



Instituto de Biologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera,  
Vespertilionidae): uma abordagem integrativa a partir de dados genéticos,  
morfológicos e ecológicos**

Roberto Leonan Morim Novaes

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Weksler

Rio de Janeiro

2017



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva  
Instituto de Biologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): uma abordagem integrativa a partir de dados genéticos, morfológicos e ecológicos**

**Roberto Leonan Morim Novaes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientador: Dr. Ricardo Moratelli M. da Rocha

Co-orientador: Dr. Marcelo Weksler

Rio de Janeiro

Agosto de 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP – Catalogação na Publicação

N935e Novaes, Roberto Leonan Morim.  
Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): uma abordagem a partir de dados genéticos, morfológicos e ecológicos / Roberto Leonan Morim Novaes. – Rio de Janeiro, 2017.  
xi + 79 f. : il. (color.).

Orientador: Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha  
Coorientador: Marcelo Weksler  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2017.

1. Myotinae. 2. Taxonomia. 3. Morfometria multivariada. 4. Genética de populações. 5. Distribuição geográfica. I. Moratelli, Ricardo. II Weksler, Marcelo. III. Título.

**Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): uma abordagem integrativa a partir de dados genéticos, morfológicos e ecológicos**

Roberto Leonan Morim Novaes

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Weksler

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. João Alves de Oliveira

---

Profa. Dra. Lena Geise

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Nogueira

---

Profa. Dra. Cláudia de Moraes Russo

Rio de Janeiro

Agosto de 2017

## AGRADECIMENTOS

Meu percurso dentro da ciência foi quase sempre sobre estradas ásperas e escuras, e por muitas e muitas vezes a perseverança estava prestes a falhar se não fosse por um conjunto especial de pessoas que sempre me empurraram para frente. À essas pessoas, citadas abaixo, a minha mais profunda gratidão e respeito.

Agradeço primeiramente a minha esposa e eterna namorada, Mariana Rabello, pelos anos de dedicação e paciência que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente, sempre com uma ameaçadora e carinhosa palavra de incentivo. Essa titulação também é dela.

Se não fosse o forte arcabouço dado pela minha família, eu não teria tido a vontade e a possibilidade de ir além nos meus estudos. Às minhas mães Laurinda Morim e Maria Morim, minhas irmãs Fabiane e Laura Morim, meu pai Mauro Novaes, meus tios-pais Adelino Morim e Amauri Sperle, minha mãe-emprestada Regina Ramalho, meus sogros e também pais adotivos Denise Rabello e Luiz Antônio Vaz. À vocês, dedico essa dissertação.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Ricardo Moratelli e Marcelo Weksler pela confiança depositada em mim, pela contribuição para a minha formação, por estimular a manter sempre um pensamento crítico e uma conduta honesta dentro da ciência. Sou muito grato também a Marcelo Weber, o terceiro orientador deste trabalho, a quem devo todo aprendizado sobre os modelos de distribuição.

Agradeço também à Luciana de Moraes Costa, Rafael de Souza Laurindo e Renato Gregorin pela concessão de amostras de tecido para análise molecular e empréstimo de espécimes para análise morfológica. Agradeço à Daniela Dias pela ajuda no acesso ao material depositado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da UFRJ, seus professores e o secretário Héber Araújo, por permanecerem presentes e dispostos a ajudar em todas as etapas desse curso. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado. A banca avaliadora por ter aceitado a árdua e valiosa missão de corrigir meus erros e contribuir na melhoria dessa dissertação.

Agradeço aos amigos e companheiros de ciência da Fiocruz (Fernanda Alves, André Queiroz, Jonatas Amorim, Fernanda Dutra) e do Museu Nacional (Aldo Caccavo, Ana Cristina Pantaleão, Marcos Cruz, Gabriella Jacob, Samantha Palhano, Laís Ortiz, Felipe Gudinho, Carolina Pires) pela ajuda em diversas etapas desse projeto e por todas as discussões que incontáveis vezes trouxeram luz para o meu aprendizado. Agradeço também aos amigos de ciência que tantas vezes dividiram as dores e delícias das aulas, do campo, bancada e boteco: Brunna Almeida, Bruno Alves, Diana Rangel, Leonardo Cotts, Kelly Vidal, Fernando Salgado e Máira Laêta.

Há uma década atrás eu me juntei a uma equipe de biólogos que, além de serem meus pilares na ciência, se tornaram uma família no qual eu tenho uma profunda amizade e admiração. À Renan Souza, Saulo Felix, André Siqueira, Carlos Eduardo Santos, Rafael Laurindo e Mariana Aguiar, meu mais profundo agradecimento por tantos anos de aprendizado e alegria.

*“Todos os animais são iguais, mas alguns  
animais são mais iguais do que outros.”*

**George Orwell**

A Revolução dos Bichos (1946)

## RESUMO

### **Estruturação populacional de *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): uma abordagem integrativa a partir de dados genéticos, morfológicos e ecológicos**

