



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Zoologia

**Análises da diversidade e estrutura genética de populações de
Carollia perspicillata (Chiroptera, Phyllostomidae) em Unidades
de Conservação do Cerrado**

Tais de Menezes Cardoso

Orientadora: Profa. Dra. Ludmilla Moura de Souza
Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco
Rodrigues

Brasília-DF

Fevereiro 2019

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Zoologia

**Análises da diversidade e estrutura genética de populações de
Carollia perspicillata (Chiroptera, Phyllostomidae) em Unidades
de Conservação do Cerrado**

Tais de Menezes Cardoso

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ludmilla Moura de Souza Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Brasília-DF

Fevereiro 2019

“Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível. ”

Thomas Jefferson

Agradecimentos

- À minha família e amigos por todo o apoio e carinho durante essa caminhada, eles fazem parte de todas as minhas conquistas. Ao Gustavo pelo companheirismo, incentivo, paciência e querer ajudar em tudo que fosse possível. Ao meu irmão Tiago e ao Gustavo pelas revisões do texto.
- À professora Dra. Ludmilla Moura de Souza Aguiar e ao professor Dr. Fernando Pacheco Rodrigues por terem me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto e por terem me guiado durante todo este percurso. Ao professor Dr. Fernando Pacheco Rodrigues por ter fornecido todas as ferramentas para que este trabalho pudesse acontecer.
- Às equipes dos Laboratórios de Biologia e Conservação de Morcegos e de Genética e Biodiversidade por terem fornecido as amostras necessárias para a realização deste trabalho.
- Ao Laboratório de Genética e Biodiversidade pela infraestrutura e pelas condições necessárias para a realização deste trabalho. Aos integrantes deste laboratório, os professores Lilian Giugliano, Renato Caparroz e Fernando Rodrigues, seus alunos e técnicos por todas as contribuições durante esses dois anos, em especial à Cássia Alves e à Marcela Reis.
- Ao Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos, à professora Dra. Ludmilla Aguiar e seus alunos pelo aprendizado durante os campos e reuniões.
- À banca examinadora desta dissertação Dr. Renato Caparroz, Dra. Lilian Giugliano e Dr. Antonio Aguiar por aceitarem o convite e contribuir para o enriquecimento deste trabalho.
- À Universidade de Brasília, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia pela estrutura, condições e acolhimento como aluna.
- À CAPES pela bolsa recebida durante os dois anos de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	12
<i>Áreas de estudo</i>	12
<i>Obtenção das amostras e extração de DNA</i>	14
<i>Amplificação de marcadores nucleares e mitocondriais</i>	15
<i>Genotipagem</i>	19
<i>Sequenciamento</i>	19
<i>Análise de dados</i>	20
<i>Análise da diversidade genética</i>	20
<i>Análise da estrutura genética</i>	22
RESULTADOS	24
<i>Diversidade genética</i>	24
<i>Estrutura genética</i>	27
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	51

RESUMO

Estudos sobre a diversidade e estrutura genética são cruciais para tomada de decisões sobre a conservação e o manejo de espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fragmentação do habitat sobre a diversidade e estrutura genética em populações de *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) em áreas de proteção ambiental do Brasil Central, utilizando como marcadores genéticos *loci* de microssatélites e sequências de DNA. Foram estimados índices de diversidade genética e avaliada a estruturação genética por meio de estatística F, teste de isolamento por distância e análises de agrupamento utilizando inferência Bayesiana (para os marcadores microssatélites), e pela construção de redes de haplótipos e árvores filogenéticas (para os marcadores mitocondriais). As populações de *C. perspicillata* apresentaram alta diversidade e fraca diferenciação genética. Este resultado pode indicar duas possibilidades. Em uma delas a matriz ainda é permeável, apresentando recursos e estruturas suficientes, que permitem com que os indivíduos se movimentem por curtas distâncias (*stepping stone*) e consigam manter o fluxo gênico entre as áreas de proteção. Na outra o tempo de fragmentação ainda não foi suficiente para causar perda de diversidade genética e diferenciar as populações devido a degradação recente do Cerrado, que poderá ser averiguado com estudos futuros para esta e outras espécies do Cerrado.

Palavras-chave: morcegos, fragmentação, conservação, microssatélites, DNA mitocondrial, diferenciação genética.

ABSTRACT

Studies about diversity and genetic structures are crucial for decision-making on species conservation and management. The objective of this dissertation was to evaluate the effects habitat fragmentation has on diversity and genetic structures of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) populations in areas where the environment has been protected in Central Brazil. Microsatellites loci and DNA sequences were used as genetic markers. Genetic diversity indices were estimated and genetic structures were evaluated through the techniques known as F-test, distance isolation test and grouping analysis based on Bayesian Inference (for the microsatellite markers) and through the construction of haplotype nets and filogenetic trees (for the mitochondrial markers). The *C. perspicillata* populations present high diversity and weak genetic differentiation. This result may indicate two possibilities. One of them supports the idea the matrix is still permeable, presenting resources and enough structures for the individuals' movement through short distances (stepping stone). This means the individuals are able to maintain the genetic flux through the protection areas. The other possibility supports the idea that fragmentation time was not long enough to cause genetic diversity loss and population differentiation caused by recent degradation of Cerrado. This second possibility might be investigated in future studies about this and other Cerrado species.

Key-words: bats, fragmentation, conservation, microsatellites, mitochondrial DNA, genetic differentiation.

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país megadiverso devido a elevada diversidade de ecossistemas, de espécies biológicas e de endemismos. A degradação dos ecossistemas pelas atividades antrópicas, como o desmatamento causado pelo uso do solo para agricultura e para urbanização, afeta negativamente a biodiversidade, provocando o declínio das populações biológicas, a perda de diversidade genética, a perda de habitat e a extinção de espécies. Assim, com o intuito de preservar a diversidade biológica em longo prazo e evitar nessas áreas os impactos devido ao uso exacerbado dos recursos naturais, foram criadas as Unidades de Conservação.

As 1.221 Unidades de Conservação no Brasil (MMA 2016) seguem os critérios para criação, implantação e gestão estabelecidos pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC), regulamentadas pela Lei nº 9.985/2000. O SNUC define as unidades de conservação como o espaço territorial e seus recursos ambientais com características relevantes com objetivos de conservação e limites definidos ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção. As unidades de conservação são divididas em dois grupos de acordo com a intensidade de proteção: as unidades de proteção integral e as de uso sustentável.

As Unidades de proteção integral têm por objetivo a manutenção dos ecossistemas livres de alterações causadas por interferência humana, permitindo apenas o uso indireto dos seus recursos, não admitindo consumo, coleta ou dano. São exemplos dessa categoria a Estação Ecológica, a Reserva Biológica e o Parque Nacional. Em contrapartida, as Unidades de uso sustentável buscam conciliar a conservação da natureza com o uso sustentável de parte de seus recursos naturais, e são exemplos dessa categoria a Área de Proteção Ambiental, a Reserva Extrativista e a Área de Relevante Interesse Ecológico. Neste trabalho, obtivemos

amostras de três categorias de Unidades de conservação, sendo duas de proteção integral e uma de uso sustentável, que têm os objetivos descritos a seguir.

A Estação Ecológica tem como objetivo a preservação da natureza e a realização de pesquisas científicas, sendo proibida a visitação pública, exceto para fim educacional. Não é permitido áreas particulares incluídas em seus limites. O Parque Nacional tem como objetivo a preservação de ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica, permitindo a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação e de turismo ecológico. Também são proibidas áreas particulares incluídas em seus limites. A Área de Proteção Ambiental (APA) é em geral, extensa, com certo grau de ocupação humana, contendo atributos abióticos, bióticos, estéticos ou culturais importantes para a qualidade de vida das populações humanas. O objetivo da APA é proteger a diversidade biológica, disciplinar o processo de ocupação e assegurar a sustentabilidade do uso dos recursos naturais.

O Cerrado é considerado a savana mais diversificada do mundo, ocupando cerca de 21% do território brasileiro, sendo superado em extensão apenas pela Amazônia (Silva & Bates 2002, Klink & Machado 2005). Ocorre na parte central do país e é considerado um dos *hotspots* mundiais para conservação por causa da riqueza de espécies endêmicas e devido ao alto nível de ameaça quanto à perda de habitat (Myers et al. 2000). O Cerrado é composto por grande diversidade de habitats, o que possibilita uma significativa riqueza de espécies distribuídas entre as suas diversas fitofisionomias. São 4.400 espécies de plantas e 117 de vertebrados endêmicos (Myers et al. 2000).

O Cerrado é atualmente o bioma mais ameaçado do Brasil devido ao acelerado processo de conversão de suas características originais (Sano et al. 2010). Cerca de 55% do bioma já foi transformado em pastagens, áreas agrícolas ou áreas urbanas (Machado et al. 2004a, Klink & Machado 2005). Cerca de 137 espécies estão ameaçadas de extinção (Hilton-

Taylor 2004) e pelo menos 20% das espécies endêmicas não estão presentes nas áreas de proteção ambiental (Machado et al., 2004b). Apenas 8,2% da área total do Cerrado são cobertos por áreas de proteção ambiental, sendo 2,2% de áreas de proteção integral, 1,9% com áreas de uso sustentável e 4,1% com terras indígenas (Klink & Machado 2005).

A degradação acentuada do bioma se iniciou com a construção de Brasília, que teve ocupação desordenada do solo do DF, para atender a elevada migração para a cidade e a permanência dos trabalhadores que a construíram. Outro fator importante foi a conversão da terra em pastagens plantadas com gramínea africana, e a expansão da fronteira agrícola no Centro-Oeste, quando ocorreu a introdução de plantações de monoculturas, principalmente de soja (Silva & Bates 2002, Klink & Machado 2005, Sano et al. 2010).

A destruição do habitat provoca sua divisão em pequenos fragmentos isolados, separados por uma matriz com cobertura da terra modificada pela ação humana (Haddad et al. 2015). Essa alteração da estrutura do habitat e as características dos fragmentos (número, tamanho e isolamento do fragmento), em conjunto com a maior exposição da sua borda devido ao uso da terra no seu entorno, levam a mudanças das propriedades do habitat remanescente à longo prazo (Fahrig 2003). Como consequência do isolamento dos fragmentos remanescentes, pode haver uma redução do fluxo gênico, o que, ao longo do tempo, ocasiona aumento da diferenciação genética entre as populações e a perda de diversidade genética devido a endogamia (que leva à diminuição da heterozigosidade) e deriva genética (que leva à fixação e perda de alelos). Desta forma, a presença de unidades de conservação (que impedem a ocupação desordenada do solo e a fragmentação do habitat) e de suas zonas de amortecimento são fundamentais para a preservação da biodiversidade.

O isolamento entre os fragmentos pode afetar a capacidade dos indivíduos se movimentarem entre eles, o que irá depender da estrutura da matriz, e da capacidade da espécie se locomover por ela (Tischendorf et al. 2003). Algumas espécies apresentam maior

dificuldade em se locomover pela matriz, como o pássaro tangará-dançarino (*Chiroxiphia caudata*) (Goulart et al. 2015), ou o marsupial *Caluromys philander* (Pires et al. 2002). Os roedores *Oecomys concolor* e *Oligoryzomys nigripes* (Pires et al. 2002) também apresentam essa dificuldade em se locomover na matriz. Já para outras espécies a matriz pode não ser tão imprópria, permitindo que elas se movimentem entre os fragmentos, como as aves *Pyriglena leucoptera*, *Sclerurus scansor* (Goulart et al., 2015; Awade et al. 2017; Cornelius et al. 2017); os marsupiais *Didelphis aurita* e *Metachirus nudicaudatus* (Pires et al. 2002); e o roedor *Nectomys squamipes* (Pires et al. 2002).

Assim como os animais citados, os morcegos correm risco por causa da destruição do habitat e da fragmentação (Racey & Entwistle 2003). Esses animais são importantes para a manutenção de processos do ecossistema como polinização, controle de populações de pragas, dispersão de sementes, além de serem indicadores de diversidade do habitat (Mittermier et al. 2002, Kunz et al. 2011). *Carollia perspicillata* (Linnaeus 1758) é um importante dispersor de sementes de plantas pioneiras sendo crucial para a sucessão inicial e para regeneração de áreas degradadas (Heithaus & Fleming 1975, Thies & Kalko 2004). É um filostomídeo de médio porte, pesando cerca de 19g (Fleming 1987). É um dos morcegos mais comuns de toda a América Latina (Fleming 1987), encontrado desde o sul do México até o norte da Argentina, e ocorre em uma variedade de habitats tropicais (Fleming 1987). Não corre risco de extinção e pode ser encontrada em diversos lugares como cavernas, árvores ocas, galerias, prédios (Fleming 1987, Fleming 1988). *C. perspicillata* pode dar à luz a um filhote duas vezes por ano (Fleming et al. 1972, Porter 1983) e a expectativa de vida é de no máximo 10 anos (Fleming 1988).

