas destacam-se alguns índices de diversidade molecular: diversidade haplotípica ( $h$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e sítios segregantes ( $s$ ). Estas estatísticas foram estimadas para cada conjunto de dados (populações, grupos de populações e linhagens). Para a contextualização e interpretação dos estimadores de diversidade  $\pi$  e  $s$  e detecção de possíveis eventos populacionais (como gargalo de garrafa) foram realizados os teste o D de Tajima (Tajima, 1989) e o  $F_s$  de Fu (Fu, 1997).

A partir das sequências dos haplótipos, foram medidas as distâncias genéticas entre indivíduos, entre populações e entre agrupamentos populacionais. Esses cálculos foram realizados no DNAsp e no MEGA 5. Histogramas com a diferença absoluta entre os pares de sequências dos haplótipos observados foram utilizados para calcular a distribuição de desencontros (*mismatch distribution*; Slatkin & Hudson, 1991) nas populações de *G. soricina* com o intuito de testar a ocorrência de expansão populacional.

Análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) baseada em estimativas de  $F_{st}$  e  $\Phi_{st}$  foram utilizadas para testar a partição da variabilidade genética em diferentes tipos de agrupamentos populacionais com o intuito de testar padrões de estrutura populacional e barreiras geográficas ao fluxo gênico.

Análises de distribuição espacial da variação genética foram feitas pelo teste de Mantel (programa Arlequin) e autocorrelação espacial (programa AIS).

### **3.5 Análises filogenéticas e filogeográficas e estimativa de tempos de divergência**

Com o intuito de testar a existência linhagens filogenéticas distintas, foram realizadas análises filogenéticas com base nos métodos de distância (*Neighbor-Joining* – NJ), Máxima Parcimônia (MP) e *MedianJoining* (MJ – Bandelt *et al.*, 1999). O programa MEGA 5 foi utilizado para a construção da árvore baseada no método NJ; PAUP\* (Swofford, 1998) permitiu a inferência de árvores pelo método MP, que foi realizada por meio de busca heurística, com os

seguintes parâmetros: *stepwise addition (random)* e *branch swapping (TBR - tree bisection and reconnection)*. O *bootstrap* foi utilizado como teste medida de suporte de filogenias em ambos os programas, tendo sido realizado com um total de 10000 replicações.

O algoritmo MJ, implementado no Network 4, possibilitou a construção de uma rede de haplótipos (*network*). Posteriormente ela foi processada utilizando a opção *MP calculation*, que permite remover informações que não estão presentes nas menores árvores da *network*.

Estimativas dos tempos de diversificação entre as principais linhagens de *G. soricina* foram conduzidas no software BEAST 1.5 (Rambaut *et al.* 2007). O modelo de relógio molecular escolhido foi "*Relaxed Clock: Uncorrelated Log-normal*" e o "*tree prior*" foi definido como *Yule process*, recomendado pelo autor em casos de filogenias de espécies. Já o modelo de substituição utilizado foi definido com auxílio do JModeltest (Posada, 2008), que indicou o modelo HKY + I + G. Foram utilizados como pontos de calibração, os tempos de divergência estimados para filostomídeos nectarívoros em Datzman *et al.* (2010). Os operadores para a execução do algoritmo MCMC, que foi realizada em 10 milhões de gerações, foram ajustados automaticamente após marcada a opção auto-otimizar. Os resultados fornecidos pelo Beast foram analisados com auxílio do programa Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007), considerando-se um *burnin* de 1 milhão.

## 4 Resultados

### 4.1 Descrição dos dados

#### 4.1.1 Cyt-b

Segmentos de 1062 pares de base (pb) do gene mitocondrial Cyt-b foram sequenciados para 25 espécimes de *G. soricina*, em sua maioria coletados em território nacional. Essas sequências foram somadas àquelas disponíveis no *Genbank* (anexo 1), totalizando uma amostragem de 72 indivíduos para essa espécie. Para algumas das análises, como os cálculos de distância genética interespecífica ou análises filogenéticas, foram utilizadas sequências de outras espécies, que também foram obtidas no *Genbank*.

Em *G. soricina*, 889 dentre os 1062 sítios analisados eram monomórficos. A partir dessas sequências foi possível identificar 62 haplótipos com 173 sítios variáveis, compostos por 13 autapomorfias (ou *singletons*) e 160 sítios informativos para análises de parcimônia.

### **4.1.2 COI**

O gene mitocondrial COI teve 632 pb sequenciados para 23 indivíduos de *G. soricina*. Outras sequências referentes a exemplares coletados em diferentes pontos de ocorrência da espécie foram obtidas a partir do *Genbank* (anexo 2), perfazendo um total de 100 amostras. Assim como ocorreu para o Cyt-b, sequências de outras espécies foram adicionadas ao conjunto de dados para a realização de análises interespecíficas e filogenéticas.

Dentre os 632 sítios, 552 eram invariáveis e 80 polimórficos, dos quais 54 eram informativos para análises de parcimônia e 26 eram autapomórficos. No total, foram identificados 52 haplótipos.

## **4.2 Definição dos agrupamentos de indivíduos**

### **4.2.1 Cyt-b**

A execução das análises intraespecíficas se deu com base em diferentes formas de agrupamentos. Em um primeiro momento, essa divisão foi feita de modo que os grupos refletissem as subespécies amostradas: *G. s. valens*, *G. s. handleyi*, *G. s. antillarum* e *G. s. soricina* (cujos locais de ocorrência e amostragem, encontram-se nas figuras 1 e 2, respectivamente).

Posteriormente, análises conduzidas no Geneland, com pelo menos quatro simulações envolvendo cinco milhões de iterações cada uma, sugeriram quatro agrupamentos de indivíduos, conforme a figura 3. Tais grupos, que foram designados pelos códigos Gen1, Gen2, Gen3 e Gen4, eram constituídos por: Gen1 contém os indivíduos amostrados no Peru e Equador; Gen2 é constituído de indivíduos da Bolívia e dos países do norte da América do Sul; Gen3 é composto por Brasil e Paraguai; e Gen4 engloba as amostras da América Central e México.

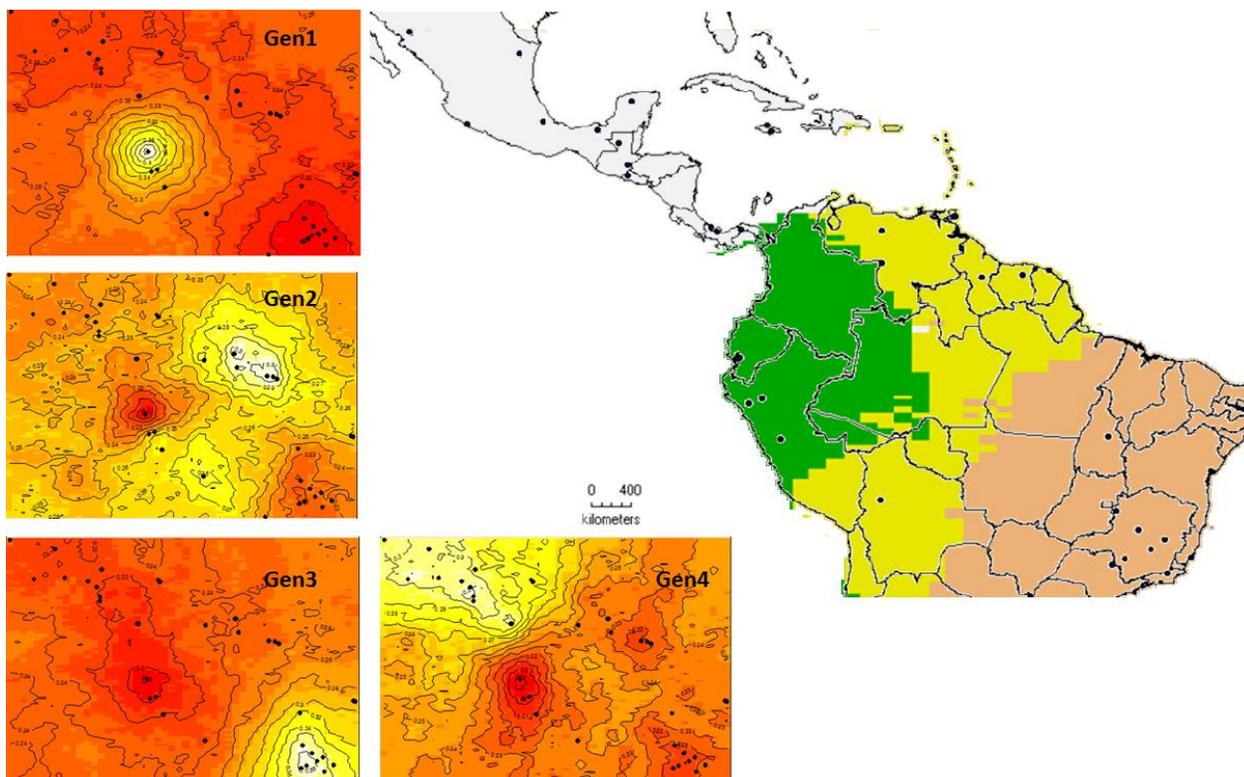


Figura 3– O mapa à direita ilustra cada um dos 4 agrupamentos (de modo que cada cor representa um grupo) de indivíduos sugeridos pelo Geneland. As figuras ao lado do mapa representam a probabilidade de cada ponto (localidade amostrada) pertencer àquele grupo. Respeitando-se uma gradação que vai do vermelho ao branco, quanto mais clara a região em que se encontra um determinado ponto, maior a probabilidade do mesmo pertencer àquele grupo.

A rede haplotípica (figura 4) também foi útil como fonte de informação para a definição de agrupamentos empregados em análises subsequentes. Construída a partir do Cyt-b, a rede de haplótipos permitiu a demarcação de grupos filogenéticos bem delimitados que refletiam uma subespécie proposta ou um subgrupo da mesma. A esses grupos também foram dados nomes que aludissem às subespécies às quais pertenciam: *G. s. valens*, *G. s. antillarum* (os mesmos nomes foram dados, pois, no que concerne às amostras constituintes, estes e os grupos apresentados anteriormente, de igual nome, são idênticos), *G. s. handleyi* P (onde o P, advém de Panamá, logo, entende-se que esse grupo é composto por espécimes do Panamá). *G. s. handleyi* N (composto por amostras do México, Guatemala e El Salvador). *G. s. soricina* N (que inclui indivíduos do Suriname, Venezuela, Guiana e Guiana Francesa). Por fim *G. s. soricina* S (englobando as sequências de espécimes do Brasil, Paraguai, Bolívia e região leste do Peru). Testou-se ainda as variáveis genéticas associadas aos haplogrupos principais (figura

3) H1 (que engloba indivíduos do México, da América Central e região Oeste dos Andes) e H2 (que contém os indivíduos da América do Sul – Leste dos Andes).

As filogenias construídas pelos métodos de distância (NJ) e MP (figura 5), recuperaram grupos monofiléticos (filogrupos), em geral com bom suporte estatístico (*bootstrap*), idênticos àqueles observados nas redes haplotípicas, que foram construídos pelo algoritmo MJ. Assim como nas análises filogenéticas, os resultados gerados pelo Samova e AIS sugeriram agrupamentos semelhantes àqueles inferidos pelos métodos anteriores e, portanto foram desconsiderados, evitando assim dados e resultados redundantes.