Roberto Leonan Morim Novaes

#### ***Orientadores:***

Ricardo Moratelli M. da Rocha e Marcelo Weksler

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

*Myotis riparius* é uma espécie insetívora de ampla distribuição na região Neotropical e apresenta marcada variação geográfica em relação à coloração da pelagem e caracteres crânio-dentários, podendo representar um complexo de espécies. Nesse cenário, realizamos um estudo integrado—utilizando abordagens genéticas, morfológicas e ecológicas—para investigar a estruturação populacional e o limite taxonômico de *Myotis riparius*. A decisão taxonômica baseou-se na congruência entre os resultados de análises filogenéticas, filogeográficas e morfológicas qualitativas e quantitativas, assim como em modelagens da distribuição geográfica atual e passada. As reconstruções filogenéticas e filogeográficas indicaram que *M. riparius* é um grupo monofilético com tendência à estruturação geográfica, embora não apresente monofiletismo recíproco para os conjuntos populacionais testados. As variações morfológica e morfométrica revelaram sutil distinção dos grupos da Mata Atlântica e Cone Sul em relação aqueles da Amazônia e América Central. Os modelos de distribuição geográfica indicaram que *M. riparius* está associada a ambientes florestais, havendo uma descontinuidade entre as populações do norte e do sul da América do Sul. A modelagem de distribuição passada, entretanto, indicou que *M. riparius* possuía uma área de alta adequabilidade ambiental maior do que a atual durante o último máximo glacial (ca. 22 mil anos). Os resultados dessas modelagens e das análises genéticas indicam que *M. riparius* possuía uma grande população em panmixia até o Pleistoceno tardio, quando mudanças climáticas fragmentaram e isolaram as populações. Contudo, análises de variância molecular não indicam uma clara interrupção no fluxo gênico. Com base nas evidências obtidas, concluímos que *M. riparius* é uma única espécie. Apesar da sutil tendência à estruturação geográfica de suas populações, ainda não é possível definir se a espécie é ou não monotípica.

**Palavras-chave:** Filogenia, modelagem de distribuição geográfica, morcegos, morfometria multivariada, Myotinae, Região Neotropical, taxonomia.

## ABSTRACT

### **Population structure of *Myotis riparius* (Chiroptera, Vespertilionidae): an integrative approach based on genetic, morphological, and ecological data**

Roberto Leonan Morim Novaes

#### *Advisors:*

Ricardo Moratelli M. da Rocha and Marcelo Weksler

Abstract of the Master thesis submitted to Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), as part of the requirements to obtain the title of the Master in Biodiversity and Evolutionary Biology.

*Myotis riparius* is an insectivorous species widely distributed in the Neotropics. The species has a well-marked geographic variation in regard to pelage color and cranial features, which might indicate to be composite. In this scenario, we performed a multiple evidence study—using genetic, morphological and ecological approaches—to investigate population structure and species limits for *M. riparius*. In this context, the taxonomic decision was supported by information retrieved from the phylogenetic, phylogeographic, qualitative and quantitative morphological analyses, and current and past distribution modeling. Phylogenetic and phylogeographic reconstructions retrieved *M. riparius* as monophyletic, with a trend towards geographic structuring, but without reciprocal monophyly between groups. In the morphological and morphometric analyses, Atlantic Forest and Southern Cone groups were retrieved as distinct from those from Amazonia and Mesoamerica. The geographic distribution modeling indicates that *M. riparius* is associated with forests, with a discontinuity between northern and southern populations. Past distribution modeling, however, indicate that *M. riparius* had a wider high environmental suitability area during the last glacial maximum (ca. 22,000 years). Results from the past distribution modeling and genetic analyses suggest that *M. riparius* had a wider distribution range, with population in panmixia until late Pleistocene, when climatic changes fragmented and isolated populations. However, molecular variance analyses do not show evidence of gene flow interruption. Based on this background, we conclude that *Myotis riparius* is not composite. Although we have found evidence of populations geographically structured, the monotypy of *Myotis riparius* remains an open question.

**Key words:** Bats, multivariate morphometrics, Myotinae, phylogeny, species distribution modeling, Neotropical region, taxonomy.

**LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. <i>Primers</i> usados para amplificação e sequenciamento de <i>Myotis riparius</i> ..... | 10 |
| FIGURA 2. Medidas crânio-dentárias mensuradas nos espécimes de <i>Myotis riparius</i> .....        | 19 |
| FIGURA 3. Divisões das unidades taxonômicas operacionais de <i>Myotis riparius</i> .....           | 21 |
| FIGURA 4. Reconstrução filogenética das espécies de <i>Myotis</i> do grupo <i>ruber</i> .....      | 28 |
| FIGURA 5. Rede de haplótipos de <i>Myotis riparius</i> .....                                       | 32 |
| FIGURA 6. Variação da coloração da pelagem dorsal e ventral em <i>Myotis riparius</i> .....        | 44 |
| FIGURA 7. Variação dos caracteres cranianos qualitativos em <i>Myotis riparius</i> .....           | 34 |
| FIGURA 8. Vista dorsal, ventral e lateral do crânio e da mandíbula de <i>Myotis riparius</i> ..... | 35 |
| FIGURA 9. Análise de componentes principais e das funções discriminantes.....                      | 40 |
| FIGURA 10. Modelos de distribuição atual de <i>Myotis riparius</i> .....                           | 46 |
| FIGURA 11. Modelos de distribuição passada de <i>Myotis riparius</i> .....                         | 48 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. Espécimes utilizados nas análises filogenéticas. ....  | 11 |
| TABELA 2. Instituições com coleções biológicas examinadas .....  | 16 |
| TABELA 3. Caracteres morfológicos qualitativos.....  | 17 |
| TABELA 4. Medidas crânio-dentárias .....   | 18 |
| TABELA 5. Medidas corporais externas .....   | 18 |
| TABELA 6. Unidades taxonômicas operacionais de <i>Myotis riparius</i> .....  | 20 |
| TABELA 7. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de <i>Myotis riparius</i> e demais espécies do grupo <i>ruber</i> .....                                      | 29 |
| TABELA 8. Diversidade haplotípica e testes de neutralidade de <i>Myotis riparius</i> .....   | 31 |
| TABELA 9. Análise de variância molecular de <i>Myotis riparius</i> .....   | 32 |
| TABELA 10. Valores do Índice de fixação para as amostras de <i>Myotis riparius</i> .....   | 32 |
| TABELA 11. Medidas de amostras selecionadas de <i>Myotis riparius</i> .....  | 37 |
| TABELA 12. Análise de Variância Multivariada par-a-par para as amostras de <i>Myotis riparius</i> .....  | 38 |
| TABELA 13. Coeficientes de correlação dos componentes principais e funções discriminantes das análises morfométricas multivariadas aplicadas em <i>Myotis riparius</i> ..... | 39 |
| TABELA 14. Valores da estatística AUC aplicados aos modelos de distribuição .....  | 46 |
| TABELA 15. Porcentagem de contribuição de cada variável dos modelos de distribuição atual e passada de <i>Myotis riparius</i> .....  | 47 |

