



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS - CCHN
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOÃO FELIPE MOREIRA DE SOUZA

**Filogeografia de *Myotis nigricans* (Chiroptera:
Vespertilionidae) na Mata Atlântica**

Vitória, ES

2015

JOÃO FELIPE MOREIRA DE SOUZA

**Filogeografia de *Myotis nigricans* (Chiroptera:
Vespertilionidae) na Mata Atlântica**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Sarah Maria Vargas

Coorientadora: MSc. Bruna da Silva Fonseca

Vitória, ES

2015

JOÃO FELIPE MOREIRA DE SOUZA

**Filogeografia de *Myotis nigricans* (Chiroptera:
Vespertilionidae) na Mata Atlântica**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Sarah Mariva Vargas
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Albert David Ditchfield
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr^ª. Ana Carolina Loss
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas devem aqui serem lembradas, sejam aquelas cujo apoio foi psicológico, físico, com estudos ou matérias, alguns da família, outros amigos e até mesmo vários colegas de faculdade, tentarei lembrar de todos e daqueles que não lembrar saibam que sua importância foi de grande valia seja ela qual tenha sido, são eles:

Primeiramente à minha mãe por tudo que ela fez por mim, por ter me dado forças durante meus momentos mais difíceis, por nunca ter deixado de me apoiar e incentivar a realizar meus sonhos. Infelizmente durante meu último de faculdade foi diagnosticada com câncer e veio a falecer três meses atrás, após ter passado por outros 4 meses de UTI. Tenho certeza que onde quer que ela esteja neste momento ela estará orgulhosa e feliz por este momento.

À minha vó, Emilia Gomes, que por 15 anos morou comigo, cuidou de mim, assim como muitos dizem foi minha mãe duas vezes. E agora, depois de anos morando longe dela, ela me acolheu novamente, e tem me dado força e sido compreensiva por todos os momentos que tenho passado.

À Amanda Kirmse, minha namorada, companheira, amiga, confidente, conselheira, um relacionamento de já quase 6 anos, que ainda irá dura muitos mais. Sem sua ajuda não teria conquistado muitas coisas, e serei grato a suas ajudas desde o ensino fundamental, com trabalhos, provas, e posteriormente na faculdade por incentivar a não deixar de estudar e dar o meu melhor em todos os momentos.

À Dr^a Sarah Maria Vargas, que aceitou minha orientação mesmo sabendo depois de saber das dificuldades pelo fato da distância entre Brasil-Austrália, já que ela estaria durante a maior parte do tempo de licença para realização de seu pós-doutorado, mas mesmo assim foi a melhor orientadora possível, sempre solicita e disposta a ajudar, a dar aconselhar. Espero que esta relação orientado-orientador continue assim futuramente no Mestrado e que renda muitas publicações e ensinamentos para ambos.

À Bruna Fonseca, que foi minha coorientadora, professora, mestre e companheira durante um ano e meio, saiba que todos os seus ensinamentos, e puxões de orelha servirão, serão lembrados para sempre, e sempre que precisar de ajuda, seja ela qual for, terá minha ajuda à disposição.

Ao Dr^o Albert David Ditchfield, por ter aceitado compor minha banca de apresentação deste trabalho, além de ter me possibilitado a tentativa de concorrer a bolsa de iniciação científica, por ter permitido o uso das amostras do LABEQ, e por ter sido um exemplo como professor durante o período de minha graduação.

À Dr^a Ana Carolina Loss, também por ter aceitado compor minha banca, e mesmo que conhecendo pouco pessoalmente sempre se ouve sobre suas contribuições de diversas formas à UFES e ao NGACB, e sou muito grato, pois de forma indireta ela contribui para meus aprendizados durante a graduação.

Aos professores da UFES, que foram de extrema importância para minha formação, e em especial para alguns professores que são excelentes profissionais, cujo empenho e dedicação ao trabalho inspiram-nos a segui-los como exemplo no futuro, alguns nomes se destacaram dentre estes, Tânia Mara, Yuri Leite, Albert Ditchfield,

Marcelo Tavares, Celso Oliveira, Andressa Gatti, Robson dos Santos, Silvia Freitas, entre outros.

Ao NGACB, Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade, por ter fornecido o espaço físico e materiais para realização de meu trabalho.

À Juliana Justino, técnica do NGACB, por sempre se dedicar a este, e estar disposta a ajudar os membros e alunos do mesmo.

À toda turma de Ciências Biológicas 2012/1, vocês foram a melhor turma que eu poderia fazer parte, uma turma dedicada, empenhada, que sempre respondeu da melhor forma às expectativas dos professores, passamos na maioria das matérias, e tenho certeza que se alguns se atrasaram por algum motivo não foi por deixarem de serem bons alunos, e também tenho certeza que futuramente todos nós seremos ótimos profissionais, seja os professores ou pesquisadores. Desde já Parabéns, futuros biólogos.

Dentre os alunos da turma Bio 2012/ alguns nomes se destacaram por terem estado mais próximos a mim, Júlia, Manu, Matheus, Diego, Guilherme, Fabiano, muitos trabalhos foram feitos, provas estudadas juntos, matérias passadas no sufoco, reclamações sobre professores, e tudo isto tornou vocês importantes durante a minha formação, e agradeço a todos vocês por tudo. E esta amizade e companheirismo será mantida e lembrada para sempre.

À toda minha família, por estarem presentes e terem ajudado nos momentos mais difíceis. Em especial, aos meus tios que sempre foram quase como meus pais e terem sido exemplos de pessoas de caráter a serem seguidos.

Em especial, à minha tia Marlene, minha segunda mãe, que abria suas portas para passar as férias de fim de ano quase todos os anos, por ter sido sempre companheira, amiga, conselheira, e tudo mais. Nunca esquecerei de tudo o que fez por mim, por minha mãe e meu irmão.

Ao meu tio Tião, que depois de um dos momentos mais difíceis da minha vida esteve ao meu lado, me ajudou a resolver meus problemas, sempre disposto a ajudar e nunca me deixando desamparado.

À todos os meus primos e primas, alguns quase que meus irmãos, Bruna, Jéssica, Vanessa, Karine, Eveline, Thais, Natália, André, Amanda, e outros.

Ao meu primo Murilo, por ter me dado diversas ajudas durante o período que moramos juntos, por também sempre estar disposto a ajudar, e por ser um exemplo de pessoa, e agora de profissional. Saiba que sempre te terei como um exemplo para minha vida.

À outros amigos que passaram e se foram, outros que voltaram, alguns distantes e outros próximos que mesmo pouco, mas ajudaram de alguma forma durante meu trajeto de vida.

Todos vocês citados são pessoas especiais em minha vida, e sempre serão lembrados por mim.

Dedicado à minha querida mãe.

Para Sempre

Por que Deus permite
que as mães vão-se embora?
Mãe não tem limite,
é tempo sem hora,
luz que não apaga
quando sopra o vento
e chuva desaba,
veludo escondido
na pele enrugada,
água pura, ar puro,
puro pensamento.
Morrer acontece
com o que é breve e passa
sem deixar vestígio.
Mãe, na sua graça,
é eternidade.
Por que Deus se lembra
- mistério profundo -
de tirá-la um dia?
Fosse eu Rei do Mundo,
baixava uma lei:
Mãe não morre nunca,
mãe ficará sempre
junto de seu filho
e ele, velho embora,
será pequenino
feito grão de milho.

- Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

Resumo	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	10
1.Introdução	11
1.1. A Filogeografia	11
1.2. Mata Atlântica	12
1.3. Grupo de estudo	13
2. Metodologia	16
2.1. Amostras	16
2.2. Obtenção dos dados moleculares	17
2.2.1. Extração do DNA	17
2.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	17
2.2.3. Sequenciamento	18
2.3. Análise dos dados	18
2.3.1. Análise de similaridade das sequências e de genética de população.....	18
2.3.2. Análises filogenéticas	18
3. Resultados	20
3.1. Análise de similaridade e populacionais	20
3.2. Análises filogenéticas	20
4. Discussão	24
4.1. Divisão da Mata Atlântica Norte e Sul	24
4.2. Similaridade entre amostras <i>M. nigricans</i> e <i>M. Oxyotus</i>	25
4.3. Divisão na Mata Atlântica Sul	27
4.4. Separação do grupo <i>Myotis sp2</i>	28
4.5. Categorias filogeográficas	29
5. Conclusão	31
6. Referências	32
Apêndices	37