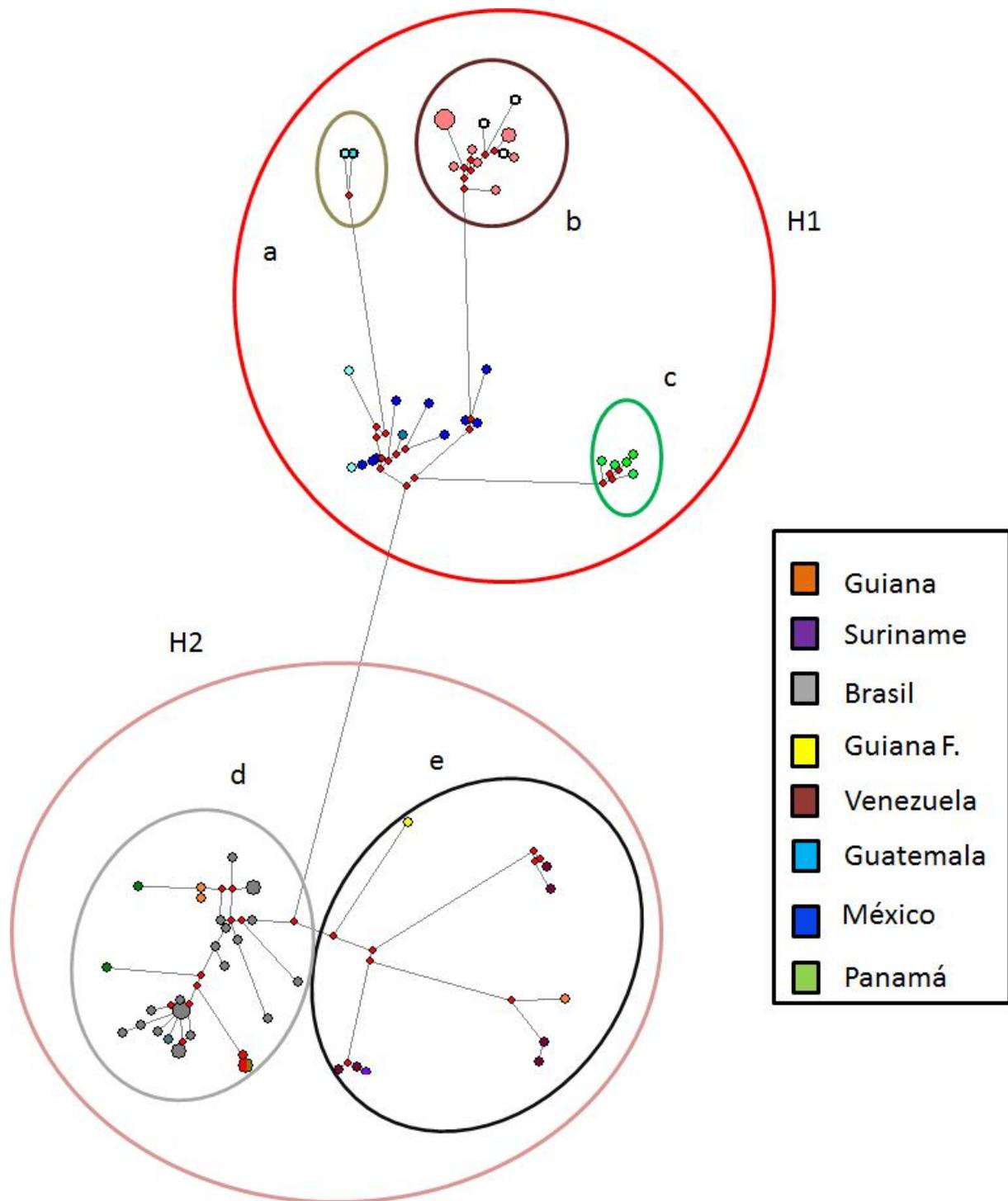


Figura 4 – Rede haplotípica construída pelo método de *Median-joining*, a partir de sequência de Cyt-b. H1- representa o haplogrupo principal 1 (que engloba indivíduos da América Central e região Oeste dos Andes); H2- representa o haplogrupo principal 2 (que contém os indivíduos da América do Sul – Leste dos Andes). a) subgrupo *G. s. antillarum*; b) subgrupo *G. s. valens*; c) subgrupo *G. s. handleyi* P; d) subgrupo *G. s. soricina* S; e) subgrupo *G. s. soricina* N.

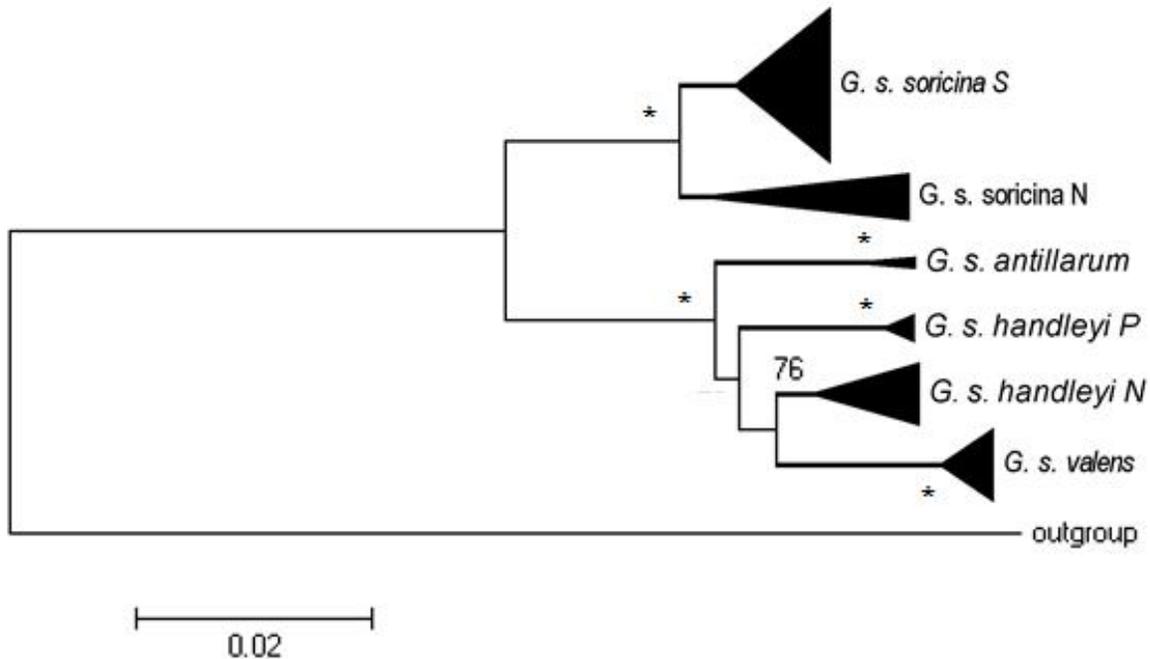


Figura 5 – árvore filogenética construída pelo método de distância (NJ) com base no gene Cyt-b para diferentes subespécies de *Glossophaga soricina*. As relações entre os filogrupos, bem como o monofiletismo dos mesmos, são os mesmos apresentados pela análise de MP. Os asteriscos representam valores de *bootstrap* superiores a 90 (para ambos os métodos).

#### 4.2.2 COI

Os mesmos procedimentos empregados na determinação dos grupos para o gene Cyt-b foram também utilizados para o COI. Contudo, cabe ressaltar que, apesar do maior número de espécimes amostrados para este marcador, não foram incluídos exemplares das subespécies *G. s. valens* e *G. s. antillarum*, dada a indisponibilidade das mesmas.

Os resultados obtidos no Geneland após pelo menos quatro simulações com cinco milhões de iterações cada uma sugeriram quatro agrupamentos de indivíduos (figura 6). Tais grupos, que foram nomeados com os códigos 1Gen, 2Gen, 3Gen e 4Gen são constituídos da seguinte maneira: 1Gen abarca os indivíduos brasileiros; no grupo 2Gen estão as amostras da Guiana, Guiana Francesa e Suriname; enquanto no 3Gen encontram-se aqueles amostrados na Venezuela e Equador; e o 4Gen contém as amostras da América Central e México.

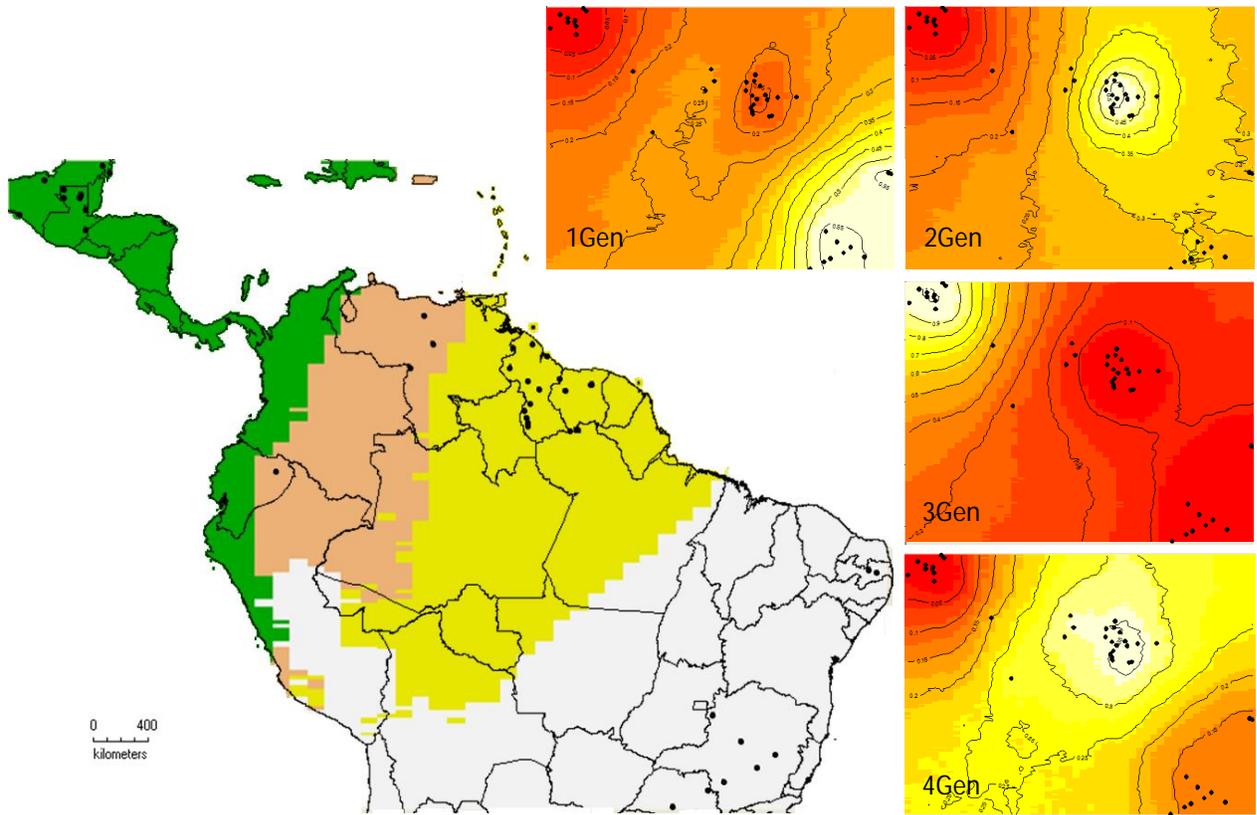


Figura 6 - O mapa à esquerda ilustra cada um dos 4 agrupamentos (de modo que cada cor representa um grupo) de indivíduos sugeridos pelo Geneland com base no gene COI. As figuras ao lado do mapa representam a probabilidade de cada ponto (localidade amostrada) pertencer àquele grupo. Respeitando-se uma graduação que vai do vermelho ao branco, quanto mais clara a região em que se encontra um determinado ponto, maior a probabilidade do mesmo pertencer àquele grupo.