## ABREVIACOES E SIGLAS

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b><math>\mu</math>L</b> | Microlitro  |
| <b>ACP</b>               | Análise de componentes principais                           |
| <b>AFD</b>               | Análise das funes discriminantes das variáveis cannicas |
| <b>AMOVA</b>             | Análise de Varincia Molecular                              |
| <b>BI</b>                | Inferncia Bayesiana  |
| <b>BIC</b>               | Critrio Bayesiano de Schwarz                               |
| <b>Cyt-b</b>             | Citocromo b   |
| <b>g</b>                 | Gramas  |
| <b>K2p</b>               | Teste de Kimura de dois parmetros                          |
| <b>LGM</b>               | ltimo Máximo Glacial                                       |
| <b>MANOVA</b>            | Análise de varincia multivariada                           |
| <b>ML</b>                | Análise de Máxima Verossimilhança                           |
| <b>mm</b>                | Milímetros  |
| <b>N</b>                 | Número amostral   |
| <b>OTU</b>               | Unidade taxonmica operacional                              |
| <b>pb</b>                | Pares de base   |
| <b>PCR</b>               | Reao em Cadeia de Polimerase                             |
| <b>SDM</b>               | Modelo de distribuio geográfica de espécies              |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2. OBJETIVOS.....   | 7  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 8  |
| 3.1. Análises genéticas.....  | 9  |
| 3.1.1. Análises filogenéticas.....  | 12 |
| 3.1.2. Análises filogeográficas.....                                      | 13 |
| 3.2. Análises morfológicas.....   | 14 |
| 3.3. Análises morfométricas.....  | 20 |
| 3.4. Modelagem da distribuição geográfica.....                            | 24 |
| 4. RESULTADOS.....  | 27 |
| 4.1. Análises filogenéticas.....  | 27 |
| 4.2. Análises filogeográficas.....  | 30 |
| 4.3. Análises morfométricas.....  | 33 |
| 4.4. Análises morfológicas.....   | 41 |
| 4.4.1. Coloração da pelagem.....  | 41 |
| 4.4.2. Ocorrência e desenvolvimento das cristas sagital e lambdoides..... | 42 |
| 4.4.3. Posição do terceiro pré-molar superior.....                        | 43 |
| 4.4.4. Inclinação do rosto.....   | 45 |
| 4.4.5. Forma do teto e da região posterior da caixa craniana.....         | 45 |
| 4.4. Modelagem de distribuição.....                                       | 45 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 49 |
| 5.1. Estruturação populacional.....                                       | 49 |
| 5.2. Distribuição.....  | 50 |
| 5.3. História evolutiva.....  | 52 |
| 5.4. Variação populacional e implicações taxonômicas.....                 | 54 |
| 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....  | 58 |
| REFERÊNCIAS.....  | 59 |
| APÊNDICE 1.....   | 70 |
| APÊNDICE 2.....   | 74 |

## 1. INTRODUÇÃO

Conhecer a diversidade real dos organismos do nosso planeta é fundamental para o aproveitamento dos recursos naturais de maneira sustentável e para o manejo e conservação das espécies (MAY, 1988). A atual crise da biodiversidade está provocando a sexta onda de extinções em massa, com a maior taxa de perda de espécies dos últimos 65 milhões de anos (CEBALLOS et al., 2015). Estima-se que grande parte dessas extinções seja de espécies ainda desconhecidas pela ciência, colocando os estudos taxonômicos na vanguarda das ciências biológicas (COSTELLO et al., 2013). Além disso, a falta de acuidade taxonômica pode gerar um viés na gestão e conservação do patrimônio biológico da Terra (MORRISON et al., 2009; GUTIÉRREZ & HELGEN, 2013).

Espécie é a unidade central da taxonomia e a associação entre um nome científico inequívoco a uma espécie é de suma importância para um sistema de informação biológica confiável (WHEELER, 2004). Porém, o próprio conceito de espécie é variável, com diversas interpretações e definições (ZACHOS, 2016). Na tentativa de sorver esta questão, taxonomistas vêm adotando abordagens mais modernas, estudando eventos que geraram especiação como forma de delimitar espécies, compreendendo os fatores que causaram sua origem e determinaram sua trajetória evolutiva independentemente de outros grupos biológicos (DE QUEIROZ, 1998, 2005; MISHLER & THERIOT, 2000; WILEY & MAYDEN, 2000; ZACHOS, 2016).