RESUMO

A Filogeografia tem como objetivo integrar a Filogenética e a Genética de Populações para compreender como os eventos históricos atuaram na atual formação da distribuição geográfica de populações, espécies e de genes. Apesar do relevante aumento de estudos filogeográficos com espécies tropicais e neotropicais nos últimos anos, o número ainda permanece bem menor em comparação com o hemisfério norte. Os poucos estudos na região neotropical não refletem a sua importância, dos 25 “hotspots”, áreas de grande necessidade de conservação, cinco se encontram na América do Sul, sendo uma destas a Mata Atlântica. Na América do Sul dois principais padrões de distribuição geográfica foram encontrados para diferentes grupos zoológicos, sendo um deles encontrado na Mata Atlântica brasileira, havendo possivelmente uma divisão entre Norte e Sul. Um importante grupo zoológico para os estudos filogeográficos são os morcegos, dado a sua capacidade de dispersão de longa distância através do voo. A espécie *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) possui distribuição ampla na América do Sul, possuindo registros de ocorrência em quase todo o território brasileiro. Questionamentos sobre a real identidade de *M. nigricans* já foram levantados, e espécies já foram descritas a partir deste complexo de espécies, mas alguns autores acreditam que novas espécies ainda possam ser descritas a partir deste complexo. Diante do cenário descrito, este estudo teve o intuito de entender as relações filogenéticas e auxiliar na resolução da identidade de *Myotis nigricans* encontrados na região da Mata Atlântica. As análises filogenéticas, a princípio, revelaram resultados concordantes com o que era previsto demonstrando clados distintos entre as regiões da Mata Atlântica Norte e Mata Atlântica Sul. A região da Mata Atlântica Sul obteve resultados peculiares, pois indivíduos desta região foram separados em três diferentes grupos, sendo estes os grupos *Myotis* sp. Sul 1, *Myotis* sp. Sul 2 e *Myotis* sp.2. A divisão entre os grupos *Myotis* sp. Sul 1 e Sul 2 foi resgatada por duas das três análises filogenéticas, além de possuírem valores de distância genética de 4% entre os grupos. Diferentemente da divisão entre os grupos *Myotis* sp. Sul 1 e *Myotis* sp. Sul 2, a separação do grupo *Myotis* sp.2 é mais distinta e marcada, com valores de distância genética variando de 7,2 a 8% e tendo sido resgatada por todas as análises filogenéticas. A partir deste estudo foi possível observar que a espécie *Myotis nigricans* ainda possui complicações quanto à sua real identidade e, provavelmente, possa corresponder a um complexo de espécies. Além disso, novos estudos com maior amostragem e, principalmente, adicionando dados das espécies mais próximas à *M. nigricans* podem ajudar a compreender as relações filogenéticas dentro do grupo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Myotis nigricans* a partir dos pontos de localidades marginais de identificação de espécimes (GARDNER *et al.*, 2008) 14
- Figura 2.** Mapa indicando os pontos amostrais dos espécimes de *Myotis nigricans* utilizados nesse trabalho ao longo da costa brasileira16
- Figura 3.** Dois mapas sobrepostos demonstram a distribuição de *Myotis oxyotus* sendo distante da região de Mata Atlântica brasileira (Modificado de GARDNER *et al.*, 2008 e RBMA, 2015). Mapa 1. Mapa da distribuição da espécie *Myotis oxyotus* (em cinza) a partir dos pontos de localidades marginais de identificação de espécimes (GARDNER *et al.*, 2008). Mapa 2. Mapa do bioma Mata Atlântica no território brasileiro com diferença entre área do Domínio Mata Atlântica e remanescentes atuais (RBMA, 2015)..... 21
- Figura 4.** (a) Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayensiana (IB) a partir dos espécimes de *Myotis nigricans* e grupo externo. Os valores nos ramos representam os valores de suporte estatístico de bootstrap, para MV, e probabilidade posterior, para IB, respectivamente. * significa que a probabilidade posterior é menor que 95%. (b) Mapa com a distribuição geográfica das amostras com cores referentes aos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos. (c) Rede de haplótipos22
- Figura 5.** Filogenia do clado do Novo Mundo do gênero *Myotis* (modificado de STADELMANN *et al.*, 2007), com destaque para o clado entre as espécies *M. levis*, *M. nigricans* e *M. oxyotus*25
- Figura 6.** Filogenia do clado das espécies do gênero *Myotis* (modificado de LARSEN *et al.*, 2012), com destaque para o clado entre as espécies *M. levis*, *M. nigricans* e *M. oxyotus* 26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Amostras de *Myotis nigricans* utilizadas no presente estudo.** Tabela com as amostras de sequências de *M. nigricans* utilizadas no presente estudo, divididas por estados do Brasil.....16
- Tabela 2. Concentração dos reagentes e perfil da PCR.** Concentração dos reagentes e perfil das reações de PCR para os fragmentos do gene COI17
- Tabela 3. Distância genética dentro e entre grupos de sequências.** O número de substituições de bases em média por sítio sobre o número de substituições de bases de todas as sequências entre os grupos foi mostrada. As análises foram conduzidas usando o modelo Kimura-2-parâmetros. A análise envolveu 27 sequências de DNA, posições contendo *gaps* ou dados faltando foram eliminadas23
- Tabela 4. Amostras utilizadas no presente estudo.** Tabela detalhada com todas as amostras que tiveram sequências obtidas no presente estudo, incluindo localidade de coleta e resultados de similaridade encontrados com auxílio da ferramenta BLASTApêndices

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Filogeografia

O termo “Filogeografia”, introduzido por Avise *et al.* (1987), tem como objetivo integrar a Filogenética e a Genética de Populações para compreender como os eventos históricos atuaram na atual formação da distribuição geográfica de populações, espécies e de genes (AVISE, 2000, 2009). Estudos filogeográficos utilizam uma grande variedade de técnicas moleculares e métodos analíticos para entender a história das espécies, incluindo estruturação populacional e história demográfica (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Portanto, a filogeografia pode ser definida como o campo de estudos preocupado com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genética, especialmente aquelas dentro e entre espécies próximas (AVISE, 2000).

A análise e interpretação da distribuição de linhagens requerem o processamento conjunto de informações de uma série de disciplinas. Podemos citar como exemplos a sistemática filogenética, a genética de populações, a etologia, a demografia, a paleontologia, a geologia, entre outras. Este caráter multidisciplinar da filogeografia, em particular das áreas do conhecimento envolvidas, faz com que esta disciplina crie uma ponte entre processos micro e macroevolutivos (MARTINS & DOMINGUES, 2011).

A América do Sul é um continente topograficamente complexo que mostra diferentes padrões geomorfológicos, como grandes rios (*e.g.* bacia Amazônica) e diferentes elevações montanhosas (*e.g.* Cordilheira dos Andes), e estas podem ter agido como barreiras filogeográficas para as espécies sul-americanas (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Estudos de análises filogenéticas mostram clados correspondentes a diferentes localidades geográficas e também a diferentes ecodomínios (MARTINS *et al.*, 2007).

Apesar do relevante aumento de estudos filogeográficos com espécies tropicais e neotropicais nos últimos anos, o número ainda permanece bem menor em comparação com o hemisfério norte (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013), mas como determinado por Myers *et al.* (2000) dos 25 “hotspots”, áreas de grande necessidade de conservação, cinco se encontram na América do Sul, sendo uma destas a Mata Atlântica. No Brasil as florestas da Região Nordeste não são idênticas às das Regiões Sudeste e Sul, nem as florestas das planícies costeiras são iguais às montanhas, e a conservação destas deve levar em conta tais diferenças (CÂMARA, 1996).

No Brasil dois principais padrões de distribuição geográfica foram encontrados para diferentes grupos zoológicos. O primeiro é a divisão entre o Leste e Oeste, onde se encontra uma

clara divisão que separa a Mata Atlântica da Amazônia e Pantanal pelo “cinturão seco diagonal”, composto pelo Cerrado com suas formações abertas (BATES *et al.*, 1988; COSTA, 2003; FERREIRA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2007). Enquanto o outro padrão pode ser encontrado na Mata Atlântica brasileira, havendo possivelmente uma divisão entre Norte e Sul (MULLER, 1973, LYNCH, 1979, BATES *et al.*, 1988; DITCHFIELD, 2000, COSTA, 2003, PELLEGRINO *et al.*, 2005, MARTINS, 2011; TONINI *et al.*, 2013). Este segundo padrão possui poucas hipóteses plausíveis e estudadas que explique a divergência entre as populações desta região, sendo que uma dessas hipóteses seria a Hipótese dos Refúgios (HAFFER, 1969).

1.2. Mata Atlântica

A Mata Atlântica brasileira é considerado um dos biomas mais diversos e ameaçados no planeta. Seu nível de endemismo alcança 90% para alguns organismos, sendo que o valor médio global de 50% de endemismo é superado apenas pela Amazônia (COSTA *et al.*, 2000). Ocupando principalmente a borda leste do escudo brasileiro, a Mata Atlântica é uma área de topografia complexa ao longo de distâncias geográficas curtas que foram moldadas pela atividade tectônica no Terciário e mudanças do nível do mar no Quaternário (MARTINS & COUTINHO, 1981; SUGUIO *et al.*, 2005). A característica ecológica principal deste tipo florestal está ligada aos fatores climáticos tropicais de elevadas temperaturas (médias em torno de 25°C) e de alta precipitação, bem distribuída durante o ano (de 0 a 60 dias secos), o que determina uma situação sem período biologicamente seco (IBGE, 1996).

Na Mata Atlântica diferentes clados filogeograficamente distintos foram encontrados com uma provável divisão entre as regiões Norte e Sul, como demonstrado por Martins *et al.* (2007) para seu grupo estudo, *Desmodus rotundus*. Estas divisões também foram demonstradas para outros morcegos como *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium* (DITCHFIELD, 2000), além de outros grupos zoológicos como anfíbios (MULLER, 1973; LYNCH, 1979; TONINI *et al.*, 2013), lagartos (PELLEGRINO *et al.*, 2005), pequenos mamíferos não-voadores (COSTA, 2003) e pássaros (BATES *et al.*, 1988) mostrando que a quebra filogeográfica estaria ocorrendo em uma região entre a Bahia e o Espírito Santo.

Os diferentes grupos haplotípicos encontrados em animais que habitavam o norte e sul da Mata Atlântica podem ser explicados por períodos de isolamento seguidos de subsequentes expansões (DITCHFIELD, 2000). Ditchfield (2000) usando a calibração de relógio molecular de Irwin (1980) para a sequência parcial do gene mitocondrial do citocromo b (Cyt-b), determinou

que estes eventos de vicariância podem ter ocorrido há cerca de um milhão de anos. Para explicar as diferenças haplotípicas encontradas na Floresta Amazônica diversas hipóteses foram propostas, sendo uma delas a Teoria dos Refúgios (HAFFER, 1969). Tal teoria também foi utilizada por Ferreira *et al.* (2014) como uma explicação plausível para seus resultados encontrados na divisão da Mata Atlântica. A Teoria dos Refúgios propõe que as espécies se originaram devido às mudanças climáticas-vegetacionais que levaram à separação das populações de animais e plantas em “refúgios”, e posterior expansão territorial sob as variações de condições climáticas de frio/seco para quente/úmido no Cenozoico (HAFFER, 2008). Entretanto, poucos estudos tentaram propor o que teria ocorrido nesta região da Mata Atlântica que seria capaz de isolar geneticamente as populações de organismos que ali habitavam, mas muito autores utilizam a Hipótese dos Refúgios como uma possibilidade para explicar tais padrões filogeográficos..