A rede haplotípica (figura 7) construída a partir do gene COI permitiu a determinação de dois haplogrupos principais bem delimitados que, neste caso, refletiam as subespécies *G. s. soricina* (1H, na figura 7) e *G. s. handleyi* (2H – na figura 7). Além desses agrupamentos mais abrangentes, puderam ser identificados subgrupos (representados por números na figura 7): *G. s. soricina* N (amostras da Venezuela, Suriname, Guiana e Equador); *G. s. soricina* S (Brasil, Guiana e Suriname); *G. s. handleyi* N (México e Guatemala); *G. s. handleyi* P (Panamá). De modo geral, os subgrupos apresentam as mesmas relações geográficas entre si, quando comparados aos subgrupos reconhecidos na rede haplotípica construída para o gene Cyt-b.

As análises filogenéticas (NJ e MP - figura 8) recuperaram como grupos monofiléticos, em geral com bom suporte estatístico (*bootstrap*), idênticos àqueles construídos pelo algoritmo MJ. Assim como nas análises filogenéticas, os resultados gerados pelo Samova e AIS sugeriram agrupamentos similares àqueles inferidos anteriormente.

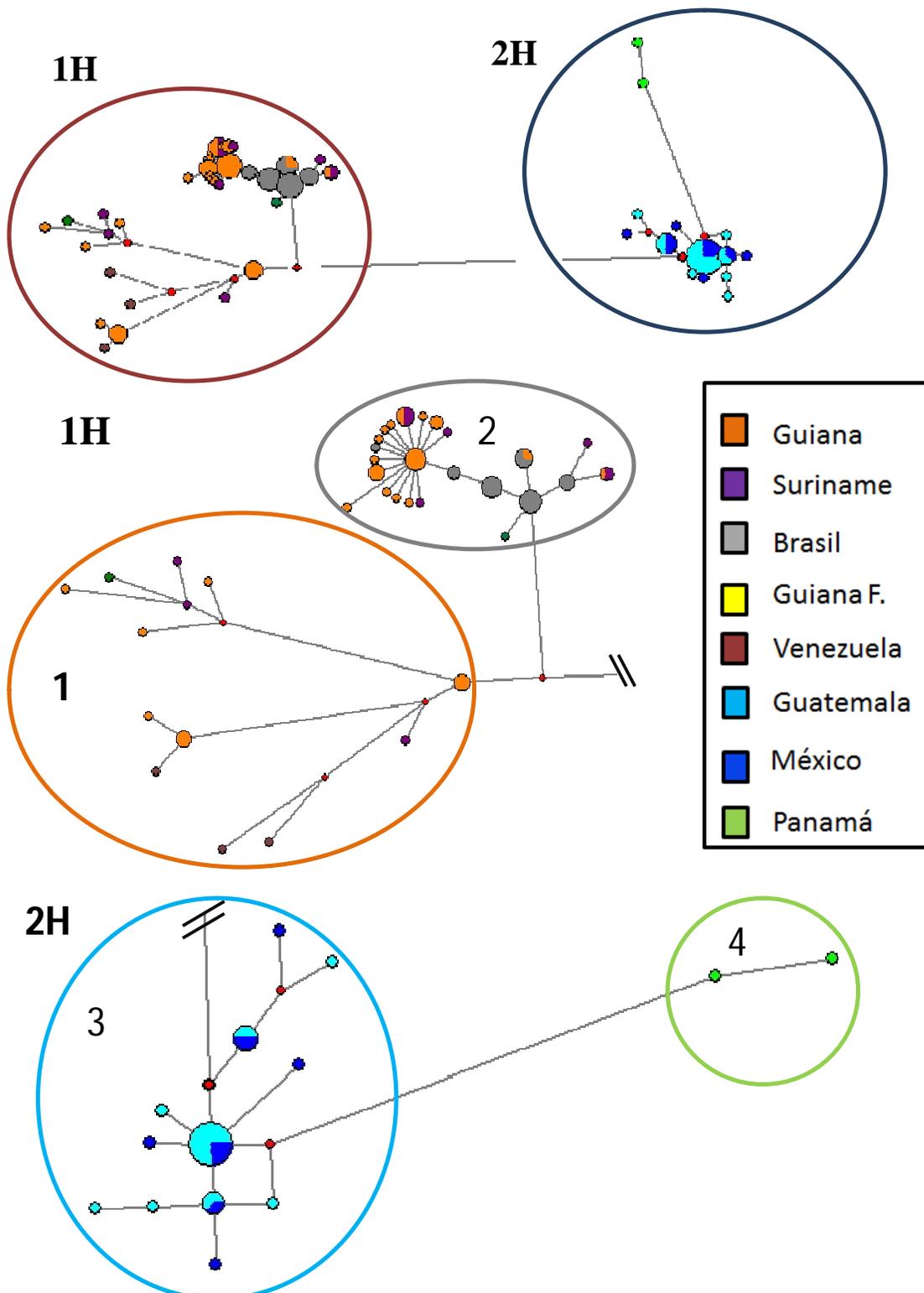


Figura 7 - Rede haplotípica construída pelo método de MJ, com base no gene COI. A *network* foi dividida em seus dois haplogrupos principais para que pudessem ser verificadas com mais clareza as relações entre os diferentes haplótipos. 1H representa um dos dois haplogrupos principais (México, Guatemala e Panamá). 2H representa o outro haplogrupo principal (América do Sul – leste dos Andes). Os números representam os subgrupos: 1) *G. s. soricina* N (Venezuela, Suriname e Equador); 2) *G. s. soricina* S (Brasil, Guiana e Suriname); 3) *G. s. handleyi* N (México e Guatemala); 4) *G. s. handleyi* P (Panamá).



**Figura 8 - árvore filogenética construída pelo método de distância (NJ) com base no COI. As relações entre os filogrupos, bem como o monofiletismo dos mesmos, são os mesmos apresentados pela análise de MP. Os asteriscos representam valores de *bootstrap* superiores a 90 (para ambos os métodos).**

### 4.3 Padrões de variabilidade

Como exposto anteriormente, foram registrados 62 haplótipos (H) para 72 indivíduos que tiveram o gene Cyt-b sequenciado. A diversidade haplotípica (h) calculada para esse conjunto de dados foi de  $h = 0,995 \pm 0,004$ , ao passo que a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de  $\pi = 0,041 \pm 0,001$ . Os resultados desses estimadores de diversidade molecular para o gene COI foram os seguintes:  $h = 0,969 \pm 0,008$  e  $\pi = 0,023 \pm 0,001$ .

Antes de prosseguir com os testes populacionais, foi realizado o teste de Mantel para verificar a ausência (inferida a partir das redes haplotípicas e dados gerais de diversidade molecular) de correlação entre distância genética e distância geográfica. Os resultados para ambos marcadores sugerem correlação não significativa entre distância genética e geográfica. Sendo  $r = 0,1$  ( $P << 0,01$ ) para Cyt-b e  $r = 0,2$  ( $p << 0,01$ ).

Com o intuito de avaliar se as distâncias genéticas entre os principais clados em *G. soricina* eram comparáveis às medidas de divergência interespecífica para esse gênero, foram calculadas as distâncias entre pares de espécies para *Glossophaga* (tabela 2). Para o gene Cyt-b as distâncias variaram de  $0,09 \pm 0,010$  (entre *G. leachi* e *G. longirostris*) até  $0,151 \pm 0,013$  (entre *G. leachi* e *G. soricina*). Já para o COI, as distâncias variaram entre  $0,078 \pm 0,011$  (entre *G. leachi* e *G. longirostris*) e  $0,163 \pm 0,017$  (entre *G. commissarisi* e *G. soricina*).

As diferenças intraespecíficas foram calculadas para cada um dos pares de filogrupos identificados nas análises filogenéticas (tabelas 4 e 5). Para ambos os genes, as maiores distâncias foram registradas entre pares de linhagens de haplogrupos diferentes.

Tabela 2 – Distância genética (K2P) interespecífica para espécies de *Glossophaga*, com base no gene Cyt-b. Os valores, em negrito, abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de espécies, seguidos de seus respectivos desvios.

	<i>G. soricina</i>	<i>G. commissarisi</i>	<i>G. leachi</i>	<i>G. longirostris</i>
<i>G. soricina</i>	-	-	-	-
<i>G. commissarisi</i>	<b>0,148±0,012</b>	-	-	-
<i>G. leachi</i>	<b>0,151±0,013</b>	<b>0,111±0,010</b>	-	-
<i>G. longirostris</i>	<b>0,146±0,012</b>	<b>0,110±0,010</b>	<b>0,09±0,010</b>	-

Tabela 3 – Distância genética (K2P) interespecífica para espécies de *Glossophaga*, com base no gene COI. Os valores, em negrito, abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de espécies, seguidos de seus respectivos desvios.

	<i>G. soricina</i>	<i>G. longirostris</i>	<i>G. leachi</i>	<i>G. commissarisi</i>
<i>G. soricina</i>	-	-	-	-
<i>G. longirostris</i>	<b>0,151±0,015</b>	-	-	-
<i>G. leachi</i>	<b>0,156±0,016</b>	<b>0,078±0,011</b>	-	-
<i>G. commissarisi</i>	<b>0,163±0,017</b>	<b>0,152±0,016</b>	<b>0,147±0,015</b>	-

Dentro de um mesmo filogrupos, as menores distâncias registradas foram 0.028 ±0,008, entre *G. s. valens* N e *G. s. valens* P (para o Cyt-b); e 0,017 ±0.005 entre os mesmo pares de linhagens (para o COI). É interessante destacar o fato de a diferença entre essas duas linhagens, pertencentes à mesma subespécie, ser tão grande quanto àquele encontrado entre duas subespécies: 0,031 ±0.005 entre *G. s. handleyi* N e *G. s. valens*. Também foram registrados valores tão altos quanto 0,072 ±0,008, entre *G. s. valens* e *G. s. soricina* N (Cyt-b). Para COI, as maiores distâncias não foram tão altas, chegando a no máximo 0,046 ±0,009 entre *G. s. handleyi* P e *G. s. soricina* N.