Carollia perspicillata (Figura 1) pode consumir uma grande variedade de frutos, mas sua dieta é constituída principalmente de frutos de *Piper* sp. Essas espécies frutificam durante todo o ano, minimizando os custos energéticos de deslocamento e busca de alimento

(Fleming & Heithaus 1986, Fleming 1988). Por esse motivo, *C. perspicillata* é considerada uma espécie sedentária, percorrendo em média 1,63 Km durante o forrageio (Heithaus & Fleming 1975, Heithaus & Fleming 1978) e executando poucos voos exploratórios em busca de novas áreas (Heithaus & Fleming 1978, Fleming & Heithaus 1986). Esta espécie foi escolhida para ser estudada por causa de sua abundância e ampla distribuição em toda a América Latina.

A dispersão afeta diretamente o fluxo gênico, o nível de diferenciação e a diversidade genética entre as populações. Não há ainda consenso sobre a intensidade com que os morcegos são afetados pela fragmentação do habitat, uma vez que, por voarem, poderiam se movimentar entre os fragmentos remanescentes. Um estudo realizado com a espécie *Leptonycteris curasoae* no sul do México (Wilkinson & Fleming 1996), outro com *Eptesicus fuscus* nos Estados Unidos (Vonhof et al. 2008), e outro com *Carollia castanea* na Costa Rica (Ripperger et al. 2014) demonstraram ausência de estruturação genética e alta diversidade genética, indicando manutenção do fluxo gênico entre as populações. Por outro lado, estudos sobre estruturação genética em ambientes fragmentados realizados com as espécies *Rhinolophus ferrumequinum* na Europa (Rossiter et al. 2000), *Carollia perspicillata* no canal do Panamá (Meyer et al. 2009) e *Dermanura watsoni* na Costa Rica (Ripperger et al. 2012) detectaram diferenciação genética significativa, indicando que essas espécies de morcegos não conseguem se locomover entre os fragmentos.

No Cerrado, poucos estudos avaliaram como a fragmentação do habitat afeta a diversidade e estrutura genética das populações. Há um estudo com uma espécie de ave (Bates et al. 2003) e outro com a de um anfíbio (Telles et al. 2007) em que foi relatado uma baixa estruturação genética para as espécies. Outros estudos, com um lagarto (Santos et al. 2014) e com mais um anfíbio (Prado et al. 2012) detectaram alta diferenciação populacional nas espécies. Não há nenhum estudo avaliando se a fragmentação de habitat pode afetar a

locomoção dos morcegos e conseqüentemente reduzir o fluxo gênico levando à perda de diversidade genética e à diferenciação das populações no Cerrado.

Os marcadores moleculares são uma ferramenta eficaz para responder questões ecológicas e evolutivas sendo utilizados, entre outras coisas, para trazer informações sobre padrões filogeográficos, nível de diferenciação genética e fluxo gênico. Neste estudo foram utilizados como marcadores genéticos os *loci* de microssatélites e as sequências de DNA. Os microssatélites são sequências de DNA de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, encontradas em alta frequência no genoma nuclear (Selkoe & Toonen 2006). São marcadores codominantes que apresentam uma alta taxa de mutação, variando entre 10^{-2} e 10^{-6} mutações por geração (Schlötterer 2000). Essa alta taxa de mutação leva a alterações no número de repetições nessas sequências o que gera um alto nível de diversidade alélica. Já as sequências de DNA podem ser de origem mitocondrial ou nuclear. O DNA mitocondrial é uma molécula circular, pequena, que possui entre 16–20 kilobases de comprimento (Avise et al. 1987). É haploide, geralmente de herança materna. Por ser herdado de forma uniparental tem ausência de recombinação, e apresenta taxa de evolução 1-10 vezes mais rápida em relação às sequências nucleares (Avise et al. 1987).

Supondo que a degradação e a fragmentação do Cerrado vêm causando perda de habitats adequados e a modificação da matriz, gerando fragmentos isolados e dificultando a dispersão dos morcegos entre as Unidades de conservação, testamos a hipótese de que as populações de *Carollia perspicillata* analisadas apresentarão ausência de fluxo gênico entre as Unidades de conservação, causando a perda de diversidade genética e a diferenciação populacional devido a fragmentação do ambiente e a baixa habilidade de dispersão da espécie. Para tanto, utilizamos um conjunto de marcadores microssatélites e sequências de DNA para avaliar o efeito da fragmentação do habitat sobre a diversidade e estrutura genética em

populações de *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) em áreas de proteção ambiental do Cerrado.



Figura 1. *Carollia perspicillata*

Fonte: <https://www.flickr.com/search/?text=carollia%20perspicillata>

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

As amostras de tecido de *Carollia perspicillata* foram coletadas entre os anos de 2012 a 2015 em sete áreas de proteção ambiental do bioma Cerrado (Figura 2). Entre essas áreas, seis são Unidades de Proteção Integral: Parque Nacional de Brasília (PNB – localizada no Distrito Federal, DF), Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE - DF), Parque Estadual Serra de Ricardo Franco (PESRF - MT), Parque Nacional da Chapada dos Guimarães (PNCG - MT), Parque Nacional do Araguaia (PNA - TO) e Parque Nacional do Grande Sertão Veredas (PNGSV - MG), e uma é uma Unidade de Uso Sustentável: Área de Proteção Ambiental das bacias do Gama e Cabeça-de-Veados (APA GCV), localizada no Distrito Federal (DF), onde a amostragem ocorreu em dois pontos de coleta, AGCV1 e AGCV2.

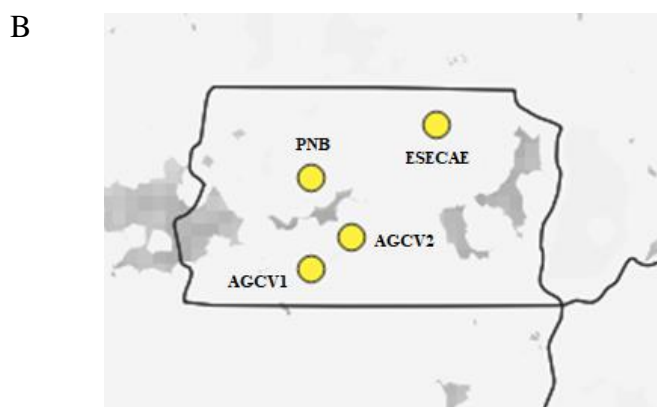
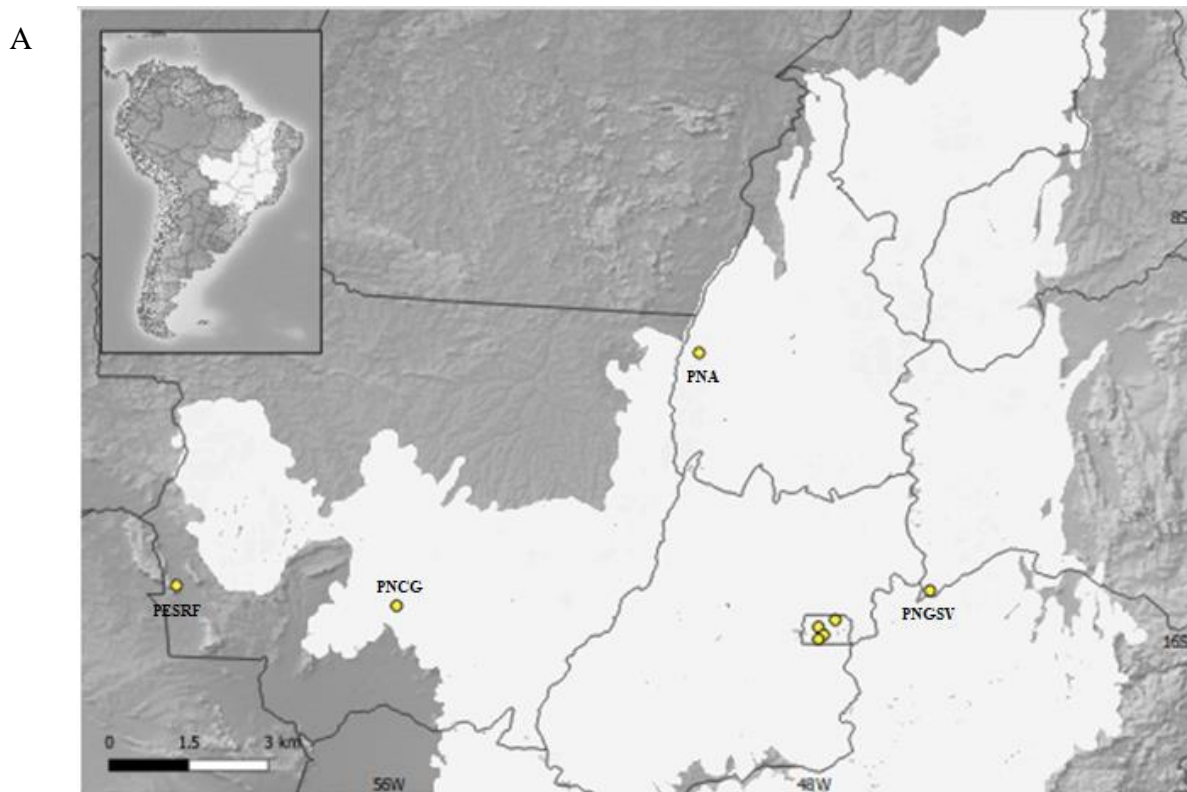


Figura 2. Localidades de coleta no Cerrado (A). A mancha branca no mapa representa a área original do Cerrado. Área ampliada das localidades de coleta dentro do Distrito Federal (B). PNB - Parque Nacional de Brasília, ESECAE - Estação Ecológica de Águas Emendadas, PESRF - Parque Estadual Serra de Ricardo Franco, PNCG - Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, PNA - Parque Nacional do Araguaia, PNGSV - Parque Nacional do Grande Sertão Veredas.

Obtenção das amostras e extração de DNA

Os tecidos foram obtidos por meio de uma colaboração entre os laboratórios de Biologia e Conservação de Morcegos, do Departamento de Zoologia, e o de Genética e Biodiversidade, do Departamento de Genética e Morfologia, ambos da Universidade de Brasília (UnB). As amostras de tecido do DF foram coletadas entre março de 2012 até agosto de 2013 por membros do Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos. As amostras de fora do DF foram obtidas entre fevereiro de 2014 e fevereiro de 2015 por membros do Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos e membros do Laboratório de Genética e Biodiversidade.

Os espécimes de *C. perspicillata* foram capturados com redes de neblina de 12 × 2,6 m. As amostras de tecido foram obtidas cortando-se 3 mm do plagiopatágio ou do uropatágio e colocadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo etanol absoluto. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o envio para o laboratório, onde foram então armazenadas à temperatura de -20°C até a realização da extração do DNA. Após a coleta do tecido, os indivíduos amostrados foram novamente soltos no local de captura.

Foram utilizadas amostras de tecido de 230 indivíduos, sendo 29 do PNB, 30 da ESECAE, 26 da AGCV1, 30 da AGCV2, 30 do PESRF, 25 do PNCG, 30 do PNA e 30 do PNGSV (Tabela 1). As autorizações de captura dos espécimes foram emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO n° 44179).

Tabela 1. Locais de coleta de tecido de *Carollia perspicillata*. São indicadas as localidades de coleta e sua sigla, as coordenadas geográficas (latitude e longitude) e o número de indivíduos amostrados para cada área (N).

Localidade	Sigla	Estado	Latitude	Longitude	N
Parque Nacional de Brasília	PNB	DF	15°43'S	47°56'W	29
Estação Ecológica de Águas Emendadas	ESECAE	DF	15°35'S	47°37'W	30
Área de Proteção Ambiental das bacias do Gama e Cabeça-de-Veados 1	AGCV1	DF	15°52'S	47°50'W	26
Área de Proteção Ambiental das bacias do Gama e Cabeça-de-Veados 2	AGCV2	DF	15°57'S	47°56'W	30
Parque Estadual Serra de Ricardo Franco	PESRF	MT	14°56'S	60°02'W	30
Parque Nacional da Chapada dos Guimarães	PNCG	MT	15°19'S	55°53'W	25
Parque Nacional do Araguaia	PNA	TO	10°33'S	50°11'W	30
Parque Nacional do Grande Sertão Veredas	PNGSV	MG	15°02'S	45°50'W	30

A extração do DNA das 230 amostras foi feita utilizando o método de fenol: clorofórmio, baseado no protocolo de Sambrook & Russell (2006). Após a extração, a qualidade do DNA foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sob transiluminador de luz ultravioleta, sendo as imagens dos géis obtidas por meio do software de imagem Kodak 5.0.1.27. Posteriormente, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro modelo NanoVue plus (GE Healthcare Life Sciences) e diluídas em água milli-Q em uma solução de uso contendo 10ng/μL, as quais foram utilizadas para a realização das ampliações dos fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Amplificação de marcadores nucleares e mitocondriais

Para a obtenção dos genótipos dos 230 indivíduos foram amplificados 11 *loci* de microssatélites descritos por Bardeleben et al. (2007), McCulloch & Stevens (2011) e Cleary et al. (2016), desenvolvidos inicialmente para *Carollia brevicauda*, *Artibeus lituratus* e *Carollia castanea* e testados em outras espécies, entre elas *Carollia perspicillata* (Tabela 2).