1.3. Grupo de Estudo

Dentre os diferentes grupos zoológicos os morcegos possuem um interesse em particular para a biologia evolutiva dado a sua capacidade de dispersão de longa distância através do voo. Os padrões de filogeografia exibidos pelos morcegos podem ser bem diferentes dos de outros pequenos mamíferos que não voam (DITCHFIELD, 2000). No Brasil são conhecidas nove famílias de morcegos, 64 gêneros e 165 espécies (TAVARES *et al.*, 2008).

A família Vespertilionidae é quase cosmopolita em relação a distribuição, sendo encontrada em todos continentes, exceto Antártida (GARDNER *et al.*, 2008), sendo que no Brasil há ocorrência de duas subfamílias, quatro gêneros, e 22 espécies (TAVARES *et al.*, 2008). Dentre estes, o gênero *Myotis* Kaup, 1829 é o gênero mais amplamente distribuído de mamíferos, com exceção do homem e seus comensais (WILSON, 2008), e no Brasil ocorrem seis espécies (TAVARES *et al.*, 2008).

A espécie *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) possui distribuição ampla na América do Sul, desde México até norte da Argentina e sul do Brasil, possuindo registros de ocorrência em quase todo o território brasileiro, com exceção aos estados AC, AL, MA, MT, PI, RN, RO, SE e TO (Figura 1). Sua localidade-tipo é a Fazenda de Aga entre os Rios Itapemirim e Iconha no Espírito Santo, Brasil (PERACCHI *et al.*, 2006). Em áreas menos perturbadas seus abrigos incluem ocos e cascas de árvores, grutas, cavernas, fendas de rocha, entre outros (BIANCONI, 2007), porém suas

habitações já foram registradas em forros de telhados, caixas de persianas, nichos de ar-condicionado ou vãos entre prédios (PACHECO & MARQUES, 2006).

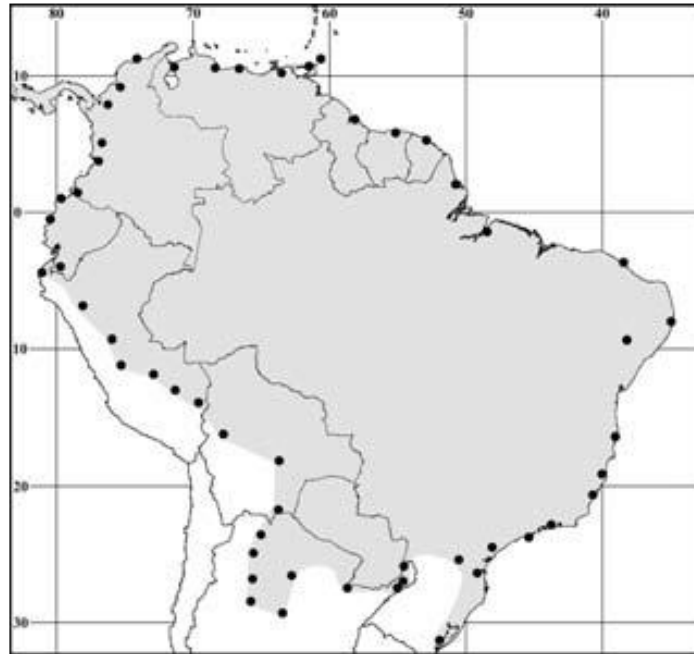


Figura 1. Distribuição geográfica na América do Sul de *Myotis nigricans* a partir dos pontos de localidades marginais de identificação de espécimes (GARDNER *et al.*, 2008).

Os indivíduos da espécie *M. nigricans* forrageiam extensivamente em áreas abertas mostrando comportamentos de ecolocalização bem adaptados a este habitat de forrageamento. Estudos ecológicos mostraram que os indivíduos desta espécie se alimentam de insetos como Lepidópteros (WILSON & LAVAL, 1974), sendo classificados como insetívoros aéreos de florestas e clareiras (LAVAL & FITCH, 1977 *apud* BIANCONI, 2007). Restos de plantas também já foram encontrados no estômago de alguns espécimes (WILSON & LAVAL, 1974) e Novaes *et al.* (2014) registrou pela primeira vez a presença de sementes em fezes de um indivíduo, acreditando-se então que plantas e sementes possam servir como completo alimentar para esta espécie. Além disto, pesquisas realizadas com outras espécies do gênero *Myotis* mostraram que estes animais são capturados com maior frequência em alturas menores que dois metros de altura (LEE & MCCRACKEN, 2004).

Revisões taxonômicas que incluíram as espécies sul-americanas do gênero *Myotis* foram publicadas por Miller e Allen (1928), LaVal (1973) e, mais recentemente, por Wilson (2008). LaVal (1973) em sua revisão das espécies neotropicais do gênero *Myotis* salientou que muitos exemplares dessa região foram mal identificados, usualmente como *Myotis nigricans*. Este problema na identificação dos indivíduos tornou difícil a determinação da real distribuição

geográfica das espécies em questão, além da determinação dos limites entre as espécies. Desse modo, novos trabalhos têm sido realizados a fim de se compreender melhor os limites entre as espécies além das suas respectivas distribuições geográficas. Moratelli *et al.* (2011) após descreverem duas novas espécies sugeriu que *M. nigricans* ainda poderia compreender um complexo de espécies e, em estudo atual (MORATELLI *et al.*, 2013), corroborou sua hipótese descrevendo uma nova espécie, *M. izecksohni*, com ocorrência na região sul da Mata Atlântica, a partir do complexo de espécies *M. nigricans*.

Como sugerido por Moratelli *et al.* (2011) novos estudos sobre essa espécie podem auxiliar na determinação da diversidade genética, assim como na classificação taxonômica, caso esta realmente compreenda um complexo de espécies. Além disso, a ampla distribuição de *M. nigricans* poderá permitir a compreensão dos padrões de distribuição geográfica da região da Mata Atlântica, e dos eventos que poderiam isolar as populações residentes desta região.

Nesse contexto, este estudo teve o objetivo de entender as relações filogenéticas de *Myotis nigricans* encontrados na região da Mata Atlântica, assim como verificar se os padrões filogeográficos previamente encontrados para diversos grupos zoológicos também podem ser encontrados para a espécie em estudo. Este estudo auxiliará na resolução da identidade de *M. nigricans*, ou seja, se esta representa uma única espécie ou se compreende um complexo de espécies crípticas.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras

As amostras utilizadas consistem de tecidos de espécimes previamente identificados como *Myotis nigricans* de diferentes localidades da Mata Atlântica conservados em etanol, obtidas por empréstimos do Laboratório para Estudos de Quirópteros (LABEQ) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Tabela 1) (Figura 2).

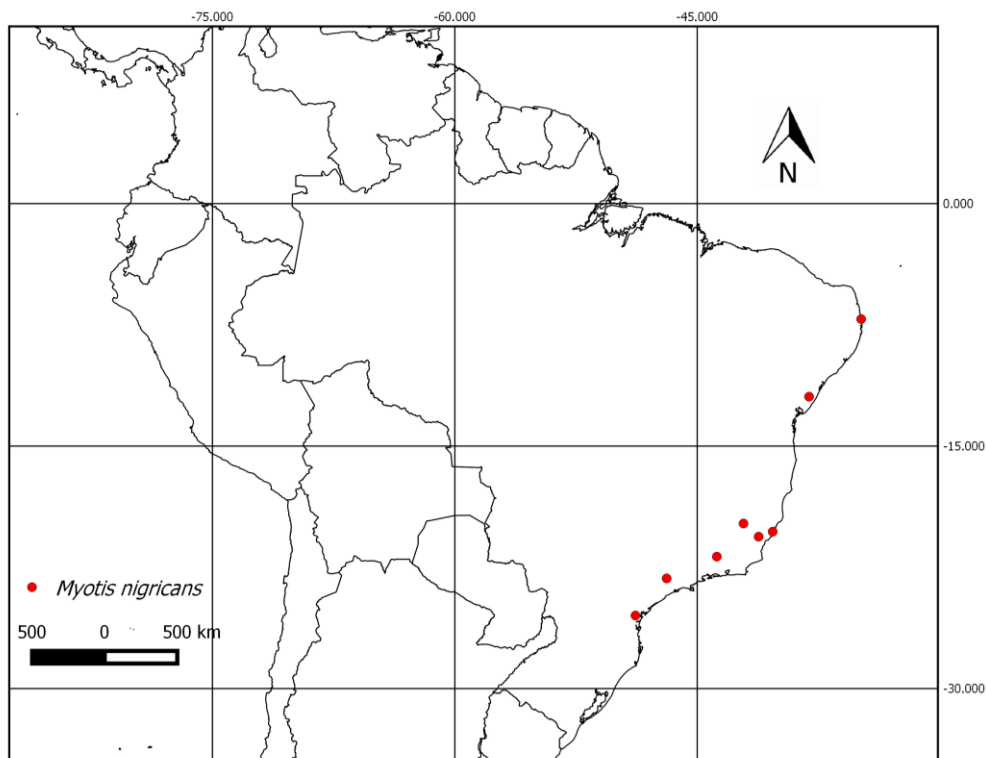


Figura 2. Mapa indicando os pontos amostrais dos espécimes de *Myotis nigricans* utilizados nesse trabalho ao longo da costa brasileira continente sulamericano.

Tabela 1. Amostras de *Myotis nigricans* utilizados no presente estudo.

Tabela com as amostras de sequências de *M. nigricans* utilizadas no presente estudo, divididas por estados do Brasil.

Localidade		Número amostral
País	Estado	
Brasil	Paraíba	5
	Bahia	2
	Espirito Santo	7
	Minas Gerais	4
	São Paulo	3
	Paraná	6
Total		27

2.2. Obtenção dos dados moleculares

2.2.1. Extração do DNA

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo descrito por Bruford *et al.* (1992), e para verificar as condições do DNA obtido estes foram corados com corante Blue Green® (LGC Biotecnologia) e visualizado em gel de agarose 0,8% sob luz ultravioleta.

2.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita para o fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI). O fragmento do gene COI foi amplificado utilizando o par de *primers* LCO 1490 e HCO 2198 (FOLMER *et al.*, 1994). A concentração final dos reagentes e perfil das PCRs para geração dos fragmentos do gene COI estão listados na Tabela 2. O sucesso da reação e verificação do tamanho dos produtos da PCR foram estimados utilizando gel de agarose 1% e marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen, Inc.) e visualizados sob luz UV.