**Tabela 4 – Distância genética (K2P) intraespecífica entre filogrupos de *G. soricina* para o gene o gene Cyt-b. Os valores abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de filogrupos, seguidos de seus respectivos desvios. Já os valores em negrito representam as distância média dentro de cada filogrupos.**

	<i>G. s. valens</i>	<i>G. s. soricina</i> N	<i>G. s. handleyi</i> N	<i>G. s. handleyi</i> P	<i>G. s. antillarum</i>	<i>G. s. soricina</i> S
<i>G. s. valens</i>	<b>(0.007)</b>	-	-	-	-	-
<i>G. s. soricina</i> N	0.072±0,008	<b>(0.026)</b>	-	-	-	-
<i>G. s. handleyi</i> N	0.031±0,005	0.067±0,007	<b>(0.012)</b>	-	-	-
<i>G. s. handleyi</i> P	0.036±0,006	0.07±0,008	0.028±0,005	<b>(0.004)</b>	-	-
<i>G. s. antillarum</i>	0.037±0,006	0.071±0,008	0.033±0,005	0.037 ±0,006	<b>(0.008)</b>	-
<i>G. s. soricina</i> S	0.071 ±0,008	0.034 ±0,004	0.062 ±0,007	0.062 ±0,007	0.061 ±0,007	<b>(0.012)</b>

**Tabela 5 – Distância genética (K2P) intraespecífica entre filogrupos de *G. soricina* para o gene o gene COI. Os valores abaixo da diagonal representam as distâncias entre os pares de filogrupos, seguidos de seus respectivos desvios. Já os valores em negrito representam as distância média dentro de cada filogrupos.**

	<i>G. s. soricina</i> S	<i>G. s. handleyi</i> P	<i>G. s. soricina</i> N	<i>G. s. handleyi</i> N
<i>G. s. soricina</i> S	<b>(0.005)</b>	-	-	-
<i>G. s. handleyi</i> P	0.046±0,009	<b>(0.003)</b>	-	-
<i>G. s. soricina</i> N	0.022±0,004	0.046±0,007	<b>(0.012)</b>	-
<i>G. s. handleyi</i> N	0.042±0,008	0.017±0,005	0.044±0,007	<b>(0.003)</b>

Os padrões de variabilidade intraespecífica foram testados por meio da análise de variância molecular (AMOVA) entre os diferentes agrupamentos inferidos neste trabalho. O resumo desses dados encontra-se nas tabelas 6 (Cyt-b) e 7 (COI).

De modo geral, independentemente do agrupamento proposto, foi possível observar altos valores de diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica, indicando expansão populacional (Avise, 2000). Embora a maioria dos grupos tenha apresentado valores não significativos para o D de Tajima, alguns deles apresentaram valores negativos e significativos para o Fs de Fu, que também pode estar associado a rápido crescimento populacional (expansão populacional recente).

Os indivíduos foram agrupados em um primeiro momento de acordo com a subespécie a que pertenciam. A designação de um indivíduo a uma determinada subespécie foi feita com base na localidade em que ele foi amostrado, de acordo com o mapa de distribuição das subespécies apresentado na figura 1. A utilização do critério localidade amostrada parece ter permitido a correta atribuição dos indivíduos as suas respectivas subespécies, já que as análises filogenéticas recuperaram tais grupos como monofiléticos (que para o gene COI, coincidiu com a definição com base em haplogrupos, já que apenas duas subespécies foram

amostradas). Esse agrupamento apresentou um  $\Phi_{ST} = 0,675$  ( $P \ll 0,01$ ), indicando baixo fluxo gênico entre as subespécies. Todas elas apresentaram elevada diversidade haplotípica (sendo  $1 \pm 0,018$  para a subespécie *G. s. handleyi*) e reduzida diversidade nucleotídica. Os grupos formados pelas subespécies *G. s. soricina* e *G. s. handleyi*, apresentaram  $F_s$  de  $F_u$ , respectivamente, igual a -6,013 e -4, 511 que, corroborado pela topologia da rede haplotípica, pode indicar expansão populacional.

Dois fatos se mostraram interessantes: i) as subespécies tradicionalmente reconhecidas constituem grupos monofiléticos; ii) nos resultados obtidos anteriormente, as distâncias entre filogrupos serem similares àquelas calculadas entre pares de subespécies dentro de um mesmo haplogrupo. Diante disso, decidiu-se dividir os indivíduos com base nos filogrupos. Esse arranjo resultou na partição das subespécies *G. s. soricina* (*G. s. soricina* S e *G. s. soricina* N) e *G. s. handleyi* (*G. s. handleyi* N e *G. s. handleyi* P) em duas linhagens cada. Os resultados foram similares aos obtidos para a divisão anterior (onde grupos correspondiam a subespécies): alta diversidade haplotípica, baixa diversidade nucleotídica, porém com um superior  $\Phi_{ST} = 0,752$  ( $P = 0$ ). Os resultados para os testes de neutralidade mostraram-se significativos para as linhagens *G. s. soricina* S ( $F_s$  de  $F_u = -7,147$ ) e *G. s. handleyi* N ( $F_s$  de  $F_u = 4,14$ ).

O mesmo procedimento foi adotado para o COI. Os cálculos com base no particionamento dos grupos de indivíduos de modo que eles refletissem linhagens monofiléticas conduziram a resultados muito similares aos obtidos com Cyt-b. Contudo, os valores de diversidade haplotípica foram um pouco mais baixos, sendo o mais alto  $h = 0,955 \pm 0,036$  (*G. s. soricina* N) e o mais baixo  $h = 0,800 \pm 0,068$  (*G. s. handleyi* N). Ambos os testes de neutralidade apresentaram resultados significativos e negativos para os grupos *G. s. soricina* S (D de Tajima = -1,507 e  $F_s$  de  $F_u = -16,876$ ) e *G. s. handleyi* N (D de Tajima = -1,627 e  $F_s$  de  $F_u = -7,055$ ). Isso talvez indique que essas duas linhagens sejam responsáveis pelos valores negativos encontrados nos testes de neutralidade para as subespécies *G. s. soricina* e *G. s. handleyi*.

Os resultados inferidos a partir do Geneland para ambos os marcadores, apesar de reunirem em um mesmo grupo indivíduos de linhagens diferentes, mostraram-se plausíveis do ponto de vista espacial. Além disso, mostraram-se similares aos obtidos para os agrupamentos anteriores: a começar pelo elevado  $\Phi_{ST} = 0,72$  ( $P = 0$ ) para Cyt-b e  $\Phi_{ST} = 0,732$  ( $P = 0$ ) para COI. Os testes de neutralidade indicaram expansão populacional para os grupos Gen3 ( $F_s$  de  $F_u = -6,292$ ) e Gen4 ( $F_s$  de  $F_u = -6,141$ ), de acordo com os resultados anteriores; os grupos 2Gen e 4Gen parecem ter experimentado crescimento populacional recente, como sugerido pelos valores negativos e significativos de  $F_s$  de  $F_u$  (-9,771 e -6,243, respectivamente) e conforme observado na rede de haplótipos da figura 7.

Por fim, os indivíduos foram reunidos com base nos haplogrupos principais (aqueles separados por muitos passos mutacionais – figuras 4 e 7). Para esse arranjo, foram registrados valores de  $\Phi_{ST} = 0,645$  (para Cyt-b) e  $\Phi_{ST} = 0,775$  (COI), similares aos descritos anteriormente. A elevada diversidade haplotípica e reduzida diversidade nucleotídica para ambos os marcadores também foram recorrentes, bem como os valores significativos e negativos para os testes de neutralidade. A concordância entre esse dados mostra que são plausíveis os agrupamentos propostos anteriormente.

**Tabela 6**—Análises intraespecíficas baseadas no gene Cyt-b: Índices de diversidade e testes de neutralidade calculados para diferentes agrupamentos em *G. soricina*. Os valores em negrito representam valores significativos ( $P < 0,05$ ), enquanto os dados em itálico representam valores não significativos ( $P > 0,05$ ). Gen1: Peru e Equador; Gen2: Norte da América do Sul e Bolívia; Gen3: Brasil e Paraguai; Gen4, América Central e México. H1: América Central e oeste dos Andes; H2 (América do Sul – leste dos Andes).

Agrupamentos	Índices de diversidade					Teste de Neutralidade	
	$\Phi_{ST}$	N	H	h	$\pi$	D	Fs de Fu
<b>subespécies</b>							
<i>G. s. valens</i>		14	10	0,923 ±0,060	0,02 ±0,02	-0,171	-1,317
<i>G. s. handleyi</i>	<b>0,675</b>	18	18	1,000 ±0,018	0,026 ±0,01	-0,528	<b>-4,511</b>
<i>G. s. soricina</i>		37	30	0,989 ±0,008	0,02 ±0,01	-0,877	<b>-6,013</b>
<i>G. s. antillarum</i>		2	2	-	-	-	-
<b>Filogrupos</b>							
<i>G. s. handleyi</i> P		5	5	1,000 ±0,126	0,003 ±0,002	-0,197	-1,632
<i>G. s. antillarum</i>		2	2	-	-	-	-
<i>G. s. soricina</i> N	<b>0,752</b>	11	11	1,000 ±0,038	0,027 ±0,014	0,07	-1,513
<i>G. s. soricina</i> S		28	23	0,984 ±0,01	0,011 ±0,006	-0,898	<b>-7,147</b>
<i>G. s. handleyi</i> N		12	12	1,000 ±0,034	0,011 ±0,006	-0,919	<b>-4,14</b>
<i>G. s. valens</i>		14	10	0,923 ±0,060	0,02 ±0,02	-0,171	-1,317
<b>Geneland</b>							
Gen1		16	12	0,941 ±0,048	0,021 ±0,010	-0,594	0,925
Gen2	<b>0,72</b>	13	13	1,000 ±0,032	0,028 ±0,014	0,19	-2,202
Gen3		24	20	0,981 ±0,018	0,014 ±0,005	-0,779	<b>-6,292</b>
Gen4		19	19	1,000 ±0,017	0,020 ±0,018	-0,299	<b>-6,141</b>
<b>Haplogrupos</b>							
H1	<b>0,645</b>	33	29	0,986 ±0,0135	0,024 ±0,012	-0,107	<b>-6,232</b>
H2		39	34	0,991 ±0,008	0,021 ±0,010	<b>-0,733</b>	<b>-10,397</b>

Tabela 7 – Análises intraespecíficas baseadas no gene COI: Índices de diversidade e testes de neutralidade calculados para diferentes agrupamentos em *G. soricina*. Os valores em negrito representam valores significativos ( $P < 0,05$ ), enquanto os dados em itálico representam valores não significativos ( $P > 0,05$ ). 1Gen: Brasil; 2Gen: Guiana e Suriname; 3Gen: Venezuela e Equador; 4Gen: México, Panamá e Guatemala. 1H: América do Sul (leste dos Andes); 2H: México, Guatemala e Panamá.

Agrupamentos	Índices de diversidade					Teste de Neutralidade	
	$\Phi_{ST}$	N	H	H	$\pi$	D	Fs de Fu
<b>Filogrupos</b>							
<i>G. s. handleyi</i> P		2	2	-	-	-	-
<i>G. s. soricina</i> S	<b>0,818</b>	51	24	0,952	0,004	<b>-1,507</b>	<b>-16,876</b>
				$\pm 0,012$	$\pm 0,002$		
<i>G. s. soricina</i> N		17	13	0,955	0,014	<i>-0,189</i>	<i>-2,315</i>
				$\pm 0,036$	$\pm 0,007$		
<i>G. s. handleyi</i> N		30	13	0,800	0,003	<b>-1,627</b>	<b>-7,055</b>
				$\pm 0,068$	$\pm 0,002$		
<b>Geneland</b>							
1Gen		20	6	0,831	0,002	<i>-0,34</i>	<i>-1,053</i>
				$\pm 0,045$	$\pm 0,001$		
2Gen	<b>0,732</b>	43	27	0,964	0,012	<i>-0,95</i>	<b>-9,771</b>
				$\pm 0,014$	$\pm 0,006$		
3Gen		5	5	1,000	0,021	<i>-0,543</i>	<i>0,07</i>
				$\pm 0,126$	$\pm 0,138$		
4Gen		32	15	0,824	0,004	<b>-1,643</b>	<b>-6,243</b>
				$\pm 0,062$	$\pm 0,002$		
<b>Haplogrupos = subspecies</b>							
1H	<b>0,775</b>	32	15	0,824	0,004	<b>-1,643</b>	<b>-6,243</b>
				$\pm 0,06$	$\pm 0,002$		
2H		68	37	0,970	0,011 $\pm$	<i>-1,221</i>	<b>-17,068</b>
				$\pm 0,007$	0,006		

#### 4.4 Estimativa do tempo de divergência

Hoffman e Baker (2001) estimaram o tempo de divergência entre as duas principais linhagens de *G. soricina* entre 2 e 4 milhões de anos atrás. Para tanto, eles adotaram o modelo de relógio molecular e assumiram taxas de substituição constantes entre as linhagens entre 2,3% e 5% por milhão de anos, como sugerido em Arbogast e Slowinski (1998) e Smith e Patton (1999).