Estudos integrativos que utilizem diferentes fontes de evidências estão na vanguarda da sistemática, ajudando a elucidar questões evolutivas ao mesmo passo em que ajudam a determinar os limites entre as espécies (PADIAL et al., 2010). Nesse sentido, diversos estudos sistemáticos têm se valido da combinação de dados genéticos, morfológicos e ecológicos, onde a congruência de evidências de duas ou mais dessas fontes tem direcionado as decisões

taxonômicas, especialmente para complexos de espécies crípticas (RISSLER & APODACA 2007; BOND & STOCKMAN, 2008; DÁVALOS & PORZECANSKI, 2009; TAN et al., 2010; HAWLITSCHKEK et al., 2011).

Embora a taxonomia integrativa tenha se tornado mais comum nos últimos anos (PADIAL et al., 2010), estudos com morcegos que combinem diferentes fontes de evidências ainda são escassos. Os poucos exemplos incluem estudos combinando no máximo duas fontes de evidência para identificação de espécies pertencentes a complexos crípticos, que podem ser análises morfológicas, genéticas, bioacústicas, de modelagens de nicho ecológico e distribuição geográfica (e.g., VON HELVERSEN et al., 2001; GOODMAN et al., 2009).

Estimativas feitas a partir de evidência genética indicam que a diversidade de morcegos conhecida ainda é subestimada, sobretudo para a região Neotropical (MAYER et al., 2007; CLARE et al., 2011; LARSEN et al., 2012). Além disso, cerca de 60% das descobertas de novas espécies das últimas duas décadas foram provenientes de espécies crípticas (CEBALLOS & EHRLICH, 2009). Portanto, existe uma necessidade iminente de estudos integrativos que ajudem a determinar a variação entre as populações e o limite entre espécies crípticas, especialmente para grupos que apresentem elevada importância ecológica e de saúde pública, como os morcegos (KUNZ et al., 2011; MORATELLI & CALISHER, 2015).

Os morcegos insetívoros desempenham um importante serviço ecossistêmico, como um dos principais predadores de artrópodes herbívoros (CLEVELAND et al., 2008; KALKA et al., 2008). Na América do Norte esses mamíferos são responsáveis por uma economia anual estimada em 22 bilhões de dólares devido ao controle natural de pragas agrícolas (BOYLES et al., 2011). *Myotis* Kaup 1829 é o gênero de morcegos mais rico em espécies do planeta, com mais de 110 espécies válidas (SIMMONS, 2005), das quais 99% são exclusivamente insetívoras (WILSON, 2008), existindo algumas espécies que se alimentam de peixes e um registro de frugivoria na região Neotropical para *Myotis nigricans* (Schinz 1821), espécie

considerada exclusivamente insetívora até recentemente (WHITAKER & FINDLEY, 1980; NOWAK, 1994; AIZPURUA et al., 2013; NOVAES et al., 2016). Além disso, algumas espécies de *Myotis* mantêm algumas das maiores formações gregárias de mamíferos do mundo, com colônias que chegam a mais de 1,5 milhões de indivíduos, tornando esse gênero um excelente modelo para estudos ecológicos, evolutivos e comportamentais (NOWAK, 1994).

Segundo RUEDI et al. (2013), o gênero *Myotis* originou-se no leste da Ásia no Mioceno superior (23 a 20 milhões de anos), passou por rápidos episódios de diversificação, alcançando sua amplitude de distribuição atual, que é a maior entre os mamíferos não humanos. Um estudo paleontológico mais recente, contudo, mostra que *Myotis* já estava presente no Oligoceno ( $\cong$  33 milhões de anos) e também indica rápidos eventos de diversificação global (GUNNELL et al., 2017). *Myotis* está dividido em três grandes linhagens com forte associação biogeográfica, onde todas as espécies do Novo Mundo são recuperadas em um clado com dois subclados, um neártico e outro predominantemente neotropical (STADELMANN et al., 2007; RUEDI et al., 2013).

Utilizando abordagem fenética, FINDLEY (1972) dividiu todas as espécies de *Myotis* do mundo em três subgêneros, onde todas as espécies neotropicais foram alocadas no mesmo subgênero, *Leuconoe* Boie 1830. Contudo, a partir de reconstrução filogenética utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, RUEDI & MAYER (2001) refutaram essa hipótese, não reconhecendo subgêneros para *Myotis*. Posteriormente, STADELMANN et al. (2007) ao proporem uma filogenia de *Myotis* do Novo Mundo a partir de marcadores mitocondriais e nucleares, estruturaram o subclado neotropical em dois grupos, chamados por MORATELLI et al. (2013) de grupo *albescens* e grupo *ruber*, seguindo o nome válido para a espécie mais antiga de cada linhagem. O arranjo proposto por MORATELLI et al. (2013) foi baseado em distinções morfológicas externas e cranianas, e revelaram uma forte congruência

entre os dados moleculares e morfológicos (veja STADELMANN et al., 2007; MORATELLI et al., 2013; MORATELLI et al., 2016, 2017).

Com relação à história taxonômica do gênero na região Neotropical, na primeira revisão taxonômica, MILLER & ALLEN (1928) reconheceram cinco espécies. Posteriormente, LAVAL (1973) reconheceu 14 espécies. Esse arranjo taxonômico foi o ponto de partida para uma corrente revisão das formas neotropicais que vem sendo realizada por Moratelli e colaboradores. Essa revisão já resultou na descrição de sete espécies, além de outros atos nomenclaturais (MORATELLI & WILSON, 2011a, 2011b, 2014; MORATELLI et al., 2011a, 2013, 2016, 2017). Atualmente são reconhecidas 27 espécies de *Myotis* para a região Neotropical (LAVAL, 1973; WILSON, 2008; MANTILLA-MELUK & MUÑOZ-GARAY, 2014; MORATELLI et al., 2017). Contudo, possivelmente a diversidade de *Myotis* neotropicais está subestimada, já que estudos genéticos indicam a existência de pelo menos 35 linhagens evolutivas independentes, um número 23% maior do que o número de espécies atualmente reconhecidas e válidas (LARSEN et al., 2012; MORATELLI et al., 2017).