O perfil utilizado para a PCR, consiste de 5 passos. 1- Desnaturação inicial da molécula de DNA, com temperatura de 94°C por 1 minuto. 2- Desnaturação, com temperatura de 94°C por 30 segundos. 3- Anelamento dos primers, com temperatura de 50°C por 40 segundos. 4- Extensão, com temperatura de 72°C por 1 minuto. Os passos 2, 3 e 4 foram repetidos em ciclo por 35 vezes. Após os 35 ciclos, as amostras ficaram por 1 minuto em 72°C, sendo este o passo 5- Extensão Final.

Tabela 2. Concentração dos reagentes.

Reagentes (Mix PCR)	[Final dos reagentes]
Tampão	1x
MgCl ₂	2,5mM
dNTPs	200uM
<i>Primers</i> (LCO e HCO)	0,4uM
Taq Polimerase	0,7u/tubo
Volume Total (adicionado 1uL de DNA)	15uL

Para a purificação dos produtos de PCR foram utilizadas as enzimas do kit Exo-Sap-IT (USB-Corporation) a fim de eliminar potenciais inibidores do sequenciamento, como excesso de *primers*, dNTPs e outras possíveis impurezas.

2.2.3. Sequenciamento

Os sequenciamentos foram realizadas em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) e para todas as amostras foram usados apenas *primers* na direção “forward”, LCO. Todos estes procedimentos foram realizados no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES.

Após a obtenção das sequências foi realizada a tradução da mesma para verificação da presença de códons de parada, a fim de conferir o início das sequências.

2.3. Análise dos dados

2.3.1. Análises de similaridade das sequências e de genética de populações

Para cada sequência gerada foi conduzida uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a fim de se verificar a ocorrência de contaminação e checar se os fragmentos correspondem aos genes de interesse desta pesquisa.

Para dados de genética de populações, foi utilizado o programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) para alinhar as sequências obtidas de cada indivíduo através do algoritmo Clustal W e foram computados o número e frequência de haplótipos, a diversidade haplotípica e nucleotídica no programa DnaSP 5.10 (LIBRADO & ROZAS, 2009). O programa DnaSP 5.10 também foi utilizado para gerar os haplótipos do DNA mitocondrial.

Clare *et al.* (2007), a partir da análise de sequências parciais do gene COI de 840 espécimes de 87 espécies de morcegos, demonstrou que a distância interespecífica varia em média 7,8%, enquanto a distância intraespecífica em média 0,6%. De acordo com estes autores, espécies com duas ou mais linhagens distintas com sequências divergindo em mais de 2,5% devem ser analisadas e podem representar espécies distintas, seguindo observações de Ditchfield (2000) e Bradley & Baker (2001). Desse modo, definiu-se um valor de 3% de distância genética, para dividir diferentes linhagens e grupos a serem analisados mais cautelosamente.

2.3.2. Análises filogenéticas

Para a verificação do grau de saturação das bases nucleotídicas dentro das sequências usou-se o programa DAMBE de Xia & Xie (2001). O melhor modelo evolutivo foi obtido pelo programa jModelTest 2 (DARRIBA *et al.*, 2012).

As análises filogenéticas foram realizadas por meio dos métodos Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), nos programas RaxML (STAMATAKIS, A. 2006) e Mr.Bayes 3.2 (HUELSENBECK *et al.*, 2001; RONQUIST *et al.*, 2012), respectivamente. As árvores foram visualizadas e editadas através do programa FigTree v.1.3.1 (RAUMBAUT, 2007). Os grupos externos utilizados neste trabalho consistem de sequências das espécies *Rhogeessa io*, *Natalus tumidirostris* e *Tadarida brasiliensis* obtidas através do GenBank (números de acesso JF455671, JF455114 e JF446884, respectivamente). O programa Network 4.6.1.3 (<http://www.fluxus-engineering.com>) foi usado para criar a rede de haplótipos, através do algoritmo *Median joining* (BANDELT *et al.*, 1999).

As distâncias genéticas dentro e entre grupos de sequências foram obtidas através do programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013), utilizando *p distance* e o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980; TAMURA *et al.*, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Análises de similaridade e populacionais

Foram obtidas sequências parciais de COI de 618pb de 27 indivíduos, as quais definiram 11 haplótipos com 70 sítios polimórficos, com diversidade haplotípica de 0,9174 e nucleotídica de 0,0404.

Dentre as 27 sequências obtidas neste estudo, apenas 4 delas indicaram maior similaridade com *Myotis nigricans*, espécie a qual as amostras foram associadas por comparações morfológicas, sendo que as outras amostras indicaram maior similaridade com a espécie *Myotis oxyotus* (Apêndice).

A princípio uma hipótese de identificação incorreta dos espécimes em campo não foi descartada, mas a espécie que indica maior similaridade, *M. oxyotus*, não possui ocorrência na região da Mata Atlântica brasileira (Figura 3), sendo restrita à região da Cordilheira dos Andes. Além disso, 5 casos de identificação incorreta das amostras ocorreram, não incluídas neste estudo, nestes casos os tubos com tecidos haviam sido catalogados como pertencentes à indivíduos de *M. nigricans*. Porém, quando sequenciadas e analisadas na ferramenta BLAST, estas amostras eram de indivíduos de *Diphylla ecaudata*, *Vampyroides caccioli* e *Myotis riparius*, o que demonstra que em casos extremos a ferramenta BLAST é útil e eficiente para confirmar se as amostras correspondem às de interesse.

Com isso, assumiu-se a hipótese de que a questão de maior similaridade das amostras com *M. oxyotus* poderia ser por erro de identificação do espécime de *M. oxyotus* cuja sequência está armazenada no GenBank, ou então que *M. oxyotus* e *M. nigricans* podem na verdade se tratar de dois grupos de indivíduos distintos, porém com uma relação filogenética ainda complexa.

A partir disto, dividiu-se as amostras de acordo com seu resultado de similaridade, com o intuito de facilitar a compreensão durante o manuseio dos dados, sendo os indivíduos geneticamente mais próximo à *M. oxyotus* denominados *Myotis* sp. já que não podemos claramente afirmar que realmente pertençam a espécie em questão, e para os demais 4 indivíduos, que tiveram maior similaridade com *M. nigricans*, passou-se a usar a terminologia *Myotis* sp.2.

3.2. Análises filogenéticas

O conjunto de dados não apresentou saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModelTest selecionou os modelos

evolutivos mais apropriados para o conjunto de dados, o mesmo modelo foi definido tanto para a Inferência Bayesiana (IB) quanto para a análise de Máxima Verossimilhança (MV), sendo definido o modelo de sítios finitos de Hasegawa, Kishino e Yano (1985) com $\gamma = 0,1190$.

As topologias das filogenias dos métodos IB e MV foram basicamente congruentes, com exceção à possível divisão de dois grupos que será explicado posteriormente, e a filogenia generalizada está representada na Figura 4. Suportes estatísticos foram considerados altos e quando na IB foram $\geq 95\%$ e na MV $\geq 70\%$. Os grupos foram nomeados de acordo com as linhagens formadas nas filogenias.

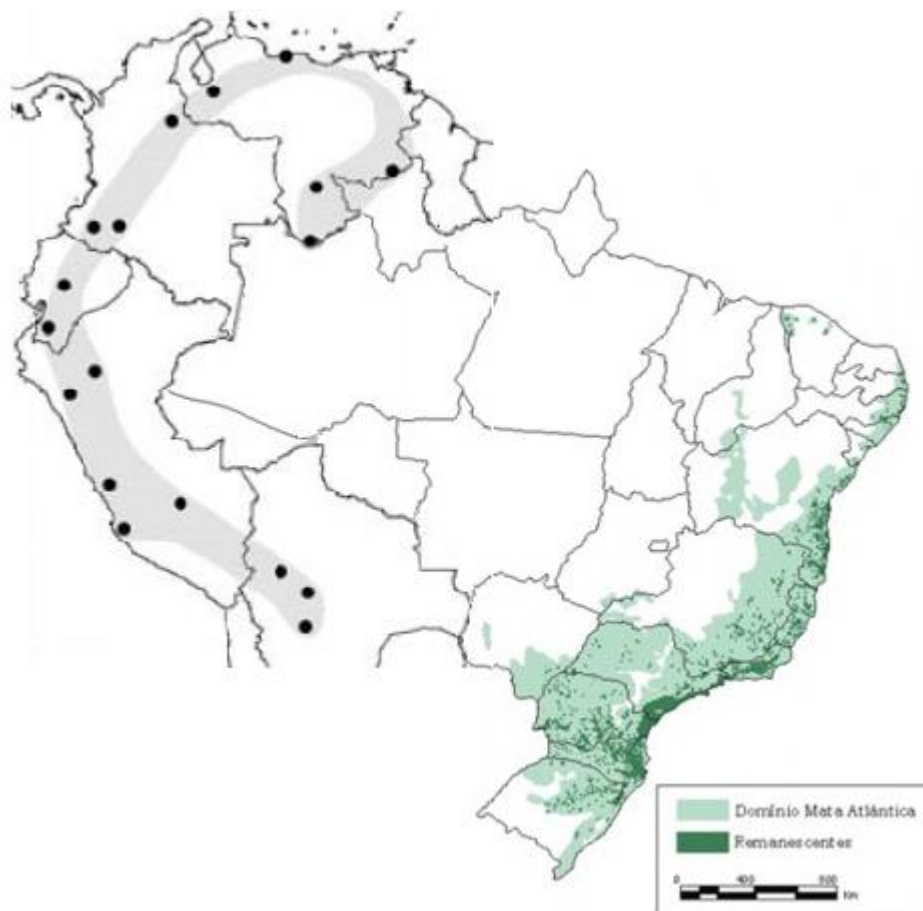


Figura 3. Dois mapas sobrepostos demonstram a distribuição de *Myotis oxyotus* sendo distante da Mata Atlântica (Modificado de GARDNER *et al.*, 2008 e RBMA, 2015). Em cinza, mapa da distribuição da espécie *Myotis oxyotus* a partir dos pontos de localidades marginais de identificação de espécimes (GARDNER *et al.*, 2008). Em verde, mapa do bioma Mata Atlântica no território brasileiro com diferença entre área do Domínio Mata Atlântica e remanescentes atuais (RBMA, 2015).