Para definir essas datas, foram realizadas análises dos tempos de divergência para os principais clados de *G. soricina* por meio do programa BEAST. As simulações foram executadas com base no gene Cyt-b, assumindo o modelo “*Relaxed Clock: Uncorrelated Log-normal*”, que considera as variações das taxas ao longo dos ramos de uma árvore filogenética.

Os resultados das estimativas do tempo de divergência para os dois clados principais, isto é, entre o clado constituído por *G. s. soricina* e o clado que contém as demais subespécies, sugerem que ela tenha ocorrido no Plioceno entre 2,59 e 5,08 milhões de anos (figura 9). Esses valores assemelham-se àqueles calculados por Hoffman e Baker (2001), pois, apesar de existir heterogeneidade das taxas entre diferentes linhagens, elas parecem variar pouco, como indicado pelo parâmetro *uclid.stdev*= 0,213 (quanto mais próximo de zero, mais homogêneas são as taxas entre os ramos, ou seja, quanto mais próximo de zero, mais os dados se comportam de acordo com o modelo de relógio molecular estrito). Os tempos também foram inferidos para outras linhagens.

As linhagens de *G. s. soricina*, *G. s. soricina* S e *G. s. soricina* N, parecem ter se diversificado no Pleistoceno, uma vez que seu ancestral comum mais recente (MRCA) é datado entre 1,24 e 2,58 milhões de anos atrás. Já as demais subespécies têm seu MRCA datado entre 1,23 e 2,66 milhões de anos atrás. As linhagens deste haplogrupo também parecem ter se diversificado no Pleistoceno, como por exemplo, *G. s. handleyi* P e *G. s. handleyi* N, que parecem ter se divergido entre 0,92 e 2,05 maa.

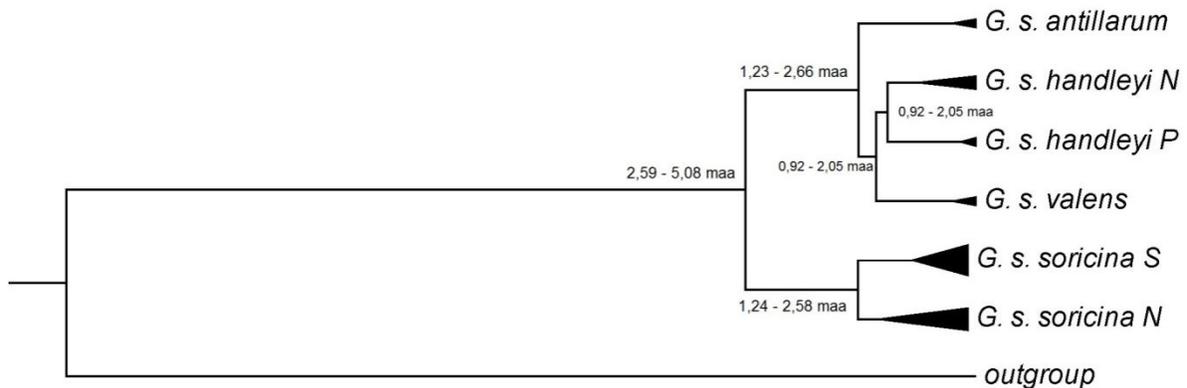


Figura 9 – Estimativas do tempo de divergência para os principais filogrupos em *G. soricina*, baseados no gene Cyt-b. Próximo a cada nó estão representados os intervalos de confiança (95%). maa = milhões de anos

## 5 Discussão

Os elevados valores de diversidade haplotípica associados aos baixos valores de diversidade nucleotídica condizem com um padrão esperado para espécies com ampla capacidade de dispersão. Esse padrão fica evidente, também, nas redes haplotípicas, onde é possível observar que haplótipos das mesmas localidades estão intimamente relacionados (separados por poucos passos mutacionais). Há ainda casos extremos onde indivíduos do estado de Minas Gerais compartilham um haplótipo com um indivíduo da Guiana. Todavia é interessante notar que os consideráveis valores de  $\Phi_{ST}$ , que indicam estruturação das subespécies e filogrupos, não destoam dos resultados que sugerem relevante capacidade de dispersão. Isso por que tanto subespécies como filogrupos apresentam ampla distribuição, como verificado a partir das baixas distâncias genéticas dentro de cada subespécie ou filogrupo.

As diferentes abordagens empregadas neste estudo (filogenética, filogeográfica e populacional), revelaram com resultados congruentes para ambos os marcadores utilizados, a existência de duas linhagens principais em *G. soricina*, corroborando os resultados de Ditchfield (2000) e Hoffman e Baker (2001). Talvez seja digno de nota o fato de que essas linhagens, doravante denominadas clado norte (englobando indivíduos da América Central, México e região oeste dos Andes na América do sul) e clado sul (indivíduos da região a leste dos Andes na América do Sul), também tenham sido recuperadas em análise filogeográfica com base em um segmento de 450 pb do gene nuclear DBY para 60 sequências obtidas no *Genbank*. Contudo, esse segmento mostrou-se bastante conservado, de modo que apenas um passo mutacional separava os dois únicos haplótipos, o que resultou em uma topologia com baixo suporte estatístico. Isso fez com que esse marcador fosse desconsiderado nas análises principais.

Quando são confrontados os resultados do presente estudo com o histórico taxonômico dessa espécie, notam-se alguns aspectos curiosos sobre a atual classificação. O primeiro aspecto é a questão suscitada por Webster (1983) e retomada (mas não discutida) por Hoffman e Baker (2001): *Glossophaga soricina* representaria, na verdade, duas espécies distintas? De acordo com Webster (1983), alguns traços característicos de *G. s. soricina* tornam essa subespécie aquela que mais facilmente pode ser distinguida das demais. O autor ainda destaca algumas características que justificam o seu ponto de vista: *G. s. soricina* apresenta o menor tamanho registrado para a espécie; sua pelagem é a mais escura; o rostro é curto e estreito e a caixa craniana é abobadada e igualmente arredondada ao longo de sua borda posterior. As diferenças, no entanto, não se restringem aos caracteres morfológicos, já que diante dos

resultados aqui apresentados, essa subespécie parece também se diferenciar das demais, principalmente de *G. s. valens*, em termos genéticos e evolutivos.

Como salientado por Hoffman e Baker (2001), as distâncias genéticas entre os dois cladogramas principais, sendo um formado por *G. s. antillarum*, *G. s. handleyi* e *G. s. valens* e o outro por *G. s. soricina*, são comparáveis às distâncias calculadas entre pares de espécies em outros gêneros da família Phyllostomidae. Essa equivalência entre distâncias genéticas pode ser observada também dentro do próprio gênero *Glossophaga*. As tabelas 2 e 3 contêm as distâncias genéticas entre pares de espécies para esse gênero calculadas com base nos genes mitocondriais Cyt-b e COI respectivamente. As tabelas 4 e 5 contêm as distâncias entre pares de filogrupos para as subespécies de *G. soricina*. É possível notar, com base nesses dados, que a divergência, levando-se em conta os desvios, entre *G. longirostris* e *G. leachi* é comparável àquela calculada entre os filogrupos do clado sul (*G. s. soricina* N e *G. s. soricina* S) e os filogrupos do clado norte (*G. s. handleyi* N, *G. s. handleyi* P, *G. s. valens* e *G. s. antillarum*). Essa distância é, em alguns casos, o dobro daquela entre filogrupos dentro de um mesmo clado.

Chama a atenção a grande distância genética entre o clado que contém *G. s. soricina* e o clado que contém as demais subespécies. Aliado a isso está o fato deles constituírem grupos monofiléticos com alto suporte estatístico, haja vista os altos valores de *bootstrap* (superiores a 90) que asseguram o monofiletismo de ambos os cladogramas, em árvores filogenéticas inferidas por diferentes métodos e com base em marcadores distintos. Há, ainda, outra forte evidência indicando a existência de duas linhagens divergentes: os resultados da análise filogeográfica. Nessas, os cladogramas norte e sul estão claramente separados por inúmeros passos mutacionais.

O tempo estimado para a divergência entre esses dois cladogramas está entre 2,5 e 5,1 milhões de anos. Para esse mesmo período, Simpson (1979) sugeriu que teriam ocorrido eventos orogênicos responsáveis por moldar a configuração altitudinal atual nos Andes. Segundo essa autora, eventos geológicos que se sucederam no Plioceno e Pleistoceno teriam promovido a elevação das cadeias de montanhas andinas a altitudes superiores a 2000 m. Esses acontecimentos poderiam ter culminado em uma disjunção na distribuição de *G. soricina*, oferecendo, portanto, uma barreira que, se não causou o cessamento, reduziu drasticamente o fluxo gênico entre as populações situadas nas regiões oeste e leste dos Andes. Uma consequência, pode ter sido a divergência alopátrica dessas populações que resultou nos cladogramas norte e sul observados atualmente.

O outro aspecto que merece ser discutido é o fato dos filogrupos refletirem as subespécies propostas, ainda que nem todos os filogrupos tenham seu monofiletismo

associado a altos valores de *bootstrap*. Talvez nesse caso em especial, deva-se desconsiderar os valores de *bootstrap* inferiores a 90, uma vez que os filogrupos também refletem os haplogrupos determinados a partir da rede haplotípica. Esses resultados deixam claro que algumas subespécies, *G. s. soricina* e *G. s. handleyi*, são constituídas por mais de uma linhagem filogenética: *G. s. soricina* N e *G. s. soricina* S; *G. s. handleyi* N e *G. s. handleyi* P.

É possível observar nas tabelas 4 e 5 (distâncias genéticas intraespecíficas), tanto para Cyt-b como para COI, que as distâncias genéticas (levando-se em conta os desvios) são muito similares entre as subespécies de um mesmo clado. Pode-se, ainda observar que essas distâncias são similares entre linhagens dentro de um mesmo clado, o que permitiria sugerir que os filogrupos de *G. s. soricina*, assim como os de *G. s. handleyi*, apresentam um nível de divergência genética, para os marcadores analisados, comparável ao observado entre as subespécies tradicionalmente reconhecidas. A congruência entre esses resultados e a discussão a seguir, permitem sugerir que *G. s. soricina* e *G. s. handleyi*, sejam, cada uma delas, constituídas de duas subespécies.

Quando são comparados os padrões filogeográficos e filogenéticos encontrados, neste trabalho, com os resultados de Nyári (2007 – figura 10), torna-se evidente que as linhagens de *G. s. soricina*, assim como as de *Schiffornis turdina* (Nyári, 2007), estão distribuídas no espaço (figura 11) obedecendo um padrão que coincide com áreas de endemismo propostas por Cracraft e Prum (1988). Com base nesse cenário, é possível fazer sugestões acerca da diferenciação das linhagens do clado sul. De modo que a retração de áreas florestais restringiu não só a distribuição de *G. s. soricina* aos *refúgios* (5, 6 e 7, na figura 10), mas também o fluxo gênico entre eles. Entretanto, a ausência de barreiras físicas entre essas regiões, associada à grande mobilidade de *G. s. soricina*, sugerem que tão logo se iniciou a expansão das florestas, deu-se início também à dispersão de *G. s. soricina*, que levou ao restabelecimento do fluxo gênico entre as linhagens. Isso explicaria a grande distância genética (quando comparada às demais linhagens) encontrada para *G. s. soricina* N, bem como o baixo suporte estatístico para os filogrupos *G. s. soricina* S e *G. s. soricina* N.