O *primer forward* utilizado para a amplificação de cada *locus* foi sintetizado com uma cauda M13 na extremidade 5', permitindo assim a utilização do protocolo de genotipagem

utilizando marcações fluorescentes, conforme descrito por Schuelke (2000). A amplificação realizada por meio da PCR para os *loci* AAGG-7, AAGG-91, AAGG-112, AAGG-117, AAGG-119, AAGG-143 e AL2_18713 foi feita com 30ng de DNA, 1X do tampão da Taq DNA polimerase, 2mM de MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,1μM de *primer forward*, 0,5μM de *primer reverse*, 0,5μM de *primer* M13 marcado com um fluoróforo (FAM, NED ou HEX) (Tabela 2) e 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) com volume final da reação de 10μL. O termociclador foi programado com temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 10 min, seguido por 20 ciclos de 94°C por 45 s, temperatura de anelamento (Ta) do *primer* (Tabela 2) por 45 s e 72°C por 1 min, e posteriormente por 25 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s, 72 °C por 45 s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 10 min. A amplificação dos *loci* AL2_25522, CC-18 e CC-25 foi feita com 30ng de DNA, 1X de tampão da Taq DNA polimerase, 1,75mM de MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,08μM de *primer forward* marcado com um fluoróforo (FAM, NED ou HEX) (Tabela 2), 0,32μM de *primer reverse*, 0,32μM de *primer* M13 e 0,5U de Taq DNA polimerase (Platinum®) com volume final da reação de 10μL. Para a amplificação do *locus* CC-10 foram utilizadas 30ng de DNA, 1X de tampão da Taq DNA polimrase, 2mM de MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,08μM de *primer forward*, 0,32μM de *primer reverse*, 0,32μM de *primer* M13 e 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) com volume final da reação de 10μL. Para amplificação desses *loci*, foi usada a temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 10 min, 25 ciclos de 94° C por 45 s, Ta do *primer* (Tabela 2) por 45 s e 72 °C por 45s, seguido por 15 ciclos de 94 °C por 45 s, 53 °C por 45 s, 72 °C por 45 s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 10 min. O *locus* CC-18 apresentou inconsistência na amplificação e por isso foi retirado das análises posteriores.

Tabela 2. Descrição dos *loci* analisados, contendo a sequência dos *primers* utilizados para sua amplificação, *repeat motif*, faixa de tamanho dos alelos encontrados (em pares de base, bp), temperatura de anelamento do *primer* (Ta °C) e marcação fluorescente utilizada para cada *primer*.

Locus	Sequência 5'-3'	Repeat motif	Tamanho dos alelos (bp)	Ta °C	Fluoróforo
CC-10 (a)	TGCAGGGAAGATGAGAATGAACA CAGGGCCTGGTGCATAGTAG	(AATG) ₇	125 - 161	63	FAM
CC-25 (a)	GTCTGTTTCTGCCTCTTTGGG ATGGGTCACCGTGTCTTAGC	(AATG) ₈	131 - 159	63	NED
CC-18 (a)	AGCAGGACGTAAGACAGCAG TTCCATTTTCATTGCTGTGGC	(AAGG) ₁₃	216 - 300	65	HEX
AAGG-7 (b)	GCGTCTGGCATATTAGTCC TTGACCATGTAGAGCAAGGTT	(AAGG) ₁₁	142 - 198	60	NED
AAGG-91 (b)	CATGAAACAATCCACTGGC CGTGAGCAAAACAACCAAGA	(AAGG) ₃ (G)(AAGG) ₃ (AGAA) ₂ (GAGG)(AAGG) ₁₂	145 - 233	60	FAM
AAGG-112 (b)	GGGAAACCACACAAAGTTGG TTGGAACAGGATAGGGGAGA	(AAGG) ₇ (AATG) ₁₁	140 - 204	60	FAM
AAGG-117 (b)	GACTAAGATAGATAAAATTGATGGATAA CAAAATGCTTTAGTTTCTGAAT	(AAGG) ₁₆	148 - 212	55	NED
AAGG-119 (b)	TGTAATCCGTGAGGACAGAAA CGTTGGAAGAGACCACCTG	(AAGG) ₁₂	192 - 244	60	HEX
AAGG-143 (b)	GATCATTTCTCAAAAGTTTCTT ACTGACATGTACTAAGGTTAT	(CCTT) ₃ (CCTA)(CCTT) ₆	168 - 212	55	HEX
AL2_18713 (c)	ATGCCCCATATCTCCACAGG GATAACTGTTCAGGCCCAAGG	(ATCT) ₁₂	193 - 249	60	NED
AL2-25522 (c)	GCTAGGTATGGGGCTGTATCC CACCTTCTGGCCTCAATTCC	(AAAT) ₆	264 - 308	55	FAM

(a) Cleary et al. (2016), (b) Bardeldeben et al. (2007), (c) McCulloch & Stevens (2011).

Além da genotipagem de *loci* microsatélites, analisamos também regiões de genes mitocondriais (D-loop e CytB) e nuclear (DBY). A amplificação da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) foi realizada utilizando-se os *primers* descritos por Wilkinson & Chapman 1991 e Wilkinson et al. 1997, enquanto que a parte inicial e final do gene *Citocromo b* (CytB) foi amplificada utilizando-se os *primers* descritos em Martins et al. (2007) (*primers* Bat 05A e Bat 04A para a parte inicial; e *primers* Bat 17A e 14A para a parte

final). Para a amplificação do gene DBY, localizado no cromossomo Y, utilizamos os *primers* descritos por Lim et al. 2008 (Tabela 3).

Foram utilizados 96 indivíduos, seis machos e seis fêmeas de cada localidade, para a análise da região controle, e 48 indivíduos, três machos e três fêmeas de cada localidade, para a análise do gene CytB. As reações da cadeia em polimerase (PCR) para esses segmentos foram realizadas com: 30ng de DNA, 1X de Tampão da Taq, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,8μM de cada *primer* e 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), com volume final da reação de 10μL. Para a amplificação do D-loop a temperatura inicial da reação foi de 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 45s, 72°C por 60s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 20 min, enquanto que para a amplificação do gene CytB utilizamos 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 45°C (para Bat 05A e Bat 04A) e 50°C (para Bat 17A e Bat 14A) por 45s, 72°C por 70s, finalizando com temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Para a amplificação do gene DBY, foram utilizados: 30ng de DNA, 1X de Tampão da Taq, 2mM de MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,8μM de cada *primer* e 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) com volume final da reação de 10μL, sendo o termociclador programado para o seguinte ciclo: 94°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 45 s, 72 °C por 60s, e extensão de 72 °C por 20 min. Após um teste inicial com sete indivíduos das localidades PNB, ESECAE, PESRF, PNCG, PNA e PNGSV, verificamos que o gene DBY não apresentava nenhum polimorfismo e, desta forma, a amplificação das demais amostras foi interrompida e sua análise descartada deste projeto.

Todas as amplificações foram feitas utilizando o termociclador LIFE ECO TC-96/G/H(b)C, da BIOER. Após a realização das PCRs, verificamos o sucesso de amplificação e a qualidade do produto por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, sendo as imagens do gel visualizadas por meio do software de imagem Kodak 5.0.1.27.

Tabela 3. Descrição dos *primers* utilizados para amplificação das sequências do D-loop, CytB e DBY, contendo a sequência dos *primers* utilizados e a temperatura de anelamento (Ta °C).

Sequência de DNA	Primer	Sequência 5'-3'	Ta °C
D-Loop	Primer E (a)	CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG	54
	Primer P (b)	CCC CAC CAT CAA CAC CCA AAG CTG A	
Cyt B	Bat 05A (c)	CGACTAATGACATGAAAAATCACCGTTG	45
	Bat 04A (c)	GTAGCTCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	
	Bat 17A (c)	ACCTCCTAGGAGACCCAGACAATT	50
	Bat 14A (c)	TATTCCTTTGCCGGTTTACAAGACC	
DBY	HDBY7F (d)	GGT CCA GGA GAR GCT TTG AA	56
	HDBY7R (d)	CAG CCA ATT CTC TTG TTG GG	

(a) Wilkinson & Chapman (1991), (b) Wilkinson et al. (1997), (c) Martins et al. (2007), (d) Lim et al. (2008).

Genotipagem

Após a amplificação, os produtos da PCR dos *loci* de microssatélites foram genotipados utilizando-se o sequenciador automático ABI 3730 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em seguida, utilizamos o programa GENEIOUS 6.0.6. (Kearse et al. 2012) para determinar o tamanho dos alelos, usando como referência o marcador GeneScan™ 500 ROX™ (Applied Biosystems).

Sequenciamento

A purificação de 5µL do produto da PCR do D-loop e do CytB foi feita com 10U/µL da enzima Exonuclease I (*Exo I*) e 1U/µL da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP),

incubado em termociclador à 37°C durante 1h e 30min, seguido por 80°C por 20min. Os produtos purificados foram enviados para o Centro de Genômica do Distrito Federal, na Universidade Católica de Brasília para o sequenciamento. Todas as amostras foram sequenciadas nas duas direções, senso e anti-senso, utilizando o kit de sequenciamento BigDye e o sequenciador ABI 3130, ambos da Applied Biosystems®.

A análise, edição e obtenção da sequência consenso foi realizada no programa GENEIOUS 6.0.6. (Kearse et al. 2012). Em seguida, o alinhamento múltiplo das sequências foi feito utilizando o algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) no programa MEGA V7.0.14 (Kumar et al. 2016).

Análise de dados

Análise da diversidade genética

- ***Microsatélites***

O desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci* de microsatélites em cada população foi testado usando o teste exato para o desequilíbrio genotípico implementado nos programas GENEPOP 4.5.1 (Rousset 2008) e FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001). No programa GENEPOP os parâmetros para cadeia de Markov utilizados foram 10.000 permutações, 10.000 *batches* e 5.000 interações por *batch* e no FSTAT o nível de significância foi ajustado para 5% e 1%. A ocorrência de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi avaliada analisando-se tanto o coeficiente de endogamia (F_{IS} - Weir & Cockerham 1984), estimado utilizando o programa FSTAT, como pelo déficit de heterozigotos por *locus* e por localidade, estimado com o uso do programa ARLEQUIM 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) utilizando 1.000.000 de cadeias de Markov e 100.000 passos de desmemorização para o cálculo da significância estatística (teste exato de Guo & Thompson 1992). A ocorrência de alelos nulos,

dropout alélico e *stutter peaks* foi avaliada no programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) com base em 1.000 cadeias de Monte Carlo e intervalo de confiança de acordo com correção de Bonferroni. A frequência de alelos nulos (r) foi estimada por *locus* e por localidade usando estimativa de máxima verossimilhança (Dempster et al. 1977) no programa GENEPOP. Para os testes de comparações múltiplas, o nível de significância (α) foi ajustado utilizando correção pelo método de B-Y FDR (Benjamini & Yekutieli 2001).

Foram estimados os índices de diversidade genética global e por *locus* por localidade. O número de alelos (A), a riqueza alélica (RA) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) (Weir & Cockerham 1984) foram estimados utilizando o programa FSTAT. As heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) foram estimadas pelo programa ARLEQUIN. O nível de significância de F_{IS} foi ajustado pelo método de B-Y FDR.

O programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996, Piry et al. 1999) foi utilizado para detectar redução recente do tamanho efetivo populacional. Utilizamos o modelo de mutação em duas-fases (*Two-Phase Mutation Model* –TPM) por ser mais apropriado para os marcadores microssatélites do que o modelo de alelos infinitos (*Infinite Allele Model* –IAM). As porcentagens de mutações passo-a-passo (*stepwise*) testadas no modelo TPM foram de 75, 85 e 95% com variância entre *multiple steps* igual a 12, realizando um total 1.000 interações, como recomendado por Piry et al. (1999). Para avaliar a existência de diferença significativa entre a heterozigosidade esperada (H_e) e a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio mutação-deriva (H_{eq}) foi utilizado o teste de Wilcoxon, devido ao fato deste ser o mais robusto quando usado com menos de 20 *loci* polimórficos e amostras com menos de 30 indivíduos (Piry et al. 1999).

- ***DNA mitocondrial***

Para as sequências do D-loop e CytB foram calculados os índices de diversidade para cada localidade e a diversidade total. Foram estimados o número de sítios variáveis (S), o número de haplótipos (h), a diversidade haplotípica (Hd) e a diversidade nucleotídica (π), por meio do programa DNAsp versão 5 (Librado & Rozas 2009).

Análise da estrutura genética

- ***Microsatélites***

A diferenciação entre cada par de localidade foi calculada utilizando a estimativa de F_{ST} (Θ) de Weir & Cockerham (1984) implementada pelo programa GENEPOP. A significância foi avaliada por meio do teste exato G para diferenciação genotípica realizada pelo mesmo programa, utilizando como parâmetros da cadeia de Markov 10.000 permutações, 100 *batches* e 5.000 interações por *batch*. O nível de significância (α) foi mensurado utilizando correção pelo método de B-Y FDR.

A ocorrência de isolamento por distância (*Isolation By Distance* –IBD) foi testada por meio do teste de Mantel. A distância mínima aproximada entre cada par de localidades foi calculada pela plataforma online do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (<http://www.dpi.inpe.br/calcula/>) por meio das coordenadas geográficas obtidas no Google Earth. O F_{ST} linear de Slatikin [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] e o logaritmo da distância entre os pares de localidades foram calculados no programa GENEPOP. Posteriormente, foi feita a representação gráfica no programa GENALEX 6.3 (Peakall & Smouse 2006).