Primeiramente, dividiu-se o grupo amostral a partir do resultado encontrado pela ferramenta BLAST, e posteriormente, pela sua localidade de coleta. Quanto ao resultado do BLAST, dividiu-se as amostras em dois grupos, *Myotis* sp. (n=23) para a maioria das amostras

cujos resultados mostraram maior similaridade à *M. oxyotus*, e *Myotis sp.2* (n=4) para as outras quatro amostras mais similares à *M. nigricans*.

Quanto à distribuição somente o grupo *Myotis sp* foi dividido em regiões diferentes, sendo um grupo na Mata Atlântica Norte (M.A. Norte) e outro na Sul (M.A. Sul). O grupo *Myotis sp.2* só possui amostras da região da M.A. Sul, portanto não foi dividido por região. Dessa forma foram denominados 3 grupos, *Myotis sp. Norte*, *Myotis sp. Sul*, e *Myotis sp.2*.

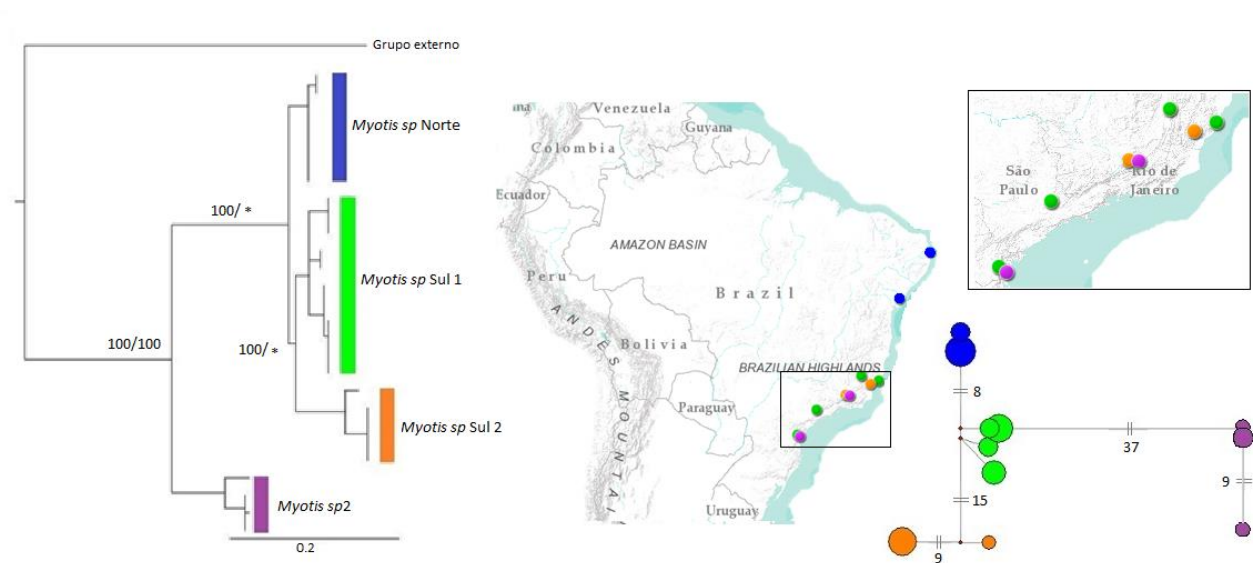


Figura 4. (a) Topologia da reconstrução filogenética de máxima verossimilhança (MV) a partir dos espécimes de *Myotis nigricans* e grupo externo. Os valores nos ramos representam os valores de suporte estatístico de bootstrap, para MV, e probabilidade posterior, para IB, respectivamente. * significa que a probabilidade posterior é menor que 95%. (b) Mapa com a distribuição geográfica das amostras com cores referentes aos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos. (c) Rede de haplótipos. Os grupos com as cores correspondentes na filogenia.

O grupo *Myotis sp.2*, corresponde aos indivíduos que indicaram maior similaridade com a espécie *Myotis nigricans*, o qual teve amostragem nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Além disto, a distância genética entre grupos mostrou que a divergência genética entre *Myotis sp.2* e os demais grupos variou de 7,2 a 8% (Tabela 3), valores que podem ser especulados como espécie diferente e necessita observações como mencionado por Clare *et al.* (2007).

Os indivíduos que se mostraram divergentes, ou seja, maior similaridade com *M. oxyotus* pela ferramenta BLAST, e eram oriundos dos estados da Bahia e Paraíba, região da Mata Atlântica Norte, foram denominados como *Myotis sp. Norte*.

O grupo *Myotis sp. Sul* foi formado por indivíduos que mostraram a mesma característica divergente do grupo anterior, mas coletados nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, São

Paulo e Paraná. Porém, após as análises filogenéticas e de distância genética entre os grupos, este conjunto amostral mostrou-se subdividido em dois grupos (*Myotis* sp. Sul 1 e *Myotis* sp. Sul 2.) Essas amostras, quando analisadas considerando-se um único grupo (n=16), apresentaram distâncias genéticas de 2,4% dentro do grupo (dados não apresentados), e comparadas entre si (separando-se *Myotis* sp. Sul 1 e 2) apresentaram 4,1% de divergência (Tabela 3). Como os dois possíveis grupos ocorrem nos quatro estados amostrados e possuem valores de distância genética acima dos limites definidos para este estudo (3%), separou-se os grupos em *Myotis* sp. Sul 1 e Sul 2, sendo o primeiro com 11 indivíduos, e o segundo com apenas cinco indivíduos

A divisão destes grupos foi corroborada pelas análises filogenéticas (MV), de distância genética e pela rede haplotípica. Porém, a análise filogenética de inferência bayesiana não teve suporte estatístico para recuperar as divisões entre Mata Atlântica Norte e Sul, assim como também para a subdivisão do grupo *Myotis* sp. Sul. Além disso, a rede de haplótipos foi condizente com as filogenias demonstrando os mesmos três grupos, e também a subdivisão do grupo *Myotis* sp Sul (Figura 4b).

Tabela 3. Distância genética dentro e entre grupos de sequências.

O número de substituições de bases em média por sítio sobre o número de substituições de bases de todas as sequências entre os grupos foi calculada. As análises de distância genética entre os grupos foram conduzidas usando os modelos Kimura-2-parâmetros (abaixo da diagonal) e *P distance* (acima da diagonal). Os mesmos modelos foram utilizados para a análise de distância genética dentro dos grupos (diagonal). A análise envolveu 27 sequências nucleotídicas, e todas as posições contendo *gaps* ou dados faltando foram eliminadas. Em negrito, os maiores e menores valores para os dois parâmetros. Sequência de *M. oxyotus* (ID: JN847707.1) disponível no GenBank.

Distância entre grupos	<i>Myotis sp Norte</i>	<i>Myotis sp Sul 1</i>	<i>Myotis sp Sul 2</i>	<i>Myotis sp2</i>	<i>Myotis oxyotus</i>
<i>Myotis sp Norte</i>	0,2%	2,1%	3,9%	6,7%	2,2%
<i>Myotis sp Sul 1</i>	2,2%	1,0%	3,9%	6,9%	1,4%
<i>Myotis sp Sul 2</i>	4,1%	4,1%	0,6%	7,6%	3,5%
<i>Myotis sp2</i>	7,2%	7,4%	8,2%	0,9%	6,4%
<i>Myotis oxyotus</i>	2,2%	1,5%	3,6%	6,9%	-

4. DISCUSSÃO

As análises filogenéticas, a princípio, revelaram resultados concordantes com o que era previsto, provendo dados importantes para auxiliar a responder alguns questionamentos acerca da identidade da espécie em estudo. Com isso, a discussão dos resultados será feita em partes para facilitar o entendimento.

4.1. Divisão da Mata Atlântica Norte e Sul

As análises filogenéticas de máxima verossimilhança, de distância genética e rede haplotípica foram congruentes, demonstrando os clados distintos entre as regiões da Mata Atlântica Norte e Mata Atlântica Sul. Esta divisão ocorre entre a região norte do estado do Espírito Santo e sul do estado da Bahia. Esta divisão entre as regiões da Mata Atlântica foi descrita e corroborada por diferentes autores (BATES *et al.*, 1988; DITCHFIELD, 2000; COSTA, 2003; LYNCH, 1979; MARTINS *et al.*, 2007; MARTINS, 2011; MULLER, 1973; PAVAN *et al.*, 2011; PELLEGRINO *et al.*, 2005). Porém, poucas hipóteses foram propostas para a explicação de tal evento de divergência, entretanto, diversos autores utilizam-se da Hipótese dos Refúgios originalmente proposta por Haffer (1969) para explicar eventos de especiação em pássaros na região da Amazônia.

Esta hipótese sugere que flutuações climáticas durante o Pleistoceno poderiam causar a fragmentação de formações florestais intermediadas por formações de áreas abertas e secas, como savanas. Esses fragmentos restantes de florestas ficariam isolados, formando “refúgios”, e nestes locais as populações de plantas e animais estariam isoladas até um futuro contato secundário durante uma nova fase de expansão, em momentos com condições favoráveis (HAFFER, 2008).

Segundo este mesmo autor, se durante este período de separação as populações alcançarem isolamentos sexuais e/ou ecológicos das populações dos fragmentos vizinhos, estas poderiam posteriormente dispersar-se amplamente no atual contínuo hábitat, antes que períodos de fases climáticas adversas fragmentasse novamente essa extensão abrangente. Durante estes períodos de contração e expansão do hábitat, e com os diversos contatos secundários, estas espécies poderiam sofrer processos de especiação ou formarem populações com diferenças genéticas intraespecíficas marcantes.