Embora o gênero *Myotis* tenha sido alvo de diversos estudos sistemáticos na região Neotropical, poucos estudos versaram sobre estruturações populacionais das espécies. Dentre esses, Moratelli e colaboradores descreveram seis novas espécies no grupo *albescens* (MORATELLI & WILSON, 2011b; MORATELLI et al., 2011a, 2013, 2016, 2017) e uma nova espécie no grupo *ruber* (MORATELLI & WILSON, 2014). Ainda assim, ambos os grupos ainda permanecem com problemas taxonômicos, e revisões recentes utilizando dados genéticos e morfológicos tem indicado uma diversidade críptica dentro do grupo *ruber* (CLARE et al., 2007; LARSEN et al., 2012; MANTILLA-MELUK & MUÑOZ-GARAY, 2014).

Este estudo está focado em *Myotis riparius* Handley 1960, uma das espécies de morcego com maior amplitude de distribuição geográfica dentre a quiropterofauna neotropical

(SIMMONS, 2005; WILSON, 2008). *Myotis riparius* está incluída no grupo *ruber*, no qual estão incluídas também as espécies *Myotis elegans* Hall 1962, *Myotis keaysi* J.A. Allen 1914, *Myotis midastactus* Moratelli & Wilson 2014, *Myotis pilosatibialis* LaVal 1973, *Myotis ruber* (É. Geoffroy 1806) e *Myotis simus* Thomas 1901. *Myotis riparius* foi descrita como uma subespécie de *M. simus* por HANDLEY (1960) e depois foi elevada a espécie por LAVAL (1973). Ocorre desde o sul de Honduras até o leste do Brasil, norte da Argentina e Uruguai, ocupando florestas tropicais, savanas e ambientes xerofíticos (WILSON, 2008; NOVAES et al., 2017). *Myotis riparius* apresenta conspícua variação geográfica para caracteres morfológicos externos e crânio-dentários (NOVAES et al., 2017). Em populações do sul da América do Sul e leste do Brasil, predominam a coloração castanha a negra, região occipital comparativamente arredondada, cristas sagital e lambdoides baixas e terceiro pré-molar superior alinhado com os demais pré-molares. Por outro lado, em populações da América Central e norte da América do Sul, incluindo Bacia Amazônica, predominam a pelagem dorsal avermelhada, região occipital levemente achatada e cristas sagital e lambdoides variando de médias a altas. Apesar do terceiro pré-molar estar também predominantemente alinhado com os demais pré-molares, nessas populações ele aparece mais frequentemente deslocado lingualmente, inclusive já tendo sido usado como diagnóstico para a espécie (HANDLEY, 1960; LAVAL, 1973; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2001; ROCHA, 2008; MORATELLI et al., 2013; NOVAES et al., 2017).

Usando análises morfológicas qualitativas e morfométricas multivariadas, ROCHA (2008) investigou a estruturação dessas populações e não encontrou evidência de discontinuidades que indicassem que a espécie, como atualmente reconhecida, possa ser um complexo de espécies. Por outro lado, análises moleculares feitas a partir de marcadores mitocondriais indicaram que *M. riparius* é parafilética (LARSEN et al. 2012). Entretanto, segundo R. Moratelli (com. pess.) erros de identificação dos espécimes podem ter

influenciado os resultados obtidos por LARSEN et al. (2012). Assim, com base na variação morfológica observada, NOVAES et al. (2017) sugerem que *M. riparius* pode ser composta por duas subespécies, uma que ocorre da América Central ao norte da América do Sul, e outra distribuída do Uruguai e Paraguai até o leste do Brasil. Entretanto, cabe destacar aqui que o trabalho de NOVAES et al. (2017) é uma compilação do conhecimento estabelecido, sobre o qual se apresenta um possível cenário para a estruturação da espécie, mas sem qualquer teste da hipótese apresentada.

No presente estudo, buscamos entender como estão estruturadas as populações de *M. riparius* ao longo da sua distribuição geográfica. Nossa hipótese, construída sobre os resultados obtidos por ROCHA (2008), MORATELLI et al. (2013) e NOVAES et al. (2017), é que *M. riparius* é uma única espécie, onde a variação geográfica possa representar diferentes subespécies.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi entender a estruturação populacional de *M. riparius*. Para isso, descrevemos e analisamos as variações genética e morfológica para a espécie (sensu MORATELLI et al., 2013) e contrastamos esses resultados com modelos de distribuição geográfica atual e passada. Assim, os objetivos específicos foram:

- (1) Avaliar a congruência entre os padrões de variação genética, morfológica e morfométrica;
- (2) Analisar as relações filogenéticas de *M. riparius* e verificar a possível existência de mais de uma linhagem evolutiva;
- (3) Avaliar a estruturação filogeográfica das populações delimitadas a partir das variações morfológicas;
- (4) Determinar a distribuição geográfica de *M. riparius* conhecida a partir dos espécimes depositados em coleções;
- (5) Estimar a distribuição geográfica de *M. riparius* a partir de modelagem de distribuição geográfica; e
- (6) Contrastar os modelos de distribuição geográfica atual e passada com os padrões de variação revelados nas análises morfológicas e genéticas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido usando o conceito de sistemática integrativa (sensu PADIAL et al., 2010), e as decisões taxonômicas foram tomadas a partir da congruência dos resultados de análises genéticas (análise filogenética e filogeográfica com citocromo b), morfológicas (qualitativa e quantitativa), e ecológicas de adequabilidade ao hábitat, modelagem de distribuição geográfica atual passada, considerando o último máximo glacial ( $\cong$  22 mil anos).