A inferência do número provável de agrupamentos genéticos (K) e a existência de estrutura genética populacional também foram realizadas utilizando-se o programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al. 2000). Foram realizadas 10 corridas independentes para

cada K ($K= 1$ a 10) utilizando 500.000 cadeias de Markov de Monte Carlo (MCMC) e um *burn-in* de 100.000. Após avaliação prévia com diferentes configurações, os parâmetros escolhidos para a análise dos dados foram o modelo de ancestralidade com mistura e o modelo de frequência de alelos correlacionados, utilizando como informação *a priori* a localidade das amostras. O número de agrupamentos foi inferido pelo ΔK de acordo com o método proposto por Evanno et al. (2005) utilizando a plataforma *on-line* STRUCTURE HARVESTER 0.6.8 (Earl & vonHoldt 2012). A representação gráfica dos resultados obtidos pelo STRUCTURE foi realizada utilizando o software CLUMPAK (Kopelman et al. 2015). A matriz contendo a probabilidade média de afiliação de cada indivíduo (*Q-matrix*) para o número de K mais provável foi também analisada graficamente utilizando o software Excel, o que nos permitiu avaliar a composição de cada um dos possíveis agrupamentos genéticos inferidos pelo STRUCTURE.

- ***DNA mitocondrial***

Para a análise das sequências de DNA, utilizamos o programa DNAsp para determinar os haplótipos existentes em cada marcador, e estes foram utilizados para a construção das redes haplotípicas. A relação entre os haplótipos de cada marcador foi feita utilizando o método *Median-Joining* (Bandelt et al. 1999) por meio do programa NETWORK, versão 5.0.0.3 (Fluxus Technology 2012). Para o D-loop foi feito um pós-processamento para reduzir a quantidade de “*median vectors*” desnecessários.

As árvores filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança e *Neighbor-Joining* para cada marcador por meio do programa MEGA. Foi utilizado o modelo Tamura-Nei com suporte de 10.000 replicações de *bootstrap*. Como grupos externos foram utilizadas as espécies *Carollia castanea* e *Glossophaga morenoi*, cujas sequências de DNA estão disponíveis no Genbank (números de acesso KF964545 (para o D-loop), AF187022.1 (citocromo B); e MF804238.1 (D-loop) e AF382882.1 (citocromo B), respectivamente).

RESULTADOS

Diversidade genética

- *Microssatélites*

O teste de desequilíbrio de ligação não foi significativo para nenhum dos pares de *loci* ($P > 0,05$), indicando segregação independente entre eles. O *locus* CC-18 foi excluído devido a inconsistência durante a amplificação, assim as análises subsequentes foram realizadas com um conjunto de 10 *loci*. Com exceção dos *loci* AAGG-112 e AAGG-143, todos os outros apresentaram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,017$) (Tabela 4). O resultado da análise da frequência de alelos nulos indicou uma alta frequência de alelos nulos em dois *loci*, AL2-18713 (26,0%) e CC-25 (23,9%) (Tabela 4). Tendo em vista que alelos nulos podem comprometer as análises subsequentes, estes dois *loci* não foram mais utilizados. Informações adicionais relacionadas ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada e esperada, e frequência de alelos nulos por *locus* por localidade são apresentadas no Anexo 1.

Na Tabela 5 são apresentados os índices de diversidade populacional utilizando os 8 *loci* selecionados (após a retirada dos *loci* AL2-18713 e CC-25 devido à alta frequência de alelos nulos e do *locus* CC-18 devido à inconsistência durante a amplificação). O número médio de alelos por localidade amostrada variou de 8 (AGCV2 e PNGSV) a 10 (PESRF e PNA), e a riqueza alélica foi menor em AGCV2 (7,260) e maior em PESRF (8,522). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) variou entre 0,097 em PESRF e 0,218 em PNGSV, sendo estatisticamente significativo para todas as localidades. O menor valor de heterozigosidade observada foi em PNGSV (0,599) e o maior foi em PESRF (0,715), enquanto que a heterozigosidade esperada foi menor em AGCV2 (0,753) e maior em PNCG (0,798). A frequência de alelos nulos variou

entre 0,056 em PESRF e 0,095 em PNGSV. Os dados de diversidade genética nos 8 *loci* em cada localidade amostrada podem ser vistos no Anexo 2.

Tabela 4. Caracterização dos 10 *loci* de microssatélites usados em *Carollia perspicillata*.

<i>Locus</i>	Número de alelos	<i>Ho</i>	<i>He</i>	EHW valor de <i>P</i>	<i>Fis</i>	<i>Fis</i> valor de <i>P</i>	<i>r</i>
AAGG-7	15	0,657	0,743	0,000	0,117	0,005	0,051
AAGG-91	22	0,614	0,742	0,000	0,172	0,005	0,094
AAGG-112	13	0,796	0,823	0,205	0,033	0,130	0,020
AAGG-117	17	0,671	0,880	0,000	0,238	0,005	0,134
AAGG-119	14	0,655	0,821	0,000	0,202	0,005	0,100
AAGG-143	9	0,520	0,559	0,112	0,070	0,045	0,033
AL2_18713	14	0,307	0,740	0,000	0,586	0,005	0,260
CC-10	10	0,662	0,802	0,000	0,174	0,005	0,084
CC-25	8	0,315	0,712	0,000	0,558	0,005	0,239
AL2-25522	12	0,668	0,873	0,000	0,235	0,005	0,117

Heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada (*He*), equilíbrio de Hardy-Weinbaerg (EHW), coeficiente de endogamia (*Fis*), frequência de alelos nulos (*r*). Em negrito, valores significativos após correção pelo método de B-Y FDR ($\alpha < 0,017$).

Tabela 5. Diversidade genética das populações de *Carollia perspicillata* utilizando 8 *loci* microssatélites. Para nome das localidades ver Tabela 1.

	<i>A</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>P</i> de <i>Fis</i>	<i>r</i>
PNB	9	8,126	0,665	0,784	0,154	0,001	0,064
ESECAE	9	8,276	0,676	0,773	0,127	0,001	0,068
AGCV1	9	8,185	0,644	0,760	0,155	0,001	0,058
AGCV2	8	7,260	0,641	0,753	0,150	0,001	0,070
PESRF	10	8,522	0,715	0,791	0,097	0,001	0,056
PNCG	9	8,005	0,650	0,798	0,189	0,001	0,083
PNA	10	8,362	0,645	0,771	0,166	0,001	0,080
PNGSV	8	7,495	0,599	0,763	0,218	0,001	0,095

Número de alelos (*A*), riqueza alélica (*RA*), heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada (*He*), coeficiente de endogamia (*Fis*), valor de significância de *Fis* (*P*), frequência de alelos nulos (*r*). Os valores de *A*, *RA*, *Ho*, *He* e *r* são a média aritmética entre os 8 *loci*. Em negrito, valores significativos após correção pelo método de B-Y FDR ($\alpha < 0,018$).

O teste para avaliar a ocorrência de gargalo populacional, realizado no programa BOTTLENECK, não foi significativo para nenhuma das localidades (Tabela 6). Isso indica que não observamos excesso de heterozigotos, o que sugere que as populações estudadas estão sob equilíbrio mutação-deriva e, portanto, não sofreram redução recente no tamanho efetivo populacional.

Tabela 6. Teste de redução populacional (Bottleneck) para as oito localidades amostradas para *Carollia perspicillata*. Valores de *P* para excesso de heterozigotos foi feito com diferentes porcentagens de mutação passo-a-passo (SMM) no modelo TPM. Para nome das localidades ver Tabela 1.

	Porcentagem de mutações passo-a-passo (SMM) no modelo TPM		
	75%	85%	95%
PNB	0,680	0,808	0,902
ESECAE	0,726	0,808	0,902
AGCV1	0,680	0,844	0,902
AGCV2	0,680	0,808	0,972
PESRF	0,902	0,980	0,994
PNCG	0,527	0,726	0,875
PNA	0,769	0,808	0,980
PNGSV	0,769	0,963	0,973

- **DNA mitocondrial**

Ao todo foram analisados 92 indivíduos para o marcador D-loop, resultando em um alinhamento de 394bp. A partir da matriz de dados foram identificados 94 sítios variáveis, correspondendo à 23,86% dos sítios analisados, formando 78 haplótipos. A diversidade haplotípica (*Hd*) foi menor em AGCV2 (0,964) e maior em ESECAE, AGCV1, PESRF e PNGSV (0,985), enquanto que a diversidade nucleotídica (π) foi menor em AGCV2 e PNCG (0,041) e maior em PNGSV (0,052) (Tabela 7).

Após o sequenciamento do gene *Citocromo b*, a parte final foi excluída das análises devido a falhas no sequenciamento. Para as análises populacionais foram então utilizados 314

bp correspondentes à parte inicial deste gene, em um total de 30 indivíduos. Com este conjunto de dados foram identificados 21 sítios variáveis, correspondendo à 6,69% dos sítios avaliados, gerando 13 haplótipos. A diversidade haplotípica foi menor em PESRF (0,0) e maior em ESECAE, PNCG e PNGSV (1,0) e a diversidade nucleotídica foi menor em PESRF (0,0) e maior no PNB e PNCG (0,022) (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de diversidade genética por localidade amostrada para o D-Loop e Citocromo B. Número de indivíduos amostrados (N), tamanho do fragmento (pb), número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π). Ver nome das localidades na Tabela 1.

	D-loop						Citocromo B					
	N	pb	S	H	Hd	π	N	pb	S	H	Hd	π
PNB	10	394	54	9	0,978	0,051	5	338	16	4	0,900	0,022
ESECAE	12	394	52	11	0,985	0,049	4	341	12	4	1,000	0,019
AGCV1	12	394	53	11	0,985	0,045	5	336	5	4	0,900	0,007
AGCV2	11	394	45	9	0,964	0,041	5	339	11	4	0,900	0,017
PESRF	12	394	56	11	0,985	0,048	3	339	0	1	0,000	0,000
PNCG	11	394	44	10	0,982	0,041	3	339	11	3	1,000	0,022
PNA	12	394	51	10	0,970	0,042	3	338	1	2	0,667	0,002
PNGSV	12	394	54	11	0,985	0,052	2	341	5	2	1,000	0,015
Total	92	394	94	78	0,996	0,047	30	333	21	13	0,908	0,013

Estrutura genética

Na análise de diferenciação populacional, 9 das 28 comparações par-a-par apresentaram valores de F_{ST} significativos após a correção de B-Y FDR, sendo que a maior parte envolveu comparações com a localidade AGCV2 (Tabela 8). Apesar de significativos, todos os valores de F_{ST} foram muito baixos, variando de -0,004 (entre as localidades PNB e PESRF) à 0,029 (entre AGCV2 e ESECAE).

Tabela 8. Valores de F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) (diagonal inferior) e distância mínima aproximada em quilômetros (diagonal superior) entre os pares de localidades. Valores de diferenciação estatisticamente significativos após a correção pelo método B-Y FDR ($\alpha < 0,013$) estão em negrito. Ver nome das localidades na Tabela 1.

	PNB	ESECAE	AGCV1	AGCV2	PESRF	PNCG	PNA	PNGSV
PNB	–	23	18	10	1291	830	547	200
ESECAE	0,007	–	50	33	1335	873	560	162
AGCV1	-0,002	0,001	–	23	1302	844	583	212
AGCV2	0,013	0,029	0,017	–	1312	852	579	200
PESRF	-0,004	0,006	-0,001	0,019	–	450	1138	1510
PNCG	0,003	0,015	0,005	0,011	-0,003	–	754	1042
PNA	0,001	0,003	-0,001	0,022	-0,001	0,005	–	602
PNGSV	-0,003	0,005	0,001	0,022	0,003	0,014	0,008	–

Não foi possível evidenciar o isolamento por distância pelo teste de Mantel, já que não foi encontrada correlação significativa entre a distância geográfica e a distância genética ($P = 0,590$) (Figura 3a). Mesmo retirando os dados de AGCV2, que apresentou diferença genética significativa em relação à seis das sete localidades estudadas (mesmo que geograficamente próximas (Tabela 8)), a correlação continuou não significativa ($P = 0,299$), entre a distância geográfica e a distância genética (Figura 3B).