Carnaval & Moritz (2008) geraram simulações climáticas e cruzaram seus resultados com estudos de filogeografia e paleopalinoecologia. A partir disto, um cenário foi descrito onde a MA teria suportado uma floresta tropical em sua área central (entre o Rio São Francisco/PE e o Rio

Doce/ES) mesmo durante as condições mais secas do Quaternário. O modelo de Carnaval-Moritz (C-M) também prevê que, no litoral ao sul do Rio Doce, as condições climáticas não dariam suporte a formação de um grande e contínuo fragmento florestal. Foi sugerido então que, em sua distribuição ao sul, a Mata Atlântica provavelmente foi dividida em diferentes fragmentos menores, corroborando que a Hipótese dos Refúgios pode ser aplicada como uma explicação plausível para os eventos de isolamento na região da Mata Atlântica.

Além de explicar a divisão encontrada entre a região da Mata Atlântica em Norte e Sul, estes eventos de flutuações climáticas são hipóteses plausíveis para explicar outras possíveis divisões encontradas nos resultados deste estudo.

4.2. Similaridade entre amostras de *M. nigricans* e *M. oxyotus*

Stadelmann *et al.* (2007) utilizando-se de dois marcadores moleculares, *cytochrome b* (Cyt b) e *recombination activating gene 2* (Rag2), demonstraram que as espécies filogeneticamente mais próximas de *M. nigricans* seriam seu táxon irmão, *M. levis*, e a espécie *M. oxyotus*, que junto com as outras duas formam um clado monofilético (Figura 5).

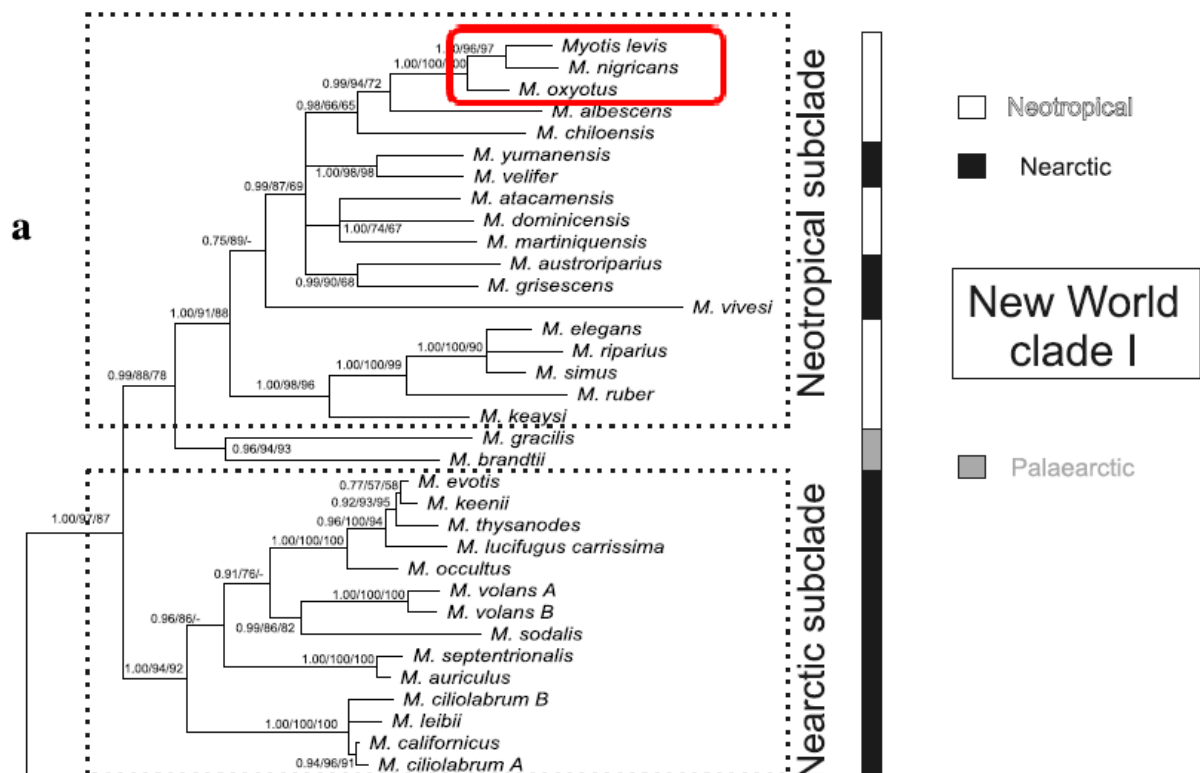


Figura 5. Filogenia do clado das espécies do gênero *Myotis* com ocorrência no Novo Mundo (modificado de Stadelmann *et al.*, 2007), com destaque para o clado formado pelas espécies *M. levis*, *M. nigricans* e *M. oxyotus*.

Larsen *et al.* (2012) a partir do marcador molecular Cyt b, encontrou relações filogenéticas também próximas entre *M. nigricans*, *M. oxyotus* e *M. levis* (Figura 6), mas com relações diferentes entre essas 3 espécies, apresentando *M. levis* como grupo irmão de *M. oxyotus* e não de *M. nigricans*, como encontrado por Stadelmann *et al.* (2007).

Juntamente com isso, estudos demonstram que em alguns casos, populações da Mata Atlântica Norte possuem maior similaridade com populações da Amazônia do que com populações da Mata Atlântica Sul, como demonstrado por Costa (2003) para os gêneros *Rhipidomys* e *Micoureus*. Tal relação não deveria ocorrer se considerássemos a Mata Atlântica como um bioma contínuo. Além disto, a Mata Atlântica ainda é considerada isolada da Amazônia por dois biomas com características secas e quentes, o Cerrado e a Caatinga, que agiriam como barreiras geográficas para grande parte das espécies dos biomas de florestas densas (COSTA, 2003).

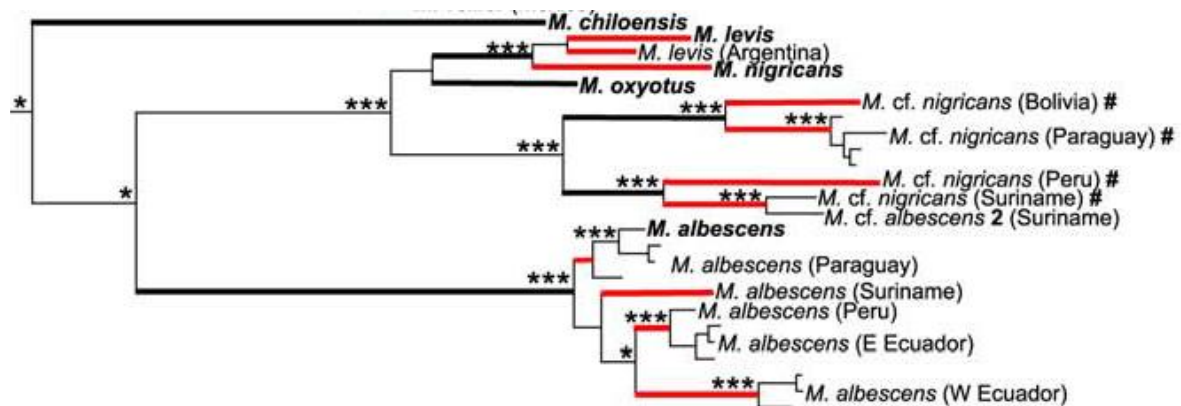


Figura 6. Filogenia das espécies do gênero *Myotis* (modificado de Larsen *et al.*, 2012), com destaque para o clado formado pelas espécies *M. levis*, *M. nigricans* e *M. oxyotus*.

Porém, os eventos explicados pela Hipótese dos Refúgios Pleistocênicos preveem que durante os períodos de condições favoráveis pontes entre os refúgios amazônicos poderiam ser formadas. Dessa forma, poderíamos prever que essas mesmas pontes poderiam ocorrer em uma escala maior, criando uma conexão entre as regiões da Mata Atlântica e da Amazônia, assim como fora demonstrado por Costa (2003) estudando pequenos mamíferos não voadores.

A partir disto, podemos especular que populações da espécie ancestral de *M. nigricans* e *M. oxyotus* possam ter sofrido isolamento geográfico e contato secundário após alcançarem isolamento reprodutivo e/ou ecológico, caracterizando um processo de especiação, porém mantiveram uma baixa divergência genética. Assim, pode ter sido estabelecida uma complexa relação entre estas duas espécies, e tal explicação pode ser corroborada se levarmos em conta que

tal clado é uma das divisões mais recentes do gênero *Myotis*, como demonstrado por Stadelmann *et al.* (2007) (Figura 5).

Tal resultado pode ser melhor entendido com novos estudos com maior amostragem de *M. oxyotus* e a adição de amostras de *M. levis*, e principalmente pelo reforço dessas informações a partir de outros marcadores moleculares e a reavaliação de dados morfológicos.

Entretanto, uma hipótese de incorreta identificação do espécime de *M. oxyotus* também não deve ser descartada. Infelizmente, como apenas uma única sequência está disponível nos bancos de dados moleculares pouco se pode realizar para reforçar essa identificação. Caso diversas sequências estivessem disponíveis, poderia-se compreender melhor essa atual relação entre as espécies irmãs de *M. nigricans*.

4.3. Divisão na Mata Atlântica Sul

A região da Mata Atlântica Sul obteve resultados peculiares, pois indivíduos desta região foram separados em três diferentes grupos com distâncias até maiores que oito por cento entre eles (Tabela 3), sendo estes os grupos *Myotis* sp.2, *Myotis* sp. Sul 1 e *Myotis* sp. Sul 2.

Entre os grupos *Myotis* sp. Sul 1 e *Myotis* sp. Sul 2 os valores de distância genética estão acima do estipulado neste estudo – aproximadamente 4%. As análises de distâncias genéticas realizadas para estas amostras foram previamente realizadas como um único grupo, mas os valores de distância dentro do grupo eram altos (2,4%) quando comparados com a literatura, como Clare *et al.* (2007) que mostrou que a distância dentro de grupos de quirópteros são em média 0,60%. Além disso, análise filogenética de máxima verossimilhança e a rede de haplótipos resgataram esta divisão do grupo, embora a inferência bayesiana não.