Esse estudo foi totalmente conduzido a partir de material depositado em coleções biológicas e a identificação dos espécimes de *M. riparius* nessas coleções seguiu ROCHA (2008) e MORATELLI et al. (2013), que apresentam a seguinte descrição: espécie de pequeno a médio porte (comprimento do antebraço de 32,0–39,8 mm, massa corporal de 4–5 g), com pelagem relativamente longa e lanosa (comprimento dos pelos no dorso: 5–9 mm; comprimento dos pelos no ventre: 4–8 mm). A pelagem dorsal é unicolorida, variando de castanho-escura à castanho-avermelhada; e a pelagem ventral é bicolorida e com marcado contraste entre as bandas, sendo a base enegrecida e o ápice amarelado. As membranas são castanho-escuras; o plagiopatágio é inserido ao pé na base dos dedos por uma larga banda de membrana ( $>$  1,5 mm); e a franja de pelos na borda do uropatágio está ausente. O tamanho do crânio varia de pequeno a médio (comprimento total do crânio: 13,2–15,2 mm; largura da caixa craniana: 6,0–7,0 mm). A posição do terceiro pré-molar superior varia, estando geralmente alinhado com a série de dentes e visível em vista labial ou deslocado para o lado lingual e não visível em vista labial. A crista sagital está presente na maioria dos espécimes, variando de baixa a alta; as cristas lambdoides estão sempre presentes, variando de baixas a altas; os parietais são inclinados para frente e a região occipital geralmente é achatada posteriormente. Esses caracteres isoladamente são encontrados em outras espécies de *Myotis*,

contudo, a combinação deles distingue *M. riparius* das demais espécies neotropicais (ROCHA, 2008 e MORATELLI et al., 2013).

### 3.1. Análises genéticas

Foram realizadas análises genéticas a partir de 19 sequências de citocromo b (cyt-b) de *Myotis riparius*, para qual pelo menos um espécime de cada clado gerado tenha sido identificado a partir do conjunto de caracteres diagnósticos reportados acima para a espécie. As sequências foram obtidas do GenBank (publicadas por RUEDI & MAYER, 2001; STADELMANN et al. 2007; LARSEN et al., 2012) e de sequenciamento próprio a partir de espécimes da Mata Atlântica do Rio de Janeiro. As sequências geradas ao longo deste estudo serão depositadas no GenBank antes de qualquer publicação dos resultados.

O DNA foi extraído de amostras de tecido do fígado pelo método de extração salina (protocolo Promega® *DNA Wizard Mouse Tail* modificado). A qualidade do DNA extraído foi aferida através de eletroforese com gel de agarose (1%) e a quantificação de ácido nucleico em cada amostra foi feita utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (DESJARDINS & CONKLIN, 2010). Amostras que apresentaram concentração superior a 60 mg/μL foram diluídas em água destilada pura. A amplificação dos primeiros 800 pares de base do cyt-b (Figura 1) foi feita por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando os *primers* MVZ-05 (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'; SMITH & PATTON, 1993) e MVZ-16 (5'-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'; SMITH & PATTON, 1993), utilizado por RUEDI & MAYER (2001) para amplificar o cyt-b de *Myotis* neotropicais.

O PCR foi feito com amostras contendo volume final de 25μL, compostas de 9,0μL de H<sub>2</sub>O, 12,5μL de TAQ Master Mix, 1,25μL de cada *primer* [10μM] e 1,0μL de *template* (amostra contendo DNA). Foram incluídos controles negativos (amostras sem DNA) em todas

as reações de PCR para controlar qualquer contaminação que pudesse ocorrer durante o processo laboratorial. As amplificações foram feitas utilizando perfil no termociclador, descrito por RUEDI & MAYER (2001), sendo: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 37 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.



**FIGURA 1.** *Primers* usados para amplificação e sequenciamento de aproximadamente 800 pb iniciais de citocromo b de *Myotis riparius*.

A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese com gel de agarose (2%). Somente as amostras que apresentaram bandas no gel foram sequenciadas. A purificação das amostras foi feita utilizando o protocolo *QIAquick PCR purification kit protocol* do kit comercial QIAGEN®. Todos os procedimentos supracitados foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Biodiversidade Molecular do Departamento de Vertebrados do Museu Nacional/UFRJ. O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger (SANGER & COULSON, 1975) em sequenciador automático (Applied Biosystems® ABI3730xl, 96 capilares) na Plataforma de Sequenciamento de DNA da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Um sumário contendo as informações de cada sequência utilizada nesse estudo está disponível na Tabela 1. Os grupos externos escolhidos compreendem espécies de *Myotis* do grupo *ruber* (*M. elegans*, *M. pilosatibialis* e *M. simus*) e do grupo *albescens* (*M. nigricans*), compreendendo oito sequências publicadas por LARSEN *et al.* (2012) e depositadas no GenBank.