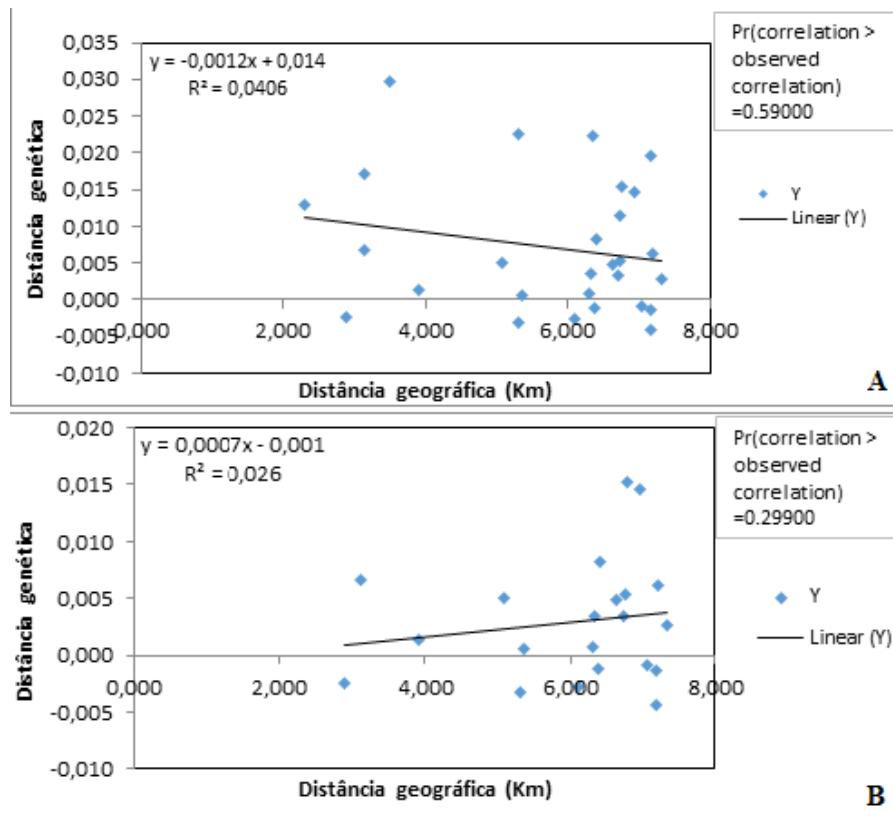


Figura 3. Representação da correlação entre a regressão do F_{ST} linear de Slatikin [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] (distância genética) e do logaritmo da distância geográfica entre todos os pares das localidades (A) e entre os pares de localidades sem AGCV2 (B).

A análise Bayesiana implementada no STRUCTURE indicou a existência de quatro grupos genéticos ($\Delta K = 4$) (Figura 4A), mas sem uma estruturação clara entre os grupos existentes (Figura 4B). Na Figura 5 é possível observar, por meio da probabilidade de afiliação de cada indivíduo, a composição de cada um dos agrupamentos genéticos encontrados. Verifica-se que nos diferentes grupos genéticos estão presentes indivíduos de quase todas as localidades, mostrando assim que não há uma estruturação genética clara entre as populações estudadas.

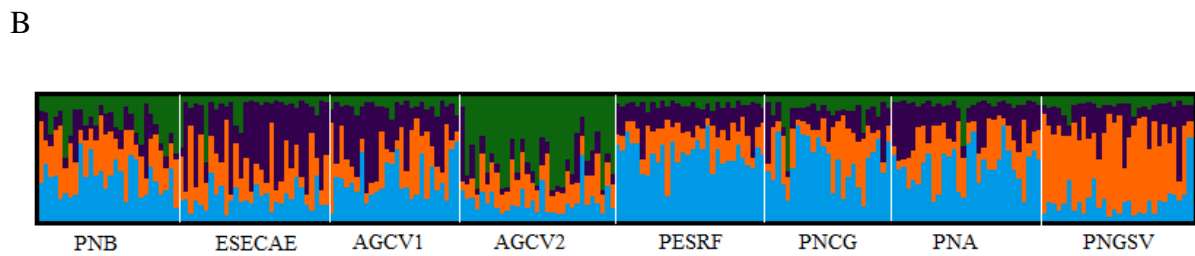
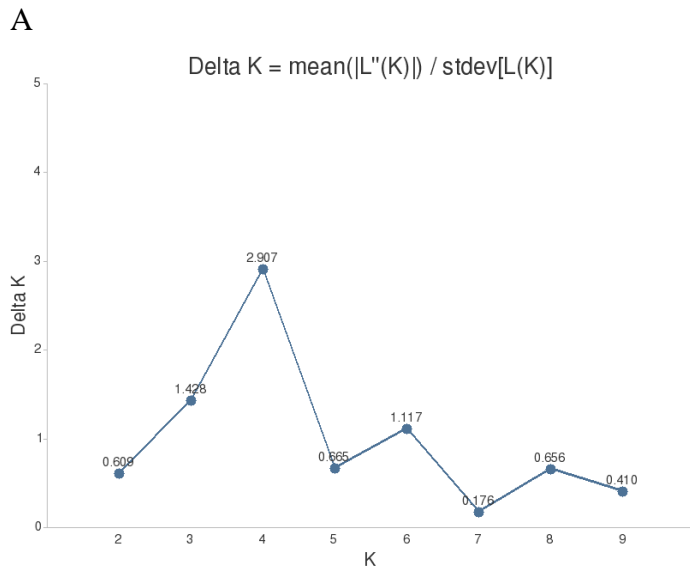


Figura 4. Análise de estrutura genética de acordo com o programa STRUCTURE. Valores de ΔK obtidos de acordo com o método proposto por Evanno (A) e representação gráfica obtida no CLUMPAK dos agrupamentos genéticos inferidos pelo STRUCTURE (B). Ver nome das localidades na Tabela 1.

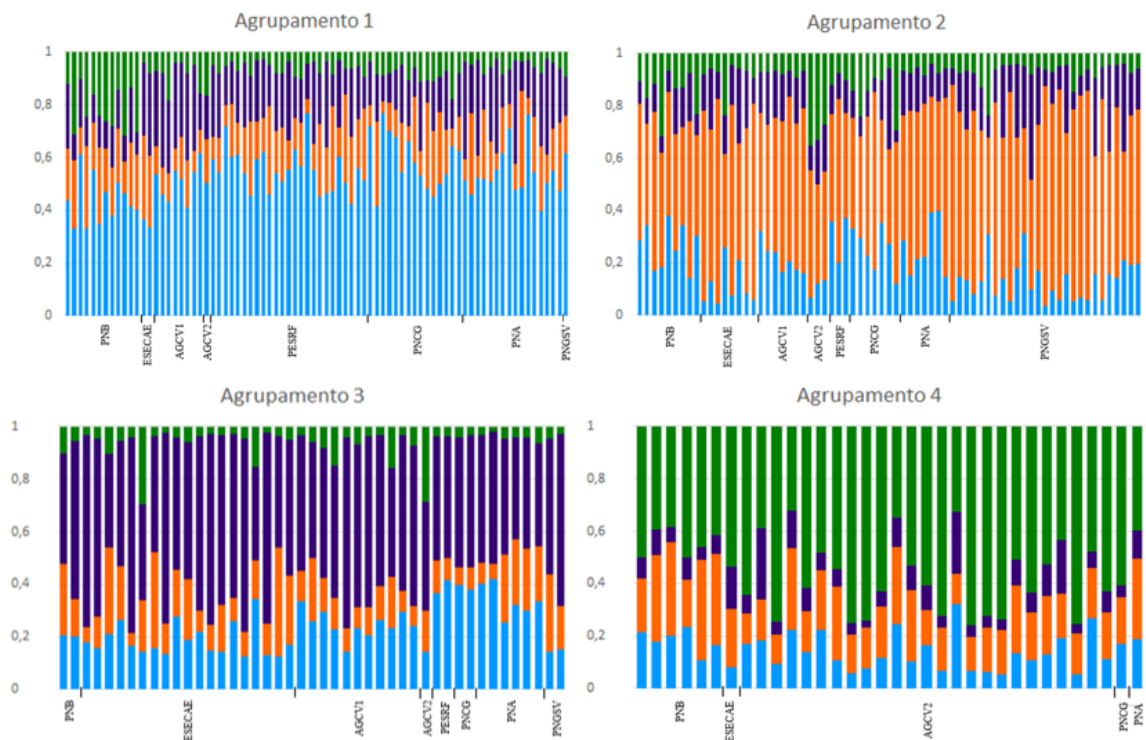
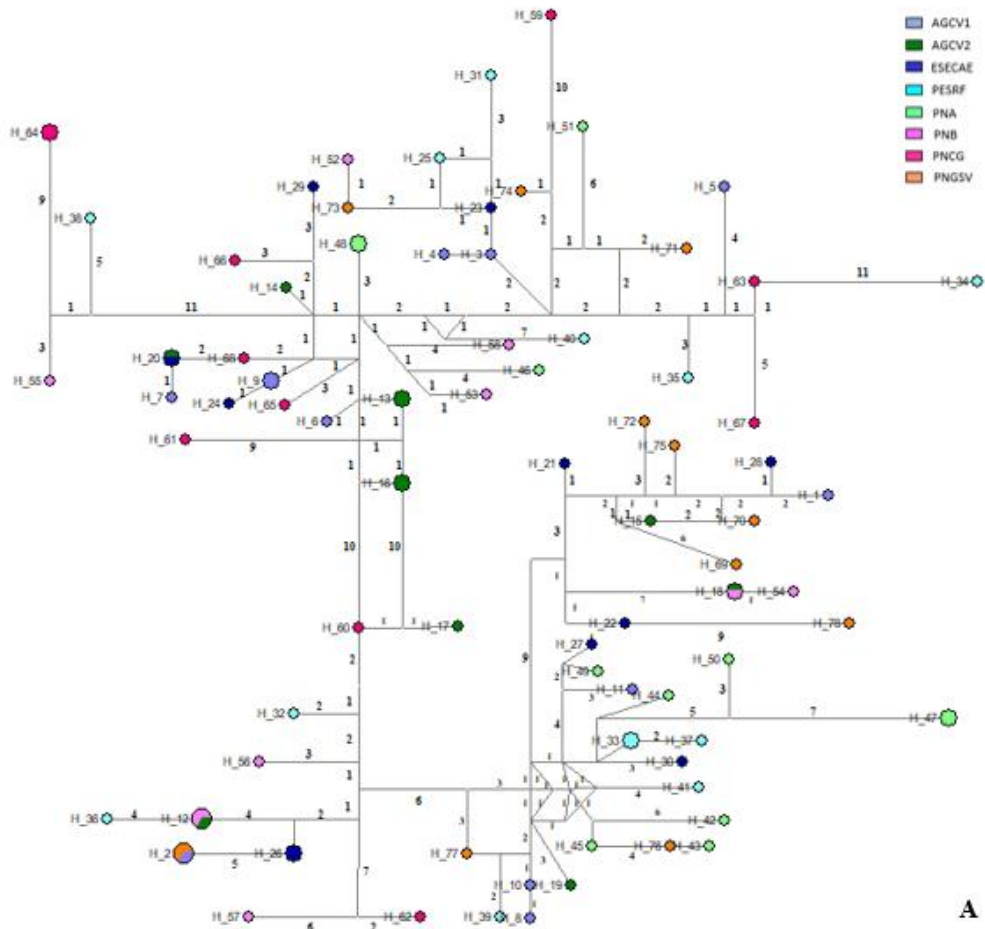


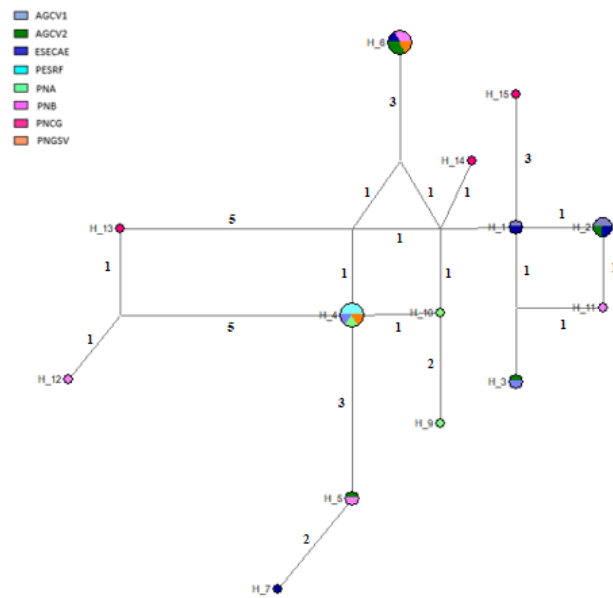
Figura 5. Atribuição de cada indivíduo aos agrupamentos genéticos identificados. Cada coluna representa um indivíduo e cada cor representa a porcentagem de afiliação de cada indivíduo em cada um dos agrupamentos. Para nome das localidades ver Tabela 1.

- **DNA mitocondrial**

As redes de haplótipos tanto do D-loop quanto do citocromo B não indicaram a presença de haplogrupos (Figura 6). Ambas as redes apresentaram compartilhamento de haplótipos entre diferentes localidades e a maioria dos haplótipos estão em baixa frequência. Para o D-loop, o maior número de passos mutacionais foi 11, ocorrendo em mais de um ponto: entre um haplótipo de um indivíduo do PESRF e outro haplótipo do PNCG; e outro entre dois vetores médios que separam indivíduos de várias localidades (Figura 6A). Por outro lado, o maior número de passos mutacionais, na rede de haplótipos do citocromo B, foi cinco, verificado em dois pontos: um entre um haplótipo de um indivíduo do PNCG e um vetor médio que separa indivíduos de outras localidades; e o outro entre um haplótipo compartilhado por indivíduos do PESRF, AGCV1, PNA e PNGSV e um vetor médio que separa um indivíduo do PNB e outro do PNCG (Figura 6B).



A



B

Figura 6. Rede de haplótipos para os marcadores D-loop (A) e citocromo B (B). As cores representam os pontos de coleta. O tamanho dos haplótipos é proporcional ao número de indivíduos que os compartilham e os números entre os haplótipos representam o número de passos mutacionais entre estes. Ver nome das localidades na Tabela 1.

As árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de Máxima Verossimilhança e *Neighbor-Joining* apresentaram resultados semelhantes. Nenhuma delas apresentou estruturação e o suporte estatístico da maioria dos nós foi baixo. As árvores geradas pelo método de Máxima Verossimilhança podem ser observadas na Figura 7 para o marcador D-loop e na Figura 8 para o marcador citocromo B.

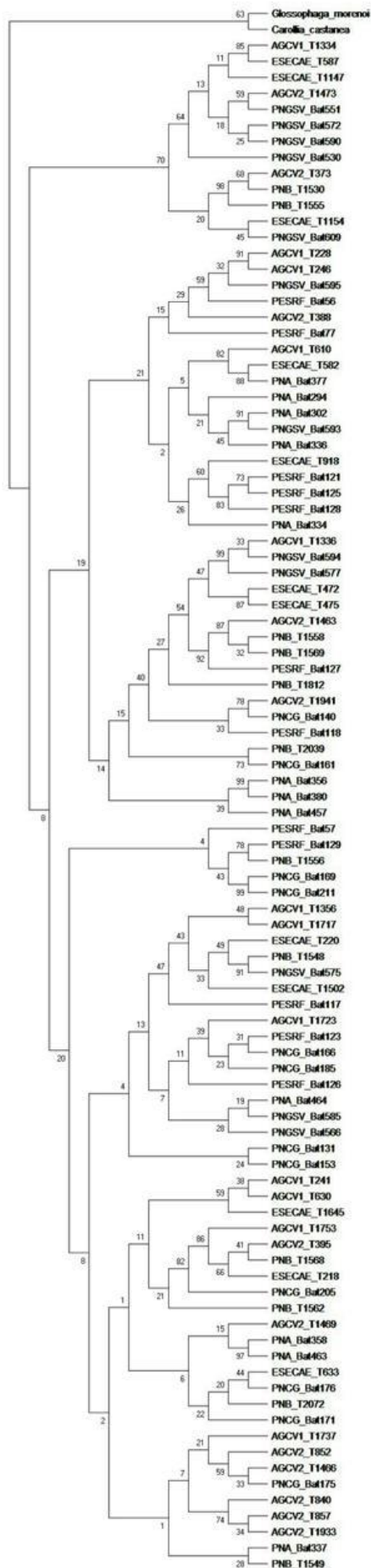


Figura 7. Árvore filogenética obtidas pelo método de máxima verossimilhança para o D-loop. Os valores de suporte estão representados em cada nó. As siglas antes dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta. Ver nome das localidades na Tabela 1.

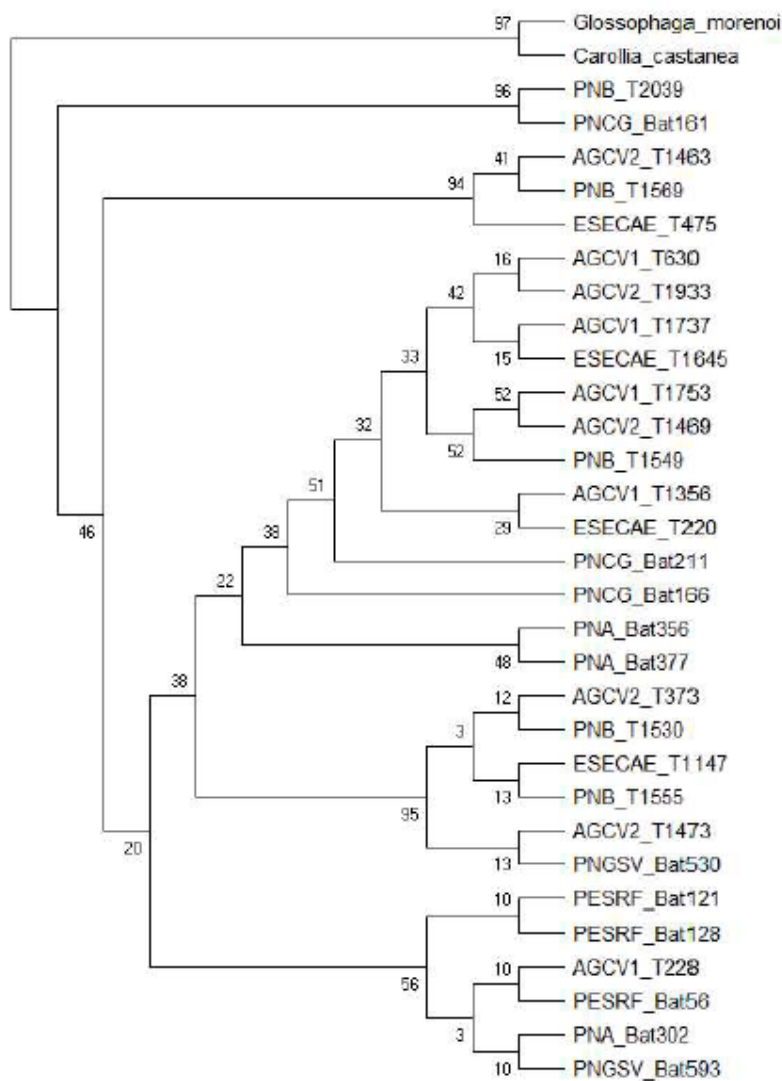


Figura 8. Árvore filogenética obtidas pelo método de máxima verossimilhança para o citocromo B. Os valores de suporte estão representados em cada nó. As siglas antes dos nomes dos indivíduos indicam seus pontos de coleta. Ver nome das localidades na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A alta diversidade genética e a fraca diferenciação encontrada podem sugerir duas possibilidades. Uma delas é que *C. perspicillata* consegue se movimentar fora das Unidades de conservação e manter o fluxo gênico entre suas populações. A outra alternativa é que o tempo desde a fragmentação do Cerrado é muito recente para causar perda de diversidade genética e diferenciação entre as populações.

As análises com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho indicaram a existência de alta diversidade genética nas populações de *C. perspicillata* estudadas. De acordo com Frankham (2002), o número de alelos de microssatélites é tipicamente 5 a 10 para populações grandes, e a heterozigosidade é frequentemente entre 0,6 e 0,8. Em nosso estudo, o número de alelos encontrado nas diferentes populações variou de 8 a 10, e a heterozigosidade variou entre 0,6 e 0,7. Desta forma, a variabilidade genética encontrada para a espécie em estudo foi concordante com o autor. Para os genes mitocondriais, o D-loop se mostrou mais variável do que o citocromo b (apresentando 23,86 e 6,69% sítios variáveis, respectivamente). Além de termos utilizado um maior número de amostras na análise do D-loop, a maior variação encontrada nesse segmento também se deve, provavelmente, ao fato de o D-loop ser o único segmento não codante do DNA mitocondrial animal. Apesar de ser uma região de controle da replicação, esta é uma região com rápida evolução e que acumula uma substituição de bases a uma taxa muito rápida. Apesar dessa diferença, os resultados de diversidade e estruturação genética obtidos com o uso do citocromo b e do D-loop foram semelhantes.

Observamos desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações. O desvio do EHW pode ocorrer quando há alguma força evolutiva atuando sobre a população, como por exemplo a ocorrência de seleção, deriva genética, migração, mutação ou acasalamentos não aleatórios. Analisando nossos dados, observamos níveis significativos de endogamia em todas as localidades amostradas, indicando que acasalamentos não aleatórios possam estar ocorrendo em níveis elevados. Um dos processos que pode levar à ocorrência de endogamia nas populações é a redução no tamanho efetivo populacional devido à fragmentação e alteração do habitat, o que aumenta a probabilidade de acasalamentos entre indivíduos aparentados. Entretanto, conforme indicado pelas análises realizadas com o software Bottleneck, e também pela análise da diversidade genética existente nas diferentes

populações amostradas, as populações aqui estudadas não indicaram redução populacional recente. Uma explicação mais plausível para a endogamia observada é o fato de que *C. perspicillata* vive em colônias onde verificamos a estrutura de haréns. Esses grupos normalmente são formados por 1 macho e 8 ou mais fêmeas, com as fêmeas trocando de haréns em um período de 17 dias (Porter 1979). Mesmo havendo a troca periódica de indivíduos entre os grupos, a reprodução entre os indivíduos da mesma colônia ao longo de várias gerações provavelmente contribui de forma significativa para a ocorrência de endogamia, explicando assim os níveis de endogamia encontrados nas populações amostradas.

Uma diferenciação populacional significativa, baseada no índice F_{ST} , foi encontrada para a maioria das comparações par-a-par realizadas com a localidade AGCV2 ($\alpha < 0,013$), sugerindo restrição de fluxo gênico e o isolamento desta população em relação às demais. Entretanto, esta hipótese parece pouco provável e sem sentido biológico quando observamos que AGCV2 também apresenta-se estatisticamente diferenciada de AGCV1, que se encontra a uma distância relativamente pequena (23 km) dentro da mesma Unidade de Conservação, onde a vegetação nativa continua preservada. Descartando-se a ocorrência de erros durante obtenção dos dados genéticos, a explicação mais plausível para este resultado é a ocorrência de algum viés de amostragem ocorrido durante a captura dos animais, que de alguma forma estaria levando aos resultados aqui observados. Além da diferenciação da população AGCV2 em relação à seis populações, outras três comparações par-a-par apresentaram valores significativos de F_{ST} , resultando em um total de 9 valores significativos em um total de 28 comparações. Apesar de estatisticamente significativos, os valores de F_{ST} encontrados são muito baixos, situando-se entre -0,004 e 0,029. Segundo Balloux & Lugon-Moullin (2002), populações podem ser consideradas diferenciadas quando os valores de F_{ST} estão acima de 0,15. Desta forma, apesar de estatisticamente significativos, os valores aqui encontrados estão

muito abaixo do valor de referência sugerido por esses autores, indicando que a diferenciação genética das populações estudadas é muito baixa.

A falta de estruturação genética clara fica evidente nas redes de haplótipos e árvores filogenéticas obtidas (Figuras 6-8), assim como no resultado da análise Bayesiana. Nesta última análise, apesar do resultado indicar a existência de quatro agrupamentos genéticos (Figura 4), verificamos que não há correspondência entre esses agrupamentos genéticos e a distribuição geográfica dos mesmos, já que em todos os quatro agrupamentos verificamos a presença de indivíduos de quase todas as localidades (Figura 5). Assim, tendo em vista o conjunto de resultados obtidos nas diferentes análises, rejeitamos a hipótese de estruturação genética entre as unidades de conservação, sugerindo a ausência de isolamento populacional e a ocorrência de fluxo gênico entre os fragmentos.

A falta de estruturação genética encontrada neste estudo para *C. perspicillata* contrasta com os estudos de Rossiter et al. (2000) e Meyer et al. (2009), com espécies com baixa capacidade de movimentação (vagilidade), *Rhinolophus ferrumequinum* e *Carollia perspicillata*, que apresentaram baixa diversidade genética e diferenciação significativa entre as populações. Por outro lado, um estudo com resultado similar ao nosso realizado em uma área fragmentada na Costa Rica, imersa em uma matriz agrícola, com *Carollia castanea* não encontrou diferenciação genética significativa entre as áreas e não apresentou correlação entre a diversidade genética e a abundância de *Piper* sp., seu principal alimento (Ripperger et al. 2014). Apesar da baixa capacidade de dispersão de *C. perspicillata*, possuindo baixa competência em voar longas distâncias, se movimentar por uma distância média de apenas 1,63km durante o forrageamento, e se alimentar principalmente de *Piper* sp., a espécie parece não se restringir a locais onde há abundância do fruto, assim como *C. castanea*. Além disso, *C. perspicillata* também pode se alimentar de insetos, néctar e outras frutas como as dos gêneros *Cecropia* e *Solanum* (Heithaus & Fleming 1975, Fleming 1987), podendo compensar

a falta de *Piper* com outros alimentos, o que pode permitir que ela se movimente pelos fragmentos.

Um estudo realizado no Distrito Federal, utilizando radio-tracking, com *Glossophaga soricina* e *Lonchophylla dekeyseri*, em uma área fragmentada, mostrou que ambas espécies são capazes de atravessar áreas perturbadas (pastos e plantações) e alcançar outras áreas de floresta (Aguiar et al. 2014). Nosso estudo, assim como o de Aguiar et al. (2014), mostraram que o tipo de matriz não foi um fator limitante para a dispersão dessas espécies. Por outro lado, um estudo em um sistema insular no Panamá com *C. perspicillata* revelou forte diferenciação genética, mostrando que a espécie não consegue se locomover entre as ilhas imersas em uma matriz aquática (Meyer et al. 2009). Portanto, o tipo de matriz tem impacto no comportamento do voo da espécie. Enquanto *C. perspicillata* foi relutante em atravessar a água, devido ao forte contraste entre a matriz e o habitat da ilha (Meyer et al. 2009), no nosso estudo a matriz parece ser mais permeável por apresentar estruturas diversas, como áreas urbanas, áreas de mata, pastos e plantações. Considerando que esta espécie possui distribuição generalista, podendo ser encontrada em troncos de árvores, galerias e prédios (Fleming 1987, Bonaccorso et al. 2006), estas estruturas podem permitir que os indivíduos se movimentem por curtas distâncias e consigam manter o fluxo gênico entre os fragmentos. Além disso, as espécies de *Piper*, sua principal fonte de alimento, frutificam em diferentes períodos ao longo do ano (Thies & Kalko 2004), o que permite à *C. perspicillata* se mover acompanhando as áreas de mata onde há sua presença. Esta estratégia de “stepping stone” possibilita a dispersão em áreas alteradas, aumentando a conectividade entre os fragmentos.