Esses dados, contudo, parecem contrastar com uma espécie que é capaz de voar até 60 Km em uma noite (von Helversen & Reyer, 1984); que pode ser encontrada nos mais variados habitats e em altitudes que podem alcançar os 2600 m (Alvarez *et al.*, 1991). Associado a essas características que sugerem uma considerável capacidade de dispersão, está o fato de não haver barreiras geográficas identificáveis ao longo da distribuição dessa espécie, além da cordilheira dos Andes. Nesse sentido, é possível que tal cenário possa ser explicado com base no mesmo argumento apresentado por Martins *et al.* (2009). Esses autores

sugerem que barreiras ecológicas impostas pela fragmentação florestal, durante o Pleistoceno, sejam as responsáveis pelo padrão de estruturação observado em *Desmodus rotundus*. Sustentada por algumas evidências, essa hipótese é, também, bastante plausível para explicar o padrão observado em *G. soricina*. Alguns pontos em favor dessa hipótese são: i) estudos recentes que abordam o efeito da fragmentação florestal sobre morcegos, cujos resultados apontam *G. soricina* como uma espécie com baixo potencial adaptativo (Reis *et al.*, 2003). ii) As datas de divergência estimadas para as linhagens de *G. soricina* remetem ao Pleistoceno. iii) As localidades onde são encontradas cada uma dessas linhagens estão, de certo modo, correlacionadas aos refúgios dessa época. iv) Essas parecem estar em expansão populacional (como pode ser verificado pelos testes de neutralidade e pela topologia das redes de haplótipos). Apesar das evidências, deve-se ressaltar que esta hipótese deve ser testada, de modo mais aprofundado, por meio de métodos de modelagem de nicho.

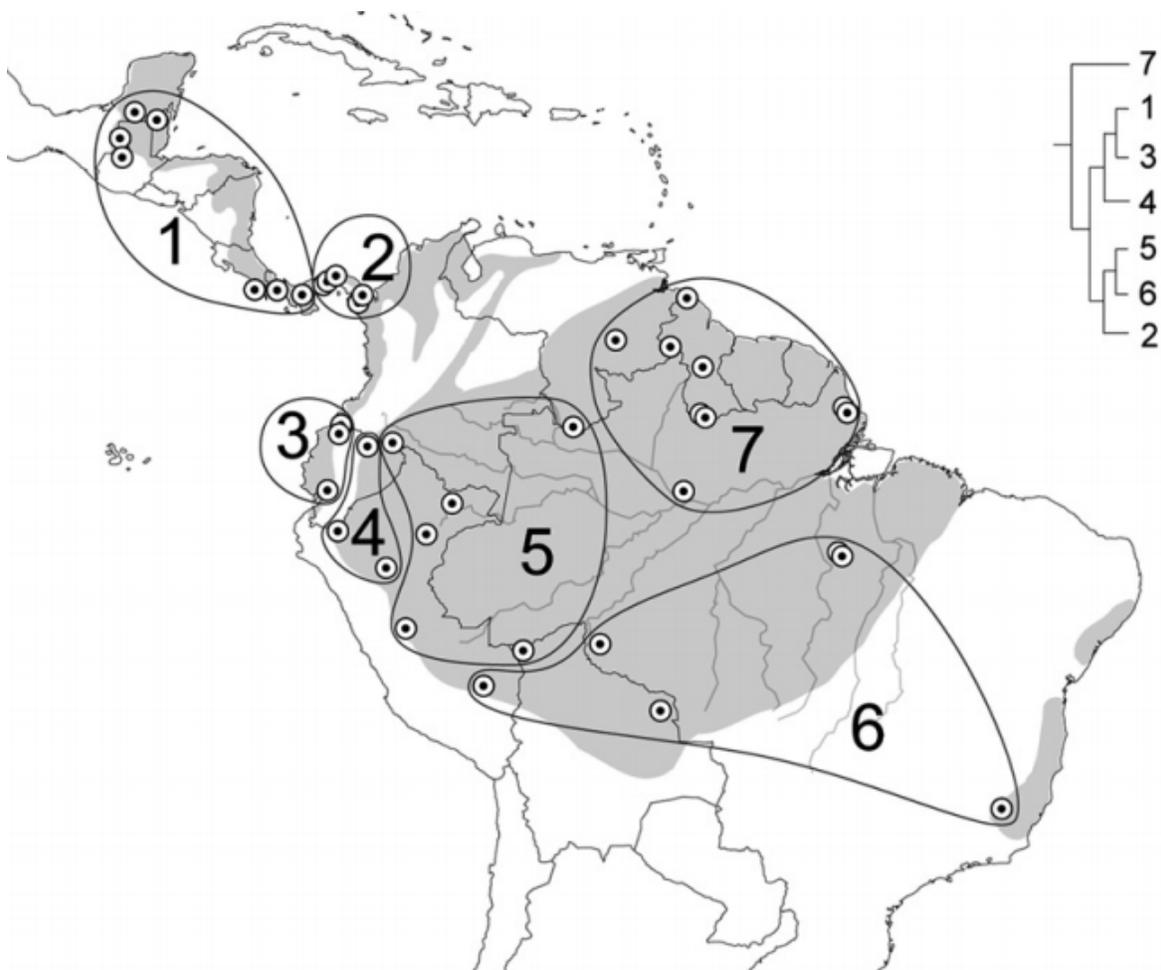


Figura 10 – Filogrupos de *Schiffornis turdina* (reproduzido a partir de Nyári, 2007) refletem a áreas de endemismo propostas por Cracraft e Prum (1988).

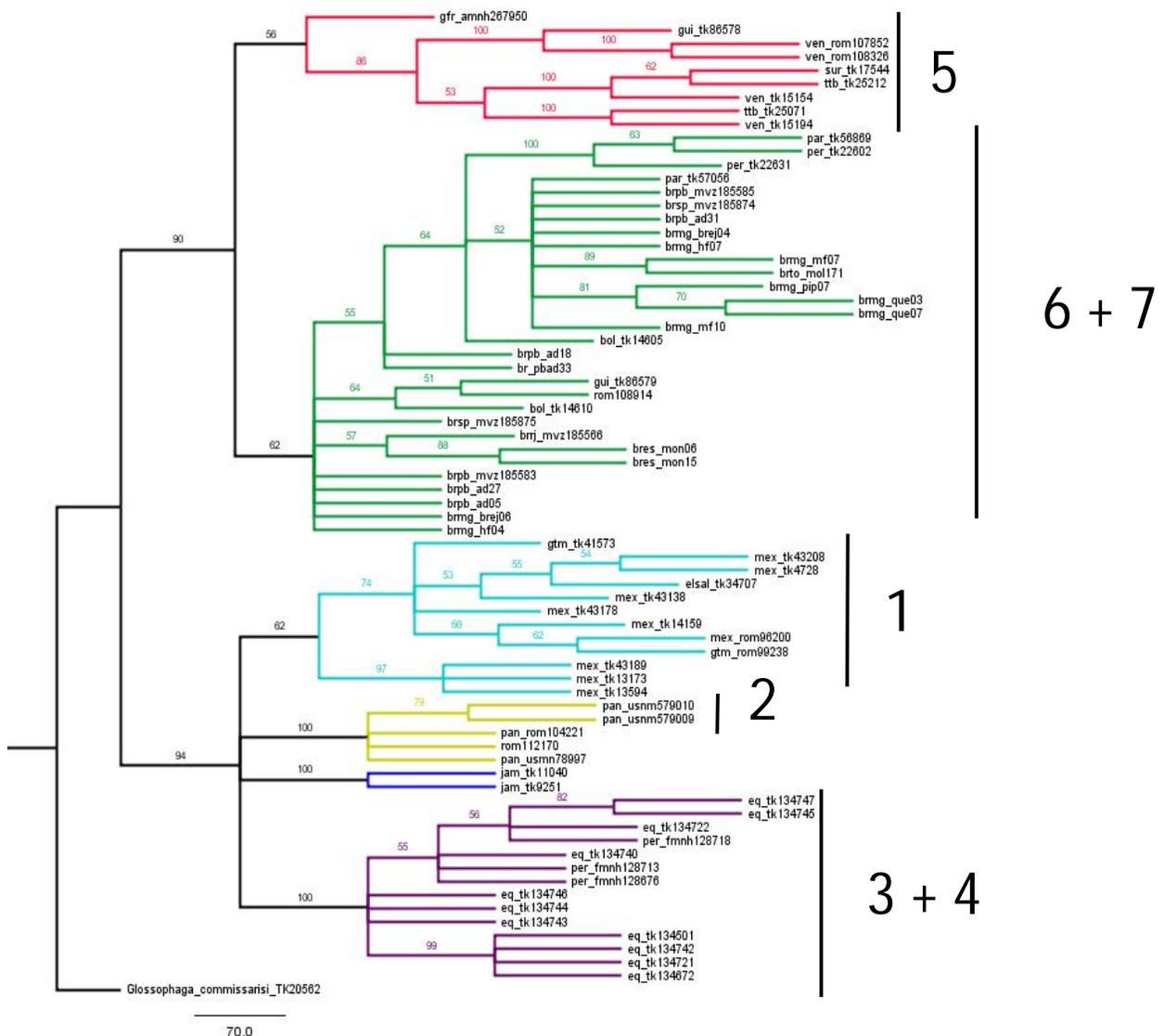


Figura 11 – Árvore filogenética construída pelo método MP (para o gene Cyt-b), ilustrando os diferentes filogrupos (representados aqui por diferentes cores). As barras verticais relacionam os filogrupos de *G. soricina* e *Schiffornisturdina* (apresentado na figura anterior).

É interessante notar ainda que os resultados sugerem que, provavelmente, nem todas as linhagens tenham se diferenciado como resultado de eventos de vicariância apenas. *G. s. valens*, por exemplo, parece ter se originado a partir de populações de *G. s. handelyi* que se dispersaram ao longo da costa pacífica do continente americano (a oeste da Cordilheira da América Central) até ocupar a região oeste dos Andes. Do mesmo modo, populações de *G. s.*

*handleyi*, que alcançaram a região leste da Cordilheira da América Central, no Panamá, parecem ter dado origem ao filogrupo *G. s. handleyi* P. Contudo, a diferenciação entre *G. s. handleyi* N e *G. s. handleyi* P parece ter ocorrido efetivamente durante as glaciações do Pleistoceno, quando eventos de vicariância levaram à redução do fluxo gênico, que parece ter se mantido reduzido em função da existência de uma barreira geográfica, a Cordilheira da América Central.

Talvez o elemento menos complexo da biogeografia de *G. soricina* seja a colonização da Jamaica. Caso em que a dispersão parece ser o elemento chave para o desencadeamento de processos que resultaram na divergência entre duas ou mais populações. Por que apenas dois indivíduos de *G. s. antillarum* foram incluídos neste trabalho, pouco pôde ser inferido à respeito dessa subespécie. Entretanto, a baixa amostragem não impediu que fosse inferido o período que que ela teria se divergido. As estimativas apontam para datas entre 1,23 3 2,66 maa. Essas estimativas de tempo corroboram a hipótese de Baker e Genoways (1978), a qual sugere que *G. soricina* teria partido da península do Yucatán, no México, em um momento em que o nível das águas oceânicas era menor. Sugerindo a refutação da hipótese de viacariância como explicação para a presença de *G. soricina* nas Antilhas, já que esta requer que a separação entre a linhagem que hoje ocupa as ilhas caribenhas e as linhagens que ocupam o continente tenha ocorrido no Plioceno.