**TABELA 1.** Espécimes utilizados nas análises filogenéticas, incluindo número de acesso no GenBank, número do voucher depositado em coleção, localidade e autor da publicação que utilizou as sequências pela primeira vez. \* voucher não examinado.

| GENBANK       | VOUCHER    | LOCALIDADE              | FONTE                    | TERMINAL                         |
|---------------|------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| AM261891      | -          | La Selva, Costa Rica    | Stadelmann et al. (2007) | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130506      | TTU 85090  | El Oro, Equador         | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130576      | TTU 85347* | Esmeraldas, Equador     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130492      | TTU 102883 | Esmeraldas, Equador     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130515      | TTU 85345  | Esmeraldas, Equador     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130469      | TTU 85344  | Esmeraldas, Equador     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130513      | TTU 84870  | Pastaza, Equador        | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130473      | CM 68443   | Para, Suriname          | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130474      | CM 78659*  | Bolívar, Venezuela      | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130490      | CM 78651   | Barinas, Venezuela      | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130436      | -          | Huánuco, Peru           | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| AF376866      | MVZ AD119* | Pernambuco, Brasil      | Ruedi & Mayer (2001)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| -             | ALP 10926  | Rio de Janeiro, Brasil  | Esse estudo              | <i>Myotis riparius</i>           |
| -             | ALP 10927  | Rio de Janeiro, Brasil  | Esse estudo              | <i>Myotis riparius</i>           |
| -             | ALP 11024  | Rio de Janeiro, Brasil  | Esse estudo              | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130485      | TTU 99645* | Paraguari, Paraguai     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130486      | TTU 94912  | Canindeyu, Paraguai     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130491      | TTU 99378  | Canindeyu, Paraguai     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| JX130488      | -          | Canindeyu, Paraguai     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis riparius</i>           |
| GRUPO EXTERNO |            |                         |                          |                                  |
| JX130479      | TTU 84380  | Atlantida, Honduras     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis elegans</i>            |
| JX130480      | TTU 84138  | Atlantida, Honduras     | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis elegans</i>            |
| JX130470      | TTU 103759 | Guayas, Equador         | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis cf. elegans</i>        |
| JX130526      | TTU 35360  | San Luis Potosi, México | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis cf. pilosatibialis</i> |
| JX130519      | TTU 60981  | Santa Ana, El Salvador  | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis cf. pilosatibialis</i> |
| JX130435      | TTU 39146  | Chiriquí, Panamá        | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis cf. pilosatibialis</i> |
| JX130481      | TTU 46348  | Huánuco, Peru           | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis simus</i>              |
| JX130496      | TTU 99743  | Pres. Hayes, Paraguai   | Larsen et al. (2012)     | <i>Myotis nigricans</i>          |

Para testar as hipóteses levantadas, foram feitas análises filogenéticas e filogeográficas utilizando as sequências de cyt-b do conjunto de dados disponível na Tabela 1. As sequências de DNA foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) na plataforma MEGA7 (KUMAR et al., 2016) usando a configuração padrão (*default*).

### 3.1.1. Análises filogenéticas

A fim de otimizar as análises filogenéticas, antes de sua execução foi feita a escolha do modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos no programa JModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012) utilizando o Critério Bayesiano de Schwarz (BIC) para a seleção da árvore mais verossímil obtida a partir do algoritmo PHYML (GUINDON & GASCUEL, 2003). O modelo de Hasegawa–Kishino–Yano (HASEGAWA et al., 1985) foi o que apresentou o melhor ajuste quanto à substituição de nucleotídeos, corrigindo a taxa de heterogeneidade usando distribuição-gama com sítios invariados (i.e., HKY+G+I). Esse modelo foi utilizado para todas as análises filogenéticas.

A reconstrução filogenética foi feita a partir de dois métodos probabilísticos—Máxima Verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) e Inferência Bayesiana (HUELSENBECK et al., 2001). A análise de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*) foi feita no programa RAxML v8.0 (STAMATAKIS, 2014) e o suporte dos ramos foi calculado por *bootstrap* não-paramétrico com 1.000 réplicas.

A análise de Inferência Bayesiana (BI, *Bayesian Inference*) foi feita no programa MrBayes 3.4 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) utilizando o modelo acoplado de Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMCMC). Quatro cadeias de Markov simultâneas foram executadas para 100.000.000 gerações com árvores amostradas a cada 1.000 gerações. As 26.000 árvores iniciais foram descartadas como *burn-in*. Probabilidades posteriores foram calculadas a partir do consenso das árvores restantes.

A confiabilidade da amostragem bayesiana foi verificada para o parâmetro livre de cada amostra utilizando a estatística *effective sample size* (ESS) implementada no programa Tracer 1.5 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2009). As análises foram cheçadas para convergência plotando o valor da verossimilhança logaritmizada (*log-likelihood*) contra o tempo de geração para cada modelagem realizada e todos os parâmetros apresentaram ESS maior que 300, indicando performance confiável. Os terminais da árvore filogenética foram classificados dentro do grupo de regiões biogeográficas a partir da localidade de origem do espécime utilizado no sequenciamento.

As distâncias entre os haplótipos foram estimadas pelo modelo de Kimura de dois parâmetros (k2p) utilizando o programa PAUP\* 4.0b10 (SWOFFORD, 2001). Esse método mede a distância entre pares de sequências estimando a proporção de nucleotídeos diferentes entre duas ou mais sequências (KIMURA, 1980).

### 3.1.2. Análises filogeográficas

Foram realizadas análises filogeográficas objetivando compreender a variação genética intraespecífica de *M. riparius*. A diversidade genética foi estimada para todas as populações conjuntamente e para cada conjunto populacional separadamente utilizando o programa DnaSP 5.10.01 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Foi calculado o número total de sítios, número de sítios variáveis (S), número total de mutações (Eta), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), variância da diversidade haplotípica (Hd Var), desvio padrão da diversidade haplotípica (Hd SD), diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi$ ), variância da diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi$  Var), desvio padrão da diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi$  SD), theta por sequência a partir do número de sítios variados ( $\theta$  Seq) e theta por sítio a partir do número de sítios variados ( $\theta$  Sit). Theta é igual  $2N\mu$  para um gene autossômico de um

organismo diplóide, onde  $N$  é o tamanho populacional efetivo e  $\mu$  é a taxa de mutação de nucleotídeos por sítio em cada geração.