O resultado do teste de Mantel também foi imprevisto, já que seria esperado que o fluxo gênico diminuiria com o aumento da distância geográfica devido à baixa capacidade de dispersão da espécie. Assim, não foi encontrada correlação significativa entre a distância geográfica e a distância genética ($P = 0,590$), o que corresponde com a falta de estruturação

encontrada. Este resultado também pode ser explicado pela abundância e ampla distribuição da espécie, que provavelmente consegue manter o fluxo gênico por meio da estrutura de *stepping stones* citada acima.

Outro fator que influencia na conectividade dos fragmentos é que as espécies têm capacidades diferentes de se locomover no mesmo ambiente devido a características intrínsecas da espécie. No mesmo estudo realizado por Meyer et al. (2009) também foi avaliada a espécie *Uroderma bilobatum*, que apresentou fraca estruturação, indicando troca de indivíduos entre as ilhas. Outro trabalho, realizado na mesma floresta da Costa Rica, com a espécie *Dermanura watsoni*, encontrou diferenciação significativa entre as populações amostradas (Ripperger et al. 2012).

Assim, as espécies apresentam respostas diferentes ao ambiente. Diferenças na mobilidade de *C. perspicillata* e *U. bilobatum* refletem o tipo principal de dieta. *U. bilobatum* se alimenta principalmente de *Ficus*, que amadurecem de forma assíncrona, precisando assim percorrer longas distâncias em busca de alimento. *C. perspicillata* se alimenta primariamente de *Piper*, um recurso previsível no espaço e no tempo, não precisando se deslocar em demasiado (Meyer et al. 2009). Já *C. castanea* e *D. watsoni* apresentam divergências quanto ao forrageamento: enquanto *C. castanea* consegue forragear dentro e fora da floresta, *D. watsoni* parece ser mais relutante em sair do fragmento (Ripperger et al. 2012, Ripperger et al. 2014). Assim, mesmo que no nosso estudo *C. perspicillata* pareça conseguir manter o fluxo gênico entre os fragmentos, podemos observar que isso depende do tipo de matriz. Portanto, é necessário pensar em estratégias que promovam a conectividade entre os fragmentos, como o estabelecimento de zonas de amortecimento, que minimizam o efeito de borda, e a criação de corredores ecológicos, para a manutenção das espécies a longo prazo. Estas estratégias podem minimizar a mortalidade na matriz e permitir que os indivíduos encontrem um habitat

adequado, proporcionando a manutenção do fluxo gênico e evitando a perda de diversidade genética e da diferenciação genética das populações.

Tendo em vista que a intensificação da fragmentação do Cerrado é relativamente recente, ocorrendo principalmente com a expansão das fronteiras agrícolas a partir da década de 1950 (Klink & Machado 2005), não podemos descartar a hipótese de que a ausência de estruturação genética clara encontrada neste trabalho seja devido à retenção do polimorfismo ancestral existente nas populações devido ao pouco tempo decorrido desde o início da fragmentação do habitat. Desta forma, uma sugestão para estudos futuros seria a condução de experimentos de marcação-recaptura com *C. perspicillata*, o que permitiria avaliar de forma mais precisa a capacidade de deslocamento dessa espécie pela matriz que circunda as unidades de conservação estudadas. A associação entre estudos de ecologia populacional e as análises genéticas aqui apresentadas poderão, desta forma, fornecer um quadro mais preciso sobre os efeitos da destruição e fragmentação do Cerrado sobre *C. perspicillata*, permitindo assim a tomada de medidas de conservação mais efetivas para esta e outras espécies existentes neste bioma.

CONCLUSÃO

A alta diversidade genética e a ausência de estruturação genética sugerem que os indivíduos conseguem manter o fluxo gênico entre as unidades de conservação. Apesar da alta diversidade genética observada foram encontrados níveis significativos de endogamia, estes parecem estar relacionados com a forma gregária que os indivíduos vivem nas colônias e a formação de haréns. A falta de diferenciação genética encontrada sugere que a matriz ainda fornece os recursos e estruturas necessárias para que os indivíduos se movimentem por curtas distâncias (*stepping stone*) e consigam manter o fluxo gênico entre as áreas de proteção.

Outra possibilidade é que o tempo desde a fragmentação do Cerrado não foi suficiente para causar perda de diversidade genética e diferenciar as populações. Desta forma, estudos futuros são necessários para averiguar de forma mais precisa se a espécie consegue se locomover pela matriz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, L.M.S., Bernard, E., & Machado, R.B. 2014. Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Neotropical savannah. *Zoologia*, 31(3): 223–229.
- Avise, J.C., Arnold, J., Martin Bale, R., Berminghamf, E., Lamb, T., Neigell, J.E., Reebl, C.A., & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18:489-522.
- Awade, M., Candia-Gallardo, C., Cornelius, C., & Metzger, J. P. 2017. High Emigration Propensity and Low Mortality on Transfer Drives Female-Biased Dispersal of *Pyrgilena leucoptera* in Fragmented Landscapes. *Plos One*, 12(1): 1–22.
- Balloux, F., & Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 11: 155–165.
- Bandelt, H.J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16: 37–48.
- Bardeleben, C., Campbell, P., Lara, M., & Moore, R.L. 2007. Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the silky short-tailed bat *Carollia brevicauda*. *Molecular Ecology Notes*, 7:63-65.

- Bates, J.M., Tello, J.G., & Silva, J.M.C. 2003. Initial assessment of genetic diversity in ten bird species of South American Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 38: 87–94.
- Benjamini Y., & Yekutieli D. 2001. The control of false Discovery rate under dependency. *Annual of Statistics*, 29, 1165-1188.
- Bonaccorso, F.J., Winkelmann, J.R., Shin, D., Agrawal, C.I., Aslami, N., Bonney, C., Hsu, A., Jekielek, P.E., Knox, A.K., Kopach, S.J., Jennings, T.D., Lasky, J.R., Menesale, S.A., Richards, J.H., Rutland, J.A., Sessa, A.K., Zhaurova, L., & Kunz, T.H. 2006. Evidence for Exploitative Competition: Comparative Foraging Behavior and Roosting Ecology of Short-Tailed Fruit Bats (Phyllostomidae). *Biotropica*, 39(2): 249–256.
- Cleary, K.A., Waits, L.P., & Hohenlohe, P.A. 2016. Development and characterization of fourteen novel microsatellite markers for the chestnut short-tailed fruit bat (*Carollia castanea*), and cross-amplification to related species. *PeerJ*.
- Cornelius, C., Awade, M., Candia-Gallardo, C., Sieving, K. E., & Metzger, J. P. 2017. Habitat fragmentation drives inter-population variation in dispersal behavior in a Neotropical rainforest Bird. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15: 3–9.
- Cornuet, J.M., & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Dempster, A., Laird, N., & Rubin, D. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Society: Series B*, 39: 1-38.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

- Earl, D. A., & vonHoldt, B.M. 2012. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.
- Excoffier, L., & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–7.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Ecol. Evol. Syst.* 34: 487–515.
- Fleming, T.H., Hooper, E.T. & Wilson, D.E. 1972. Three Central American Bat Communities: Structure, Reproductive Cycles, and Movement Patterns. *Ecology*, 53(4): 556-569.
- Fleming, T.H. & Heithaus, E.R. 1986. Seasonal foraging behavior of the frugivorous bat *carollia perspicillata*. *Journal of Mammalogy*, 67(4): 660-671.
- Fleming, T.H. 1987. Fruit Bats: Prime Movers of Tropical Seeds. 5(3).
- Fleming, T.H. 1988. The short-tailed fruit bat: A study in plant-animal interactions. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Lausanne University, Lausanne, Switzerland.

- Goulart, F.F., Takahashi, F.S.C., Rodrigues, M., Machado, R.B., Soares-Filho, B. 2015. Where matrix quality most matters? Using connectivity models to assess effectiveness of matrix conversion in the Atlantic Forest. *Natureza & Conservação*, 13: 47–53.
- Guo, S., & Thompson, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., Lovejoy, T.E., Sexton, J.O., Austin, M.P., Collins, C.D., Cook, W.M., Damschen, E.I., Ewers, R.M., Foster, B.L., Jenkins, C.N., King, A.J., Laurance, W.F., Levey, D.J., Margules, C.R., Melbourne, B.A., Nicholls, A.O., Orrock, J.L., Song, D.-X., & Townshend, J.R. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.*, 1: 1–9.
- Heithaus, E.R., Fleming, T.H., & Opler, P.A. 1975. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. *Ecology*. 56:841-854.
- Heithaus, E. R.; Fleming, T. H. 1978. Foraging movements of a frugivorous bat, *Carollia perspicillata* (Phyllostomatidae). *Ecological Monographs* 48: 127-143.
- Hilton-Taylor, C. 2004. 2004 IUCN red list of threatened species. Species Survival Commission (SSC), IUCN – The World Conservation Union, Cambridge, Reino Unido e Gland, Suíça. Disponível em <http://www.redlist.org>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software

- platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 28(12): 1647–1649.
- Klink, C.A., & Machado, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147–155.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., & Mayrose, I. 2015. Clumak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15:1179-1191.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., & Fleming, T.H. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1): 1-38.
- Librado, P., & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Lim, B.K., Engstrom, M.D., Bickham J.W. & Patton, J.C. 2008. Molecular phylogeny of New World sheath-tailed bats (Emballonuridae: Diclidurini) based on loci from the four genetic transmission systems in mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 189–209.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P., Caldas, E., Gonçalves, D., Santos, N., Tabor, K., & Steininger, M. 2004a. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservation International do Brasil, Brasília*.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Harris, M.B., Lourival, R., & Aguiar, L.M.S. 2004b. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no Cerrado. In: *Anais IV Congresso*

- Brasileiro de Unidades de Conservação. pp. 29-38. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Brasil.
- Martins, F.M., Ditchfield, A.D., Meyer, D. & Morgante, J.S. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) *J Zool Syst Evol Res*, 45(4): 372–378.
- McCulloch, E.S., & Stevens, R.D. 2011. Rapid development and screening of microsatellite loci for *Artibeus lituratus* and their utility for six related species within Phyllostomidae. *Molecular Ecology Resources*, 11: 903-913.
- Meyer, C.F.J., Kalko, E.K.V., & Kerth, G. 2009. Small-Scale Fragmentation Effects on Local Genetic Diversity in Two Phyllostomid Bats with Different Dispersal Abilities in Panama. *Biotropica*, 41(1): 95–102.
- Ministério do Meio Ambiente. 2016. Áreas protegidas. Cadastro Nacional de UCs. Mapas. Mapa do SNUC. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastro-nacional-de-ucs/mapas>. Acesso em 15 de junho de 2017.
- Mittermier, R.A., Myers, N., & Mittermier, C.G. 2002. Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. *Journal of Mammalogy*, 83(2): 630-633.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853–858.
- Peakall, R., & Smouse, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pires, A.S., Lira, P.K., Fernandez, F.A.S., Schittini, G.M., & Oliveira, L.C. 2002. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, 108: 229–237.

- Piry, S, Luikart G, Cornuet J. M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.
- Porter, F.L. 1979. Social Behavior in the Leaf-Nosed Bat, *Carollia perspicillata*. *Z. Tierpsychol.*, 49: 406-417.
- Porter, F.L. 1983. Social behavior and allozyme variation in a captive Colony of *carollia perspicillata*. *Journal of mammalogy*. 64(2): 295-298.
- Prado, C.P.A., Haddad, C.F.B., & Zamudio, K.R. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular Ecology*, 21: 921–941.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Racey, P.A., & Entwistle, A.C. 2003. Conservation ecology of bats. In T. H.Kunz & M.B. Fenton (Eds.). *Bat ecology*, 680–743. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Ripperger, S.P., Tschapka, M., Kalko, E.K.V., Rodríguez-Herrera, B., & Mayer, F. 2012. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conserv Genet.*, 14: 925–934.
- Ripperger, S.P., Tschapka, M., Kalko, E.K.V., Rodríguez-Herrera, B. & Mayer, F. 2014. Resisting habitat fragmentation: High genetic connectivity among populations of the frugivorous bat *Carollia castanea* in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 185: 9–15.
- Rossiter, S.J., Jones, G., Ransome, R.D., & Barratt, E.M. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinu*. *Molecular Ecology*, 9: 1131–1135.

- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Sambrook, J., & Russel, D. 2006. *The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S., & Ferreira, L.G. 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166: 113–124.
- Santos, M.G., Nogueira, C., Giugliano, L.G., & Colli, G.R. 2014. Landscape evolution and phylogeography of *Micrablepharus atticolus* (Squamata, Gymnophthalmidae), an endemic lizard of the Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, 41: 1506–1519.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6): 365–371.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18.
- Selkoe, K.A., & Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5): 615–629.
- Silva, J.M.C., & Bates, J. M. 2002. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. *Bioscience*, 52(3): 225-233.
- Telles, M.P.D.C., Diniz-Filho, J.A.F., Bastos, R.P., Soares, T.N., Guimarães, L.D.A., & Lima, L. 2007. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biological Conservation*, 139: 37–46.