Uma hipótese proposta para a separação destes grupos seria a de que são subpopulações que podem estar sofrendo algum impedimento de fluxo gênico e isso poderia explicar a divergência genética com valores altos mesmo em zonas de simpatria na região dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. O impedimento do fluxo gênico poderia resultar em especiação, caso este esteja e continue sendo interrompido.

Diferentemente da divisão entre os grupos *Myotis* sp. Sul 1 e *Myotis* sp. Sul 2, a separação do grupo *Myotis* sp.2 é bem mais distinta e marcada, portanto será explicada separadamente.

4.4. Separação do grupo *Myotis sp2*

O grupo definido como *Myotis sp.2* é constituído por apenas quatro espécimes, porém representados por três localidades diferentes, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, correspondentes à região da Mata Atlântica Sul.

Este grupo possui um alto suporte estatístico (bootstrap/probabilidade posterior = 100%), além de possuir uma grande distância genética dos demais grupos, com valores entre 7,2 e 8,0% (Tabela 3). Como explicado, diferentemente da divisão menos expressiva entre os outros grupos da região da Mata Atlântica Sul, este grupo mostra-se bem distinto, sendo um ramo basal a todas as outras amostras, tanto da região da Mata Atlântica Sul quanto da Mata Atlântica Norte.

Como dito anteriormente, como o valor de distância genética entre o grupo *Myotis sp.2* e os demais grupos é superior a 3%, podemos levantar a hipótese de que estamos lidando com uma espécie diferente com distribuição simpátrica com as populações de *M. nigricans* da Mata Atlântica.

O modelo C-M pode explicar a presença de diferentes linhagens dentro de uma mesma região, neste caso a Mata Atlântica Sul. Como sugerido pelo modelo, durante os períodos de flutuações climáticas, a região ao sul do Rio Doce pode ter originado subpopulações isoladas em fragmentos de zonas favoráveis com zonas desfavoráveis entre elas. Este isolamento poder ter levado à diminuição ou interrupção do fluxo gênico entre essas subpopulações, aumentando as divergências genéticas ao longo do tempo. Essas subpopulações poderiam até mesmo passar por um evento de especiação e, em um futuro contato, essas subpopulações poderiam estar isoladas sexual- ou ecologicamente, de forma a não ser mais possível fluxo gênico entre elas, configurando-se então, duas espécies diferentes.

Além das evidências citadas, a hipótese de que o grupo *Myotis sp.2* possa se tratar de uma espécie distinta pode ser reforçada pelos resultados de Moratelli *et al.* (2011), que utilizou-se de dados morfológicos para descrever uma nova espécie a partir de indivíduos previamente identificados como *M. nigricans*. Neste estudo, alguns espécimes haviam sido coletados em duas localidades do Rio de Janeiro, e duas localidades do Paraná, e sido previamente identificados como pertencentes à espécie *M. nigricans*. Entretanto, sua análise demonstrou que na verdade estes espécimes representavam uma nova espécie, nomeada então *M. izecksohni*. Esta nova espécie descrita possui ocorrência simpátrica com outras espécies morfológicamente semelhantes e filogeneticamente próximas, o que teria dificultado sua identificação (MORATELLI *et al.*, 2011). Além disso, este mesmo autor acredita que esta espécie possa ocorrer em outras localidades do

sudeste e sul da Mata Atlântica, nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Moratelli *et al.* (2011) propôs os caracteres morfológicas a serem analisados para correta identificação entre as espécies próximas à *M. izecksohni*, porém a revisão morfológica destes quatro espécimes do grupo *Myotis* sp.2 foi inviabilizada, no presente estudo, visto que os materiais de pele e crânio destes indivíduos estão no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e não foi possível analisá-los neste estudo.

A hipótese do grupo *Myotis* sp.2 tratar-se, então, de uma espécie nova poderá ser corroborada ou refutada no futuro com a análise de novos dados de diferentes espécies filogeneticamente próximas e que ocorrem em simpatria na região da Mata Atlântica Sul, sendo estas *M. albescens*, *M. ruber*, *M. riparius* e, a espécie recém descrita, *M. izecksohni*.

A compreensão da relação e identidade do grupo *Myotis* sp.2 poderia ser realizada em dois passos. O primeiro, seria a utilização de diversas novas amostras de indivíduos das espécies mais próximas à *M. nigricans*, revisando morfológicamente todas as identificações destes indivíduos a partir dos caracteres de identificação para separação destas espécies proposto por Moratelli *et al.* (2011). O segundo passo, seria analisar esses espécimes geneticamente, e posteriormente inserir as amostras do grupo *Myotis* sp.2 e então avaliar como estes indivíduos se agrupariam filogeneticamente e a qual grupo morfológico pertenceriam. Com isso, teríamos como analisar a qual espécie este grupo se assemelha geneticamente, e então a qual espécie pertence, ou até mesmo se estes indivíduos estariam representando uma nova espécie.

Infelizmente, o teste desta hipótese demandaria tempo e todo um novo estudo. Desse modo, futuros estudos morfológicos e genéticos com este grupo de espécies poderão melhorar a compreensão de suas relações filogenéticas. Além de definir a qual espécie estes quatro indivíduos do grupo *Myotis* sp.2 realmente pertencem, e se ainda há novos grupos a serem identificados e descritos.

4.5. Categorias filogeográficas

Avise *et al.* (1987) definiram cinco categorias filogeográficas levando em consideração sua descontinuidade/continuidade genética e separação espacial. Essas categorias demonstram as principais possibilidades de situações filogeográficas encontradas para diferentes grupos de estudo.

Com isso, foram analisados estes padrões filogeográficos para entender a qual tipo de padrão os resultados encontrados neste estudo se enquadrariam. Foram definidos duas

categorização: a primeira considerando todos os grupos da Mata Atlântica como um único grupo; e a segunda, apenas o grupo Mata Atlântica Sul. O grupo *Myotis* sp.2 não foi incluído nestas observações, visto que não podemos claramente identificar se são indivíduos pertencentes a mesma espécie dos demais.

A Mata Atlântica quando analisada como um todo, apresenta um padrão filogeográfico semelhante à categoria I definida por Avise *et al.* (1987), demonstrando uma descontinuidade filogenética entre os grupos norte e sul, além de estarem espacial, ou geograficamente, separados. Avise (1987) menciona que esta situação foi a mais comumente encontrada em seus estudos.

Quando analisamos somente a M.A. Sul, observamos um resultado diferente e, conseqüentemente, podemos definir uma categoria filogeográfica diferente. Neste caso, podemos observar que, primeiramente, o grupo não possui uma separação espacial, de forma que eliminamos as situações das categorias I, III e V. Desse modo, as categorias possíveis seriam as II e IV, sendo que as diferenças entre elas estão no fato de terem continuidade ou descontinuidade filogenética.

A categoria II possui poucos bons exemplos empíricos, visto que são raros os casos de altos valores de divergência genética sem separação espacial, dessa forma se torna difícil comparar a situação encontrada no grupo Mata Atlântica Sul com outros exemplos. Os valores de distância genética dentro do grupo Mata Atlântica Sul como um todo foi de 2,4%, este valor poderia ser informativo para definir estas amostras como da categoria II. Porém, como a divisão entre as amostras da Mata Atlântica Sul não foi resgatada pela inferência bayesiana, somente pela máxima verossimilhança, poderíamos definir como categoria IV. A partir disto, decidi definir-se esta situação como pertencente à categoria IV.

A categoria IV, definida como o padrão filogeográfica da Mata Atlântica Sul, foi encontrada para alguns passáros, como os “blackbirds”, por Avise *et al.* (1987). Este autor, suspeita que os grupos encontrados como desta categoria filogeográfica tiveram uma relativa fluidez de movimento ao longo de uma escala recente do tempo evolutivo, de modo que as populações tenham estado em sólido contato genético dentro das últimas dezenas de milhares de gerações. Para os “blackbirds”, a relativa fluidez de movimento é obviamente facilitada pela capacidade de voo destas aves, como explicado por este mesmo autor. Isto corrobora a possibilidade de que *Myotis nigricans* seja da categoria filogeográfica IV, visto que estes também possuem uma relativa fluidez de movimento, também proporcionada pelo voo.

5. CONCLUSÃO

Ainda há muito para ser compreendido sobre a história evolutiva de algumas espécies, e entender como os eventos biogeográficos moldaram a distribuição geográfica das mesmas. Assim como encontrado para muitos grupos de vertebrados da Mata Atlântica, mostrando altos níveis de diversidade genética entre as regiões Norte e Sul este estudo mostrou que *Myotis nigricans* possui os mesmos padrões de divergência entre essas duas regiões.

Além da principal divisão entre a Mata Atlântica em Norte e Sul, podemos observar outra divisão menos expressiva dentro da região Sul. Esta subdivisão da Mata Atlântica Sul mostrou-se ainda indefinida, tendo sido corroborada pela análise de máxima verossimilhança e pela rede de haplótipos, e possuindo distância genética alta (aproximadamente 4%). Porém, esta divisão não foi resgatada pela inferência bayesiana. Indivíduos desses grupos podem compreender duas espécies em simpatria, ou apenas uma espécie com um alto valor de divergência intraespecífica. Futuros trabalhos com outros marcadores moleculares e maior amostragem podem ser informativos para a definição deste grupo.

Diferentemente da subdivisão na Mata Atlântica Sul, o grupo *Myotis sp 2*, que também ocorre na Mata Atlântica Sul, possui uma divisão mais distinta. Os indivíduos deste grupo podem pertencer a uma espécie diferente, que não *Myotis nigricans*. Porém, não foi possível analisar os caracteres morfológicos neste estudo, de forma que não pudemos averiguar se são indivíduos da espécie recém-descrita *M. izecksohni* ou uma espécie ainda não descrita.

A categoria geogeográfica para a divisão entre Norte e Sul da Mata Atlântica foi definida como categoria I – filogenética descontínua e separada espacialmente. Enquanto para a subdivisão dentro da Mata Atlântica foi mais complexo a definição entre as categorias II e IV. Porém, a categoria IV mostrou-se como mais provável, até mesmo por ser correspondente para alguns pássaros, cuja capacidade de locomoção é semelhante a dos morcegos.