## 6 Conclusões

Os resultados desse estudo revelam que o padrão filogeográfico de *Glossophaga soricina* é marcado por processos de diversificação que têm início no Plioceno, quando eventos geológicos podem ter influenciado o surgimento de duas grandes linhagens principais. Contudo, é durante o Pleistoceno que ocorrem eventos de diversificação que refletem a distribuição atual, dando origem a, pelo menos, seis novas linhagens. Nesse período, as modificações climáticas foram acompanhadas de mudanças nos ecossistemas, cuja fragmentação dos ambientes florestais devem ter influenciado a dispersão e diversificação intraespecífica em *G. soricina*.

Desta, decorrem as outras conclusões:

- As análises baseadas em dados mitocondriais corroboram dados encontrados na literatura ao indicar a existência de duas linhagens principais em *G. soricina*. Linhagens que apresentam níveis de divergência genética próximo àquele encontrado entre pares de espécies para esse mesmo gênero e superior àquele encontrado entre espécies de outros gêneros da família Phyllostomidae.

- As estimativas dos tempos de divergência permitiram concluir que a cordilheira dos Andes foi fundamental para a diversificação das duas linhagens principais. Assim como os eventos de glaciação no Pleistoceno foram fundamentais para o desenvolvimento das subespécies em *G. soricina*.
- O fato das subespécies de *G. soricina* corresponderem a grupos monofiléticos associados aos refúgios pleistocênicos leva à conclusão de esta é uma espécie suscetível à fragmentação de habitat, corroborando os dados da literatura.
- A influência dos eventos de vicariância na diversificação de linhagens em *G. soricina*, foram mais relevantes para populações da América do Sul.
- A subespécie *G. s. valens* teve origem a partir da dispersão de *G. s. handleyi*.
- A colonização da Jamaica por *G. soricina* ocorreu no Pleistoceno por dispersão, sendo esta uma evidência que refuta a hipótese de vicariância (que requer que essa linhagem tenha se divergido das demais no Plioceno).

## 7 Referências

- Adkins, R. M., & Honeycutt, R. L. (1991). Molecular phylogeny of the superorder Archonta. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 88, 10317-10321.
- Alvarez, J., Willig, M. R., Jone, J. K., & Webster, W. D. (1991). *Glossophaga soricina*. *Mammalian Species*(379), 1-7.
- Arbogast, B. S., & Slowinski, J. B. (1998). Pleistocene speciation and the mitochondrial DNA clock. *Science*, 282, 1955a.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge
- Arbogast, B., & Kenagy, G. J. (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal Biogeography*(28), 819-825.
- Avise, J. C. (1998). The history and the purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371-379.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., et al. (1987). Intra-specific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*(18), 489-522.
- Baker, R. J., Hofer, S. R., Porter, C. A., & Van den Bussche, R. A. (2003). Diversification among new world leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence and of DNA sequence. *Occasional Papers of Museum of Texas Tech University*(230), 1-36.
- Bermingham, E., & Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*(7), 367-369.
- Carstens, B. C., Lundrigan, B. L., & Meyers, P. (2002). A phylogeny of the neotropical nectar-feeding gats (Chiroptera: Phyllostomidae) based on morphological and molecular data. *Journal of Mammalian Evolution*(9), 23-53.
- 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, 2557-2566.
- De Knecht, L. V., Silva, J. A., Moreira, E. C., & Sales, G. L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57(5), 576-583.
- De Knecht, L. V., Silva, J. A., Moreira, M., & Sales, G. L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Zootec.*, 57(5), 576-583.

- De La Mar, S. (2001). Neotropical-nectar feeding bats (family Phyllostomidae) revisited: Lingual data support a recently-proposed molecular phylogeny. *Honors Project*. Paper 5.  
[http://digitalcommons.iwu.edu/bio\\_honproj/5](http://digitalcommons.iwu.edu/bio_honproj/5)
- 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), 1307-1318.
- Ditchfield, A. D., & Burns, K. (1998). DNA sequences reveal phylogeographic similarities of neotropical bats and birds. *Journal of Comparative Biology*, 3(2), 165-170.
- Domínguez-Domínguez, O., & Vásquez-Domínguez, E. (2002). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*(32), 59-70.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.*, 32(5), 1792-1797.
- Emerson, B. C., & Hewitt, G. M. (2005). Phylogeography. *Current Biology*, 15(10), 367-371.
- Esbérard, C. E. (2003). Diversidade de morcegos em área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências*, 5(2), 189-204.
- Esbérard, C. E., Luz, J. L., Costa, L. M., & Lourenço, E. C. (2011). Morcegos (Mammalia, Chiroptera) da Reserva Rio das Pedras, Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1), 1-7.
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., & Green, P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8, 175-185.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*(1), 47-50.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Ferrarezzi, H., & Gimenez, E. A. (1996). Systematic Patterns and the Evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia). *J. Comp. Biol.*, 75-94.

- Fleming, T. H., Venable, D. L., & Herrera, L. G. (1993). Opportunism vs. specialization: the evolution of dispersal strategies in fleshy-fruited plants. *Vegetatio*, 107-120.
- Fu, X. Y. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Gardner, A. L. (2008). *Mammals of South America: Volume I. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. University of Chicago Press.
- Gordon, D. (2004). Current Protocols in Bioinformatics. In A. D. Baxevanis, & D. B. Davison (Eds.), *Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed* (pp. 11.2.1-11.2.43). New York: John Wiley & Co.
- Gordon, D., Abajian, C., & Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8, 195-202.
- Guevara-Chumacero, L. M., Lopez-Wilchis, R., Pedroche, F. F., Juste, J., Ibáñez, C., & Barriga-Sosa, I. D. (2010). Molecular phylogeography of *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) in Mexico. *Journal of Mammalogy*, 91(1), 220-232.
- Guillot, G., Santos, F., & Estoup, A. (2008). Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, 24(11), 1406-1407.
- Griffiths, T. A. (1978). Muscular and vascular adaptations for nectar-feeding in the glossophagine bats *Monophyllus* and *Glossophaga*. *Journal of Mammalogy*, 59(2), 414-418.
- Griffiths, T. A. (1982). Systematics of the New World nectar-feeding bats (Mammalia, Phyllostomidae), based on the morphology of the hyoid and lingual regions. *American Museum Novitates*, 2742, 1-45.
- Hoffman, F. G., & Baker, R. J. (2003). Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). *Molecular Ecology*(12), 3403-3414.
- Hoffman, G. F., & Baker, R. J. (2001). Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-b gene. *Journal of Mammalogy*, 82(4), 1092-1101.
- Kotait, I. (2003). *Manual Técnico do Instituto Pasteur - Manejo de quirópteros em áreas urbanas* (Vol. 7).
- Kunz, T. H., & Fenton, M. B. (2003). *Bat Ecology*. London: University of Chicago Press.
- Larsen, P. A., Hooper, S. R., Bozeman, M. C., Pedersen, S. C., Genoways, H. H., Philips, C. J., et al. (2007). Phylogenetics and phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* complex based on cytochrome b dna sequences. *Journal of Mammalogy*, 88(3), 712-727.

- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J. J., & Suchard, M. A. (2010). Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time. *Molecular Biology and Evolution*, 27(8), 1877-1885.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*(25), 1451-1452.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA Polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lopez, J. E., & Vaughan, C. (2007). Food niche overlap among neotropical frugivorous bats in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 55(1), 301-313.
- 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*, 29(9), 1-13.
- Miller, M. P. (2005). Alleles in Space: Computer software for the join analysis of individual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96, 722-724.
- Monmonier, M. S. (1973). Maximum-Difference Barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, 3, 245-261.
- Muchhala, N. (2006). Nectar bat shows huge tongue in its rib cage. *Nature*, 444, 701.
- Myers, P., Espinosa, R. P., Jones, T., Hammond, G. S., & Dewey, T. A. (2011, Agosto 18). Noseleaves.
- Navarro, D., & Wilson, D. E. (1982). *Vampyrum spectrum*. *Mammalian Species*(184), 1-4.
- Nikaido, M., Harada, M., Cao, Y., Hasegawa, M., & Okada, N. (2000). Monophyletic origin of the Order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequences of the mitochondrial DNA of a Japanese megabat, the Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *Journal of Molecular Evolution*, 51, 318-328.
- Novacek, M. J. (1992). Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*, 256, 121-125.
- Nowak, R. M. (1994). *Walker's Bats of the World*. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, .
- Pavan, A. C., Martins, F., Santos, F. R., Ditchfield, A. D., & 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 Linnean Society*, 102, 527-539.
- Peracchi, A. L., Lima, I. P., Reis, N. R., Nogueira, M. R., & Ortêncio-Filho, H. (2006). Ordem Chiroptera. In N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro, & I. P. Lima, *Mamíferos do Brasil* (pp. 153-230). Londrina.

- Perini, F. A., Tavares, V. C., & Nascimento, C. M. (2003). Bats from the city of Belo Horizonte. *Chiroptera Neotropical*(9), 169-172.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- Rambaut, A.; Drummond, A. J. (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reis, N. R. (2011). Ordem Chiroptera. In N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro, & I. P. Lima (Eds.), *Mamíferos do Brasil* (2ª ed., pp. 155-234). Londrina: Edição do Autor.
- Reis, N. R., Barbieri, M. L., Lima, I. P., & Peracchi, A. L. (2003). O que é melhor para manter a riqueza de espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera): um fragmento florestal grande ou vários de pequeno tamanho? *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(2), 225-230.
- Reis, N. R., Barbieri, M. L., Lima, I. P., & Peracchi, A. L. (2003). O que é melhor para manter a riqueza de espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera): um fragmento florestal grande ou vários fragmentos de pequeno tamanho? *Rev. Bras. Zool.*, 20(2), 225-230.
- Reis, N. R., Peracchi, A. L., Lima, I. P., & Pedro, W. A. (2006). Riqueza de espécies de morcego (Mammalia, Chiroptera) em dois diferentes habitats, na região centro-sul do Paraná, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23(3), 813-816.
- Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., & Lima, I. P. (2007). *Morcegos do Brasil*. (N. R. Reis, Ed.) Londrina.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. London: CSHL Press.
- Santos, F. R., Guimarães, P. E., & Redondo, R. A. (2002). Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. *Lundiana: International Journal of Biodiversity*, 3(2), 93-98.
- Sazima, M. (2009). Espécies de plantas utilizadas por morcegos antófilos em uma área de Mata Atlântica do sul do Brasil. *Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia*, (pp. 1-4). São Lourenço, MG.
- Sazima, M., Buzato, S., & Sazima, I. (1999). Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest Sites in Brazil. *Annals of Botany*(83), 705-712.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature*, 5, 63-69.
- Sears, K. E., Behringer, R. R., Rasweiler IV, J. J., & A., N. L. (2006). Development of bat flight: Morphologic and molecular evolution of bat wing digits. *PNAS*(103), pp. 6581-6586.

- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. In: (Ed.) D. E. Wilson, & D. M. Reeder, *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (3rd ed. ed., pp. 312-529). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Simmons, N. B., & Conway, T. (2003). Evolution of ecological diversity in bats. In T. Kunz, & M. B. Fenton, *Bat Ecology* (pp. 493-535). Londo: University of Chicago Press.
- Simpson, B. B. (1979). Quaternary of the high montane regions of South America. In: Duellman, W. E. (Ed.), *The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal. Museum of Natural History. University of Kansas Monograph, 7:157-188*
- Smith, M. F., & Patton, J. L. (1999). Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution, 6*, 89-128.
- Springer, M. S., Teeling, E., & Stanhope, M. (2001). External Nasal Cartilages in Bats: Evidence for microchiropteran monophyly? *Journal of Mammalian Evolution, 8*(3), 231-236.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, Submitted.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- 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, 580-584*.
- Teeling, E. M., Scally, M., Kao, D. J., Romagnoli, M. L., Springer, M. S., & Stanhope, M. J. (2000). Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature (403)*, 188-191.
- Webster, W. (1983). Systematics and Evolution of Bats of the Genus Glossophaga. Texas Tech University Press.
- Wendt, T., Canela, M. B., Faria, A. P., & Rios, R. I. (2001). Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of Pitcairnia (Bomeliaceae). *American Journal of Botany, 88*(10), 1760-1767.
- Wetterer, A. L., Rockman, M. V., & Simmons, N. B. (2000). Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History*(248), 1-200.

Wille, A. (1954). Muscular adaptation of the nectar-feeding bats (subfamily: Glossophaginae).  
Trans. Kansas Acad. Sci., (57), 315-325.

Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowsky, K. M.,  
et al. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics.  
*Biological Journal of Linnean Society*(26), 375-400.

## Anexos

**Anexo 1** – Lista de amostras de *G. soricina*, cujas sequências do gene Cyt-b foram empregadas neste trabalho . (\*) indica amostras sequenciadas no LBEM

<b>Acesso GeneBank</b>	<b>código (catálogo)</b>	<b>Localidade</b>
AF382831	TK15154	Venezuela/ Garico/ Calabozo
AF382831	TK15194	Venezuela/ Garico/ Calabozo
AF382832	TK25071	Trinidad e Tobago/ Nariva/ Ecclesville
AF382833	TK25212	Trinidad e Tobago/ Mayaro/ Guayaguayare
AF382834	MVZ185874	SãoPaulo
AF382835	MVZ185583	Paraiba
AF382836	MVZ185566	RiodeJaneiro
AF382837	MVZ185585	Paraiba
AF382838	MVZ185575	SãoPaulo
AF382839	TK14605	Bolivia/ LaPaz/ PuertoLinares
AF382840	TK14610	Bolivia/ LaPaz/ PuertoLinares
AF382842	TK17544	Suriname/ Marowijne/ Albina
AF382843	TK86578	Guiana/ NW District/ Baramita
AF382844	TK86579	Guiana/ NW District/ Baramita
AF382845	TK57056	Paraguai/ Canindeyu/ Mbaracayu
AF382846	TK22602	Peru/ Huanuco/ LeonciaPrADO
AF382847	TK22631	Peru/ Huanuco/ LeonciaPrADO
AF382848	TK56869	Paraguai/ Canindeyu/ Mbaracayu
AF382849.1	FMNH128675	Peru/ Amazonas/ Cachapoyas
AF382850.1	FMNH128676	Peru/ Amazonas/ Cachapoyas
AF382851	FMNH128713	Peru/ Cajamarca/ SantaCruz
AF382852	FMNH128718	Peru/ Cajamarca/ SantaCruz
AF382853	TK9251	Jamaica/ St Catherine Parish
AF382854	TK11040	Jamaica/ Discovery Bay
AF382855	USNM578997	Panamá/ BocasdelToro/ EscudoVeraguas
AF382856	USNM579009	Panamá/ BocasdelToro/ EscudoVeraguas
AF382857	USNM579010	Panamá/ BocasdelToro/ EscudoVeraguas
AF382858	TK13594	México/ Yucatan
AF382859	TK34707	El salvADor/ santaana
AF382860	TK4728	México/ Sinaloa/ Rosario
AF382861	TK13173	México/ Veracruz/ Cordoba
AF382862	TK14159	México/ SanLuisPotossi/ Valles
AF382863	TK43178	México/ Michoacan/ Aquila
AF382864	TK43189	México/ Michoacan/ Aquila
AF382865	TK43138	México/ Michoacan/ Aquila

AF382866	TK43208	México/ Michoacan/ Aquila
AF382867	TK41573	Guatemala/ Zocalpal
AF423081	AMNH267950	GuianaFrancesaParacou
FJ392505	TK134672	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392506	TK134721	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392506	TK134722	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392507	TK134740	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392509	TK134742	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392510	TK134743	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392511	TK134744	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392512	TK134745	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392513	TK134746	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392514	TK134747	Equador/ Guayas/ Manglares
FJ392515	TK134501	Equador/ Guayas/ Manglares
*	AD05	Paraiba/ Soledade
*	AD18	Paraiba/ Soledade
*	AD27	Paraiba/ Soledade
*	AD31	Paraíba/ Campina Grande
*	AD33	Paraiba/ CampinaGrande
*	BREJ04	Minas Gerais/ Brasilândia de Minas
*	BREJ06	Minas Gerais/ Brasilândia de Minas
*	HF04	Minas Gerais/ Belo Horizonte
*	HF07	Minas Gerais/ Belo Horizonte
*	MF07	Minas Gerais
*	MF10	Minas Gerais/ Furnas
*	MOL171	Tocantins
*	MON06	Espírito Santo/ Guarapari
*	MON15	Espírito Santo/ Guarapari
*	PIP07	Minas Gerais/ Três Maria
*	QUE03	Minas Gerais/ Unai
*	QUE07	Minas Gerais/ Unai
*	ROM104221	Panamá
*	ROM107852	Venezuela/ Amazonas
*	ROM108326	Venezuela/ Amazonas
*	ROM108914	Guiana/ Potaro/ Siparuni
*	ROM112170	Panamá
*	ROM113887	Suriname/ Brocopondo
*	ROM96200	México/ Campeche
*	ROM99238	Guatemala/ ElPetén

---

**Anexo 2** – Lista de amostras de *G. soricina*, cujas sequências do gene COI foram empregadas neste trabalho . (\*) indica amostras sequenciadas no LBEM

<b>Acesso GeneBank</b>	<b>código (catálogo)</b>	<b>LocalidADe</b>
HQ545448	ROMMAM120242	Suriname/ Sipaliwini
HQ545618	ROMMAM120156	Suriname/ Sipaliwini
HQ545619	ROMMAM120157	Suriname/ Sipaliwini
HQ545648	ROMMAM120192	Suriname/ Sipaliwini
HQ919757	ROMMAM120407	Suriname/ Sipaliwini
JF435356	ROM117086	Suriname/ Nikerie
JF435358	ROMF38055	Panamá
JF435359	ROM99212	Guatemala/ Peten
JF435360	ROM99213	Guatemala/ Peten
JF435361	ROM99214	Guatemala/ Peten
JF435362	ROM99215	Guatemala/ Peten
JF435363	ROM99216	Guatemala/ Peten
JF435364	ROM99217	Guatemala/ Peten
JF435368	ROM99464	Guatemala/ Peten
JF435369	ROM99470	Guatemala/ Peten
JF435370	ROM99472	Guatemala/ Peten
JF435371	ROM99473	Guatemala/ Peten
JF435372	ROM99290	Guatemala/ Peten
JF435373	ROM99582	Guatemala/ Peten
JF435374	ROM106365	Equador/ Napo
JF435374	ROMFn31468	Guatemala/ el progreso
JF435379	ROM96207	Mexico/ Campeche
JF435380	ROM96208	Mexico/ Campeche
JF435381	ROM96209	Mexico/ Campeche
JF435382	ROM96210	Mexico/ Campeche
JF435383	ROM97415	Mexico/ QuintanaRoo
JF435384	ROM97446	Mexico/ QuintanaRoo
JF435385	ROM97447	Mexico/ QuintanaRoo
JF435386	ROM97681	Mexico/ Chiapas
JF435388	ROM116639	Guiana
JF435389	ROM116691	Guiana
JF435444	ROM108095	Guiana
JF435445	ROM97822	Guiana
JF435446	ROM97839	Guiana
JF435448	ROM97867	Guiana
JF435449	ROM97917	Guiana
JF435450	ROM97918	Guiana

JF435451	ROM98129	Guiana/ Demerara
JF435452	ROM98130	Guiana/ Demerara
JF435453	ROM 98154	Guiana/ Demerara
JF435454	ROM98155	Guiana/ Demerara
JF435455	ROM98698	Guiana/ Barima
JF435456	ROM98758	Guiana/ Barima
JF435457	ROM100178	Guiana/ Demerara
JF435458	ROM100179	Guiana/ Demerara
JF435459	ROM100180	Guiana/ Demerara
JF435460	ROM100181	Guiana/ Demerara
JF435461	ROM100182	Guiana/ Demerara
JF435464	ROM100224	Guiana/ Corentyne
JF435465	ROM100810	Guiana/ Barima
JF435466	ROM100916	Guiana/ Barima
JF435468	ROM99581	Guatemala/ Peten
JF435469	ROM99426	Guatemala/ Peten
JF435470	ROM99580	Guatemala/ Peten
JF435472	ROM96203	Mexico/ Campeche
JF435476	ROM111168	São Paulo
JF435477	ROM113886	Suriname/ Brocopondo
JF435479	ROM114224	Suriname/ Brocopondo
JF435480	ROM107852	Venezuela/ Amazonas
JF435481	ROM107948	Venezuela/ Guarico
JF435482	ROM107909	Venezuela/ Bolivar
JF435484	ROM104038	Equador/ napo
JF435485	ROM97448	Mexico/ QuintanaRoo
JF446794	ROM99613	Guatemala/ Peten
JF446795	ROM99474	Guatemala/ Peten
JF446796	ROM99236	Guatemala/ Peten
JF454677	ROM119335	Guiana
JF454679	ROM119365	Guiana/ Alto Takutu
JF454681	ROM119314	Guiana/ Alto Takutu
JF454682	ROM119364	Guiana
JF454687	ROM119294	Guiana/ Alto Takutu
JF454694	ROM119041	Guiana/ Dadanawa
JF454695	ROM119117	Guiana/ Dadanawa
JF454701	ROM119239	Guiana
JF454702	ROM119100	Guiana/ Dadanawa
JF454703	ROM119099	Guiana/ Dadanawa
JF454704	ROM119098	Guiana/ Dadanawa
*	AD05	Paraiba/ Soledade
*	AD16	Paraiba/ Soledade
*	AD18	Paraiba/ Soledade

*	AD19	Paraíba/ Soledade
*	AD27	Paraíba/ Soledade
*	AD31	Paraíba/ Campina Grande
*	AD33	Paraíba/ Campina Grande
*	AD399	São Paulo/ Cajuru
*	BREJ04	Minas Gerais/Brasilândia de Minas
*	BREJ06	Minas Gerais/Brasilândia de Minas
*	HF04	Minas Gerais/ Belo Horizonte
*	HF07	Minas Gerais/ Belo Horizonte
*	MF07	Minas Gerais
*	MF10	Minas Gerais/ Furnas
*	MON06	Espírito Santo/ Guarapari
*	MON15	Espírito Santo/ Guarapari
*	PIP07	Minas Gerais/ Três Maria
*	QUE03	Minas Gerais/ Unai
*	QUE07	Minas Gerais/ Unai
*	ROM104221	Panamá
*	ROM108914	Guiana
*	ROM113887	Suriname/ Brocopondo
*	ROM99238	Guatemala/ Peten

---