- Thies, W., & Kalko, E.K.V. 2004. Phenology of neotropical pepper plants (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two short-tailed fruit bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea* (Phyllostomidae). *Oikos*, 104: 362–376.
- Tischendorf, L., Bender, D. J., & Fahrig, L. 2003. Evaluation of patch isolation metrics in mosaic landscapes for specialist vs. generalist dispersers. *Landscape Ecology*, 18: 41–50.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., & Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Vonhof, M.J., Strobeck, C., & Fenton, M.B. 2008. Genetic variation and population structure in big brown bats (*Eptesicus fuscus*): is female dispersal important? *Journal of Mammalogy*, 89(6): 1411-1419.
- Weir, B.S., & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wilkinson, G.S., & Chapman, A. 1991. Length and sequence variation in evening bat D-loop mt DNA. *Genetics*, 128: 607–617.
- Wilkinson, G.S. & Fleming, T.H. 1996. Migration and evolution of lesser longnosed bats *Lepfonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 5: 329-339.
- Wilkinson, G.S., Mayer, F., Kerth, G., & Petri, B. 1997. Evolution of repeated sequence arrays in the D-loop region of bat mtDNA. *Genetics*, 146: 1035–1048.

ANEXOS

Anexo 1. Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) por *locus* por localidade. *Ho*: Heterozigosidade observada; *He*: Heterozigosidade esperada; *P*: valor de *P* para o teste exato de Guo and Thompson (1992); *r*: frequência de alelos nulos. Ver nome das localidades na Tabela 1.

Locus		PNB	ESECAE	AGCV1	AGCV2	PESRF	PNCG	PNA	PNGSV
AAGG-7	<i>Ho</i>	0,793	0,667	0,615	0,567	0,900	0,480	0,533	0,667
	<i>He</i>	0,784	0,738	0,649	0,616	0,800	0,770	0,794	0,731
	<i>P</i>	0,488	0,072	0,306	0,011	0,330	0,000	0,001	0,059
	<i>r</i>	0,000	0,057	0,000	0,046	0,000	0,137	0,132	0,046
AAGG-91	<i>Ho</i>	0,786	0,679	0,524	0,375	0,800	0,647	0,536	0,538
	<i>He</i>	0,777	0,629	0,714	0,795	0,783	0,797	0,701	0,716
	<i>P</i>	0,621	0,229	0,012	0,000	0,430	0,050	0,002	0,010
	<i>r</i>	0,000	0,021	0,138	0,234	0,000	0,062	0,133	0,105
AAGG-112	<i>Ho</i>	0,759	0,833	0,846	0,767	0,767	0,840	0,800	0,767
	<i>He</i>	0,837	0,855	0,870	0,724	0,824	0,825	0,824	0,806
	<i>P</i>	0,417	0,241	0,233	0,315	0,016	0,677	0,293	0,968
	<i>r</i>	0,016	0,004	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
AAGG-117	<i>Ho</i>	0,552	0,800	0,808	0,733	0,767	0,417	0,690	0,567
	<i>He</i>	0,835	0,858	0,902	0,875	0,886	0,881	0,898	0,819
	<i>P</i>	0,003	0,070	0,050	0,015	0,038	0,000	0,023	0,001
	<i>r</i>	0,147	0,086	0,047	0,073	0,119	0,238	0,165	0,135
AAGG-119	<i>Ho</i>	0,793	0,567	0,538	0,767	0,733	0,792	0,567	0,500
	<i>He</i>	0,858	0,855	0,824	0,763	0,808	0,834	0,805	0,788
	<i>P</i>	0,221	0,000	0,005	0,066	0,005	0,531	0,016	0,004
	<i>r</i>	0,052	0,157	0,141	0,026	0,065	0,008	0,127	0,155
AAGG-143	<i>Ho</i>	0,429	0,533	0,423	0,600	0,500	0,760	0,467	0,467
	<i>He</i>	0,519	0,517	0,494	0,666	0,558	0,620	0,463	0,560
	<i>P</i>	0,182	0,467	0,054	0,356	0,640	0,657	0,108	0,152
	<i>r</i>	0,046	0,000	0,066	0,050	0,047	0,000	0,000	0,066
AL2_18713	<i>Ho</i>	0,276	0,300	0,154	0,467	0,310	0,280	0,379	0,267
	<i>He</i>	0,812	0,682	0,554	0,753	0,742	0,696	0,790	0,781
	<i>P</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>r</i>	0,294	0,228	0,257	0,188	0,247	0,249	0,255	0,283
CC-10	<i>Ho</i>	0,483	0,667	0,720	0,667	0,690	0,600	0,800	0,667
	<i>He</i>	0,782	0,828	0,799	0,735	0,800	0,812	0,818	0,814
	<i>P</i>	0,006	0,006	0,555	0,519	0,742	0,019	0,020	0,474
	<i>r</i>	0,164	0,087	0,024	0,031	0,049	0,115	0,029	0,087
CC-25	<i>Ho</i>	0,310	0,214	0,400	0,367	0,241	0,304	0,333	0,357
	<i>He</i>	0,695	0,669	0,664	0,593	0,756	0,660	0,706	0,705
	<i>P</i>	0,000	0,000	0,001	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>r</i>	0,222	0,269	0,143	0,132	0,313	0,243	0,216	0,209
AL2-25522	<i>Ho</i>	0,724	0,667	0,680	0,655	0,567	0,667	0,767	0,621
	<i>He</i>	0,876	0,906	0,832	0,847	0,866	0,845	0,867	0,869
	<i>P</i>	0,023	0,007	0,064	0,016	0,001	0,120	0,008	0,001
	<i>r</i>	0,085	0,131	0,039	0,098	0,167	0,102	0,052	0,159

Em negrito, valores significativos igual ou abaixo de 0,01.

Anexo 2. Diversidade genética nos 8 *loci* de microssatélites nas 8 localidades amostradas. Número de indivíduos amostrados (N), número de alelos observados (A), riqueza alélica (RA), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}), valor de significância de F_{IS} (P). Em negrito, valores significativos à 1% após correção pelo método de B-Y FDR ($\alpha < 0,0035$).

Parque Nacional de Brasília									Parque Estadual Serra de Ricardo Franco								
<i>Locus</i>	N	A	RA	Ho	He	Fis	P	r	<i>Locus</i>	N	A	RA	Ho	He	Fis	P	r
AAGG-7	29	10	8,642	0,793	0,784	-0,012	0,648	0,000	AAGG-7	30	10	8,538	0,900	0,800	-0,127	0,970	0,000
AAGG-91	28	11	9,101	0,786	0,777	-0,011	0,653	0,000	AAGG-91	25	10	9,229	0,800	0,783	-0,022	0,710	0,000
AAGG-112	29	10	8,903	0,759	0,837	0,095	0,156	0,016	AAGG-112	30	11	9,038	0,767	0,824	0,070	0,243	0,000
AAGG-117	29	10	8,500	0,552	0,835	0,344	0,00	0,147	AAGG-117	30	11	10,199	0,767	0,886	0,137	0,035	0,119
AAGG-119	29	11	9,840	0,793	0,858	0,077	0,195	0,052	AAGG-119	30	10	8,050	0,733	0,808	0,094	0,196	0,065
AAGG-143	28	6	5,381	0,429	0,519	0,177	0,117	0,046	AAGG-143	30	8	6,241	0,500	0,558	0,106	0,227	0,047
CC-10	29	6	5,580	0,483	0,782	0,387	0,001	0,164	CC-10	29	8	6,939	0,690	0,800	0,140	0,093	0,049
AL2-25522	29	10	9,062	0,724	0,876	0,176	0,013	0,085	AL2-25522	30	12	9,945	0,567	0,866	0,350	0,001	0,167
Média		9,3	8,126	0,665	0,784	0,154	0,001	0,064	Média		10	8,522	0,715	0,791	0,097	0,001	0,056

Estação Ecológica de Águas Emendadas									Parque Nacional da Chapada dos Guimarães								
<i>Locus</i>	N	A	RA	Ho	He	Fis	P	r	<i>Locus</i>	N	A	RA	Ho	He	Fis	P	r
AAGG-7	30	9	7,052	0,667	0,738	0,098	0,208	0,057	AAGG-7	25	9	8,107	0,480	0,770	0,381	0,002	0,137
AAGG-91	28	9	7,459	0,679	0,629	-0,080	0,861	0,021	AAGG-91	17	9	9,000	0,647	0,797	0,193	0,085	0,062
AAGG-112	30	9	8,332	0,833	0,855	0,026	0,440	0,004	AAGG-112	25	9	8,229	0,840	0,825	-0,018	0,662	0,000
AAGG-117	30	12	10,450	0,800	0,858	0,069	0,237	0,086	AAGG-117	24	10	9,254	0,417	0,881	0,533	0,001	0,238
AAGG-119	30	11	9,351	0,567	0,855	0,341	0,001	0,157	AAGG-119	24	9	8,175	0,792	0,834	0,052	0,396	0,008
AAGG-143	30	6	5,570	0,533	0,517	-0,032	0,722	0,000	AAGG-143	25	6	5,324	0,760	0,620	-0,231	0,988	0,000
CC-10	30	9	7,638	0,667	0,828	0,197	0,022	0,087	CC-10	25	7	6,796	0,600	0,812	0,265	0,007	0,115
AL2-25522	30	11	10,354	0,667	0,906	0,267	0,001	0,131	AL2-25522	24	10	9,152	0,667	0,845	0,215	0,015	0,102
Média		9,5	8,276	0,676	0,773	0,127	0,001	0,068	Média		8,6	8,005	0,650	0,798	0,189	0,001	0,083

Área de Proteção Ambiental das bacias do Gama e Cabeça-de-Veado 1

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
AAGG-7	26	7	6,155	0,615	0,649	0,052	0,415	0,000
AAGG-91	21	11	10,130	0,524	0,714	0,272	0,009	0,138
AAGG-112	26	10	9,180	0,846	0,870	0,027	0,451	0,009
AAGG-117	26	13	11,808	0,808	0,902	0,106	0,106	0,047
AAGG-119	26	9	8,039	0,538	0,824	0,351	0,001	0,141
AAGG-143	26	4	3,960	0,423	0,494	0,146	0,218	0,066
CC-10	25	7	6,331	0,720	0,799	0,101	0,214	0,024
AL2-25522	25	11	9,874	0,680	0,832	0,186	0,026	0,039
Média		9	8,185	0,644	0,760	0,155	0,001	0,058

Parque Nacional do Araguaia

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
AAGG-7	30	12	9,919	0,533	0,794	0,332	0,002	0,132
AAGG-91	28	11	8,709	0,536	0,701	0,239	0,011	0,133
AAGG-112	30	11	9,550	0,800	0,824	0,030	0,436	0,000
AAGG-117	29	13	11,383	0,690	0,898	0,235	0,001	0,165
AAGG-119	30	10	8,546	0,567	0,805	0,299	0,001	0,127
AAGG-143	30	4	3,938	0,467	0,463	-0,009	0,605	0,000
CC-10	30	7	6,485	0,800	0,818	0,022	0,473	0,029
AL2-25522	30	9	8,364	0,767	0,867	0,117	0,078	0,052
Média		9,6	8,362	0,645	0,771	0,166	0,001	0,080

Área de Proteção Ambiental das bacias do Gama e Cabeça-de-Veado 2

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
AAGG-7	30	10	7,704	0,567	0,616	0,082	0,281	0,046
AAGG-91	24	9	8,288	0,375	0,795	0,534	0,001	0,234
AAGG-112	30	9	7,233	0,767	0,724	-0,060	0,821	0,000
AAGG-117	30	10	8,912	0,733	0,875	0,164	0,016	0,073
AAGG-119	30	8	6,690	0,767	0,763	-0,005	0,606	0,026
AAGG-143	30	6	5,295	0,600	0,666	0,100	0,263	0,050
CC-10	30	6	5,531	0,667	0,735	0,094	0,224	0,031
AL2-25522	29	9	8,424	0,655	0,847	0,230	0,004	0,098
Média		8,4	7,260	0,641	0,753	0,150	0,001	0,070

Parque Nacional do Grande Sertão Veredas

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>RA</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
AAGG-7	30	8	7,011	0,667	0,731	0,089	0,223	0,046
AAGG-91	26	7	5,925	0,538	0,716	0,251	0,039	0,105
AAGG-112	30	11	9,247	0,767	0,806	0,050	0,345	0,001
AAGG-117	30	10	8,609	0,567	0,819	0,311	0,002	0,135
AAGG-119	30	7	6,698	0,500	0,788	0,369	0,001	0,155
AAGG-143	30	7	6,160	0,467	0,560	0,169	0,084	0,066
CC-10	30	7	6,382	0,667	0,814	0,184	0,032	0,087
AL2-25522	29	11	9,928	0,621	0,869	0,290	0,001	0,159
Média		8,5	7,495	0,599	0,763	0,218	0,001	0,095