A partir deste estudo também foi possível observar que a espécie *Myotis nigricans* ainda possui complicações quanto à sua real identidade e, provavelmente, ainda possa compreender a um complexo de espécies. Novos estudos com maior amostragem e, principalmente, adicionando dados das espécies mais próximas à *M. nigricans* podem ajudar a compreender as relações filogenéticas entre essas.

REFERÊNCIAS

- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial-DNA bridge between population-genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard: **Harvard University Press**. 2000.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**. v. 36, p. 3-15, 2009.
- BATES, J.M., HACKETT S.J., CRACRAFT, J. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distribution of passerine birds. **Journal of Biogeography**. v. 25, p. 783-793, 1988.
- BIANCONI, G. V.; Pedro, W. A. Família Vespertilionidae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Ed. EDUEL, p. 167-195, 2007.
- BANDELT, H.J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 16, p. 37-48, 1999.
- BRADLEY, R.D.; BAKER, R.J. A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**. v. 82, p. 1935-1943, 2001.
- BRUFORD, M.W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y.; BURKE, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular genetic analyses of populations: A practical Approach*. Oxford: **Gráfica**. 1992.
- CÂMARA, I. G. (Ed.) Plano de Ação para a Mata Atlântica. **Editora Interação LTDA**. São Paulo, n. 4, p. 40, 1996.
- CARNAVAL, A.C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**. v. 35, p. 1187-1201, 2008.
- CLARE, E.L.; LIM, B.K.; ENGSTROM, M.D.; EGER, J.L.; HEBERT, P.D. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**. v. 7, p. 184-190, 2007.
- COSTA, L.P; LEITE, Y.L.R.; DA FONSECA, G.A.B; DA FONSECA, M.T. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**. v. 32, p. 872-881, 2000.
- COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30: p. 71–86, 2003.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**. v. 9, p. 772, 2012.

- DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeographic of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**, n. 9, p. 1307-1318, 2000.
- FERREIRA, W.A.S; BORGES, B.N; RODRIGUES-ANTUNES, S.; ANDRADE, F.A.G.; AGUIAR, G.F.S; SILVA-JUNIOR, J.S., MARQUES-AGUIAR, S.A.; HARADA, M.L. Phylogeography of the Dark Fruit-Eating Bat *Artibeus obscurus* in the Brazilian Amazon. **Journal of Heredity**, v. 105, p. 48-59, 2014.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294-297, 1994.
- GARDNER, A.L. Family Vespertilionidae Gray, 1821. In: GARDNER, A.L. (Ed.). Mammals of South America. Chicago: **University of Chicago Press**, p. 440-484, 2008.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v.165, p. 131-137, 1969.
- HAFFER, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 917-947, 2008.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v. 294, p. 2310-2314, 2001.
- IBGE. Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. 2^a ed. Rio de Janeiro: IBGE, 208p, 1996.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.
- LARSEN, R.J.; KNAPP, M.C.; GENOWAYS, H.H.; KHAN, F.A.A.; LARSEN, P.A.; WILSON, D.E.; BAKER, R.J. Genetic Diversity of Neotropical *Myotis* (Chiroptera:Vespertilionidae) with an Emphasis on South American Species. **Plos One**, v.7, p. 9, 2012.
- LaVAL, R. K. A revision of the neotropical bats of the genus *Myotis*. **Natural History Museum Los Angeles County Science Bulletin**, v. 15, p. 1-54, 1973.
- LEE, Y.; McCracken, G.F. Flight activity and food habits of three species of *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in sympatry. **Zoological Studies**. v. 43, p. 589-597, 2004.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.
- LYNCH, J.D. The amphibians of the lowland tropical forests. In: Duellman WE (ed), The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal. **Museum of Natural History**, University of Kansas. p. 189–216, 1979.

- MARTINS, L.R.; COUTINHO, P.N. The Brazilian continental margin. **Earth-Science Reviews**. v. 17, p. 87-107, 1981.
- MARTINS, F.A.; DITCHFIELD, A.D.; MEYER, D.; MORGANTE, J.S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v. 45, p. 372–378, 2007.
- MARTINS, F.M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 104, p. 499-509, 2011.
- MARTINS, F.M.; DOMINGUES, M.V. Filogeografia. **Revista da Biologia**. Vol. Esp. Biogeografia. p. 26-30, 2011.
- MILLER, G.S.; ALLEN, G.M. The American bats of the genera *Myotis* and *Pizonyx*. **Bulletin of the United States National Museum**. v. 144, p. 1-128, 1928.
- MORATELLI, R.; PERACCHI, A.L.; DIAS, D.; OLIVEIRA, J.A. Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species. **Mammalian Biology**, v. 76, p. 592-607, 2011.
- MORATELLI, R.; GARDNER, A.L.; OLIVEIRA, J.A.; WILSON, D.E. Review of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from Northern South America, Including Description of a New Species. **American Museum of Natural History**. v. 3780, p. 1-36, 2013.
- MULLER, P. Dispersal Centres of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm. **Biogeographica 2**, The Hague, p. 244, 1973.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 845-853, 2000.
- NOVAES, R.; SOUZA, R.; RIBEIRO, E.; SIQUEIRA, A.; GRECO, A.; MORATELLI, R. First evidence of frugivory in *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae, Myotinae). **Biodiversity Data Journal**. v. 3, p. e6841, 2014.
- PACHECO, S.M.; MARQUES, R.V. Conservação de morcegos no Rio Grande do Sul. In: FREITAS, T.R.O.; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A. (Eds.). Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação. São Carlos: **Suprema**, p.91-106, 2006.
- PAVAN, A.C.; MARTINS, F.; SANTOS, F.R.; DITCHFIELD, A.; REDONDO, R.A.F. 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**. v. 102, p. 527-539, 2011.

- PELLEGRINO, K.C.M.; ROGRIDUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 13–26, 2005.
- PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; ORTÊNCIO-FILHO, H. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina, p. 153-230, 2006.
- RAUMBAUT, A.. FigTree 1.3.1. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>, 2007.
- RBMA. 2015. Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Disponível em: < <http://www.rbma.org.br/>>. Acessado em: 22/11/2015.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. Mr. Bayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**. v. 61, p. 539-542, 2012.
- STADELMANN, B.; LIN, L.-K.; KUNZ, T.H.; RUEDI, M. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 43, p. 32-48, 2007.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**. v. 22, p. 2688-2690, 2006.
- SUGUIO, K.; ANGULO, R.J.; CARVALHO, A.M.; CORRÊA, I.C.S.; TOMAZELLI, L.J.; WILLWOCK, J.A.; VITAL, H. Paleoníveis do mar e paleolinhas de costa. In: SOUZA, C.R.G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A.M.S.; OLIVEIRA, P.E. (Eds). Quaternário do Brasil. Ribeirão Preto: **Holos**. p. 114-129, 2005.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biological Evolution**. v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A.L. A diversidade de morcegos no Brasil: lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. Porto Alegre: **Armazém Digital**, 2008.
- TONINI, J.F.R.; COSTA, L.P.; CARNAVAL, A.C. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v. 51, p. 114-121, 2013.

- TURCHETTO-ZOLET, A.C.; SEGATTO, A.L.A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L.B. Guia Prático para estudos Filogeográficos. Ribeirão Preto: **SBG**, 105 p., 2013a.
- TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. Rio de Janeiro: **Molecular Ecology**, 2013b.
- WILSON, D.E.; LaVAL, R.K. *Myotis nigricans*. New York: **Mammalian species**, v. 39, p. 1-3, 1974.
- WILSON, D.E. Genus *Myotis* Kaup 1829. In: GARDNER, A.L. (Ed.). *Mammals of South America*. Chicago: **University of Chicago Press**, p. 468-481, 2008.
- XIA, X; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.

APÊNDICES

Amostras utilizadas no presente estudo. Tabela detalhada com todas as amostras que tiveram sequências obtidas no presente estudo, incluindo localidade de coleta e resultados de similaridade encontrados com auxílio da ferramenta BLAST. Células marcadas em vermelho indicam maior similaridade com *M. nigricans*, e células azuis com *M. oxyotus*.

Identificação da amostra	Estado	Município	Coordenadas		Similaridade BLAST	
			Latitude	Longitude	<i>M. nigricans</i>	<i>M. oxyotus</i>
AD 45	PB	João Pessoa			94%	98%
AD 46	PB	João Pessoa			94%	98%
AD 49	PB	João Pessoa	-7,1441924	-34,8596574	94%	98%
AD 50	PB	João Pessoa			94%	98%
AD 52	PB	João Pessoa			94%	98%
AD 169	BA	Entre Rios			94%	98%
AD 170	BA	Entre Rios	-11.9441553	-38.0841738	94%	98%
AD 373	MG	Caratinga			93-94%	99%
AD 374	MG	Caratinga	-19.7896943	-42.1415731	93-94%	99%
AD 388	MG	Lima Duarte			95%	93%
AD 395	MG	Lima Duarte	-21.8398589	-43.7919951	93%	97%
AD 443	SP	Jundiaí			94%	93%
AD 453	SP	Jundiaí	-23.1857076	-46.8978057	94-95%	93%
AD 457	SP	Jundiaí			94%	99%
AD 674	PR	Morretes			94%	93%
AD 676	PR	Morretes			93-94%	99%
AD 678	PR	Morretes			93-94%	98%
AD 683	PR	Morretes	-25.4827475	-48.8290713	94%	99%
AD 684	PR	Morretes			92-93%	97%
AD 685	PR	Morretes			93-94%	98%
AD 919	ES	Vitória			93-94%	99%
AD 949	ES	Vitória	-20.29488451	-40.33497334	93-94%	98%
AD 950	ES	Vitória			93-94%	98%
AD 1031	ES	Castelo			93%	97%
AD 1043	ES	Castelo			93%	97%
AD 1077	ES	Castelo	-20.6037524	-41.2035324	93%	97%
AD 1078	ES	Castelo			93%	97%