Também foram feitos dois testes de neutralidade, Tajima  $D$  (TAJIMA, 1989) e  $F_u$ - $F_s$  (FU & LI, 1993), para avaliar se os dados desviam da hipótese nula de tamanho populacional constante. Esses testes foram realizados no programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2005) a partir de 10.000 simulações para gerar e testar a hipótese nula.

Para entender a estruturação populacional de *M. riparius* foram realizadas duas abordagens: (1) construção de uma rede de haplótipos (distribuição dos haplótipos pelos conjuntos populacionais previamente definidos) usando o algoritmo *median-joining* no programa Network 4.6.1.3 (BANDELT et al., 1999); (2) Análise de Variância Molecular (AMOVA) para avaliar o quanto da variação encontrada está presente entre e dentro dos grupos previamente definidos através de comparações entre os resultados obtidos pelo índice de fixação ( $F_{ST}$ ). O  $F_{ST}$  indica a quantidade de variação genética dos conjuntos populacionais, permitindo inferências de fluxo gênico (HOLSINGER & WEIR, 2009). A AMOVA foi realizada no Arlequin 3.5.1.2 com parâmetro  $K2p$  gerado a partir de 10.000 permutações e nível de significância de 0,05.

### **3.2. Análises morfológicas**

As análises morfológicas qualitativas e quantitativas foram baseadas em informações obtidas de 165 espécimes taxidermizados e em meio líquido (álcool 70°GL), depositados em 22 coleções científicas (Tabela 2). A maioria desses espécimes tem o crânio disponível separadamente, sendo esse o único componente esquelético examinado. Foram examinados 57 machos, 88 fêmeas e um indivíduo sem sexo determinado. Esse material inclui o holótipo, parátipos e séries de diferentes regiões geográficas, representando a amplitude de distribuição

da espécie. A fim de definir os limites taxonômicos, a morfologia de *M. riparius* foi comparada com a de outras espécies do grupo *ruber*, consideradas filogeneticamente e morfologicamente mais próximas de *M. riparius* (sensu STADELMANN et al., 2007 e MORATELLI et al., 2013), sendo elas: *Myotis elegans* ( $N = 28$ ), *M. keaysi* ( $N = 65$ ), *M. midastactus* ( $N = 30$ ), *M. pilosatibialis* ( $N = 66$ ), *M. ruber* ( $N = 49$ ) e *M. simus* ( $N = 55$ ). A lista dos espécimes examinados está no Apêndice 1.

A coloração da pelagem foi utilizada para descrever a variação entre os conjuntos populacionais e as amostras foram observadas e fotografadas sobre condições semelhantes de iluminação. As análises morfológicas qualitativas foram baseadas em seis caracteres crânio-dentários (Tabela 3), tradicionalmente usados na taxonomia de *Myotis* na região Neotropical (MILLER & ALLEN, 1928; LAVAL 1973; BARQUEZ et al., 1999; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2001; ROCHA, 2008; MORATELLI et al., 2011a, 2013, 2016, 2017).

As análises morfológicas quantitativas foram baseadas em 16 medidas crânio-dentárias (Figura 2; Tabela 4), e cinco medidas externas (Tabela 5), tomadas com paquímetro digital de precisão 0,01 mm pelo mesmo medidor (R. Moratelli). As medidas crânio-dentárias foram tomadas com auxílio de microscópios estereoscópicos no menor aumento possível (geralmente 6x). A escolha dessas medidas foi baseada nas revisões LAVAL (1973), LÓPEZ-GONZÁLEZ et al. (2001), ROCHA (2008) e MORATELLI et al. (2013) para *Myotis* neotropicais.

**TABELA 2.** Instituições com coleções biológicas examinadas para análise de representantes de *Myotis riparius* e das demais espécies do grupo *ruber*.

| <b>INSTITUIÇÃO</b>   | <b>SIGLA</b> | <b>LOCAL</b>                      |
|--|--------------|-----------------------------------|
| Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Coleção Adriano Lucio Peracchi | ALP          | Seropédica, RJ, Brasil            |
| American Museum of Natural History   | AMNH         | New York, NY, EUA                 |
| Carnegie Museum of Natural History   | CM           | Pittsburgh, PA, EUA               |
| University of Guyana, Centre for the Study of Biological Diversity           | CSBD         | Georgetown, Guiana                |
| Universidade Estadual Paulista   | DZSJRP       | São José do Rio Preto, SP, Brasil |
| Field Museum of Natural History  | FMNH         | Chicago, IL, EUA                  |
| Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Pará          | IEPA         | Belém, PA, Brasil                 |
| University of Kansas, Natural History Museum                                 | KU           | Lawrence, KS, EUA                 |
| Natural History Museum of Los Angeles County                                 | LACM         | Los Angeles, CA, EUA              |
| Louisiana State University, Museum of Natural Science                        | LSUZM        | Baton Rouge, LA, EUA              |
| Muséum d'Histoire Naturelle de Ville de Genève                               | MHNG         | Genève, Suíça                     |
| Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro                       | MN           | Rio de Janeiro, RJ, Brasil        |
| Muséum National d'Histoire Naturelle   | MNHN         | Paris, França                     |
| Museum of Vertebrate Zoology, University of California                       | MVZ          | Berkeley, CA, EUA                 |
| Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo                               | MZUSP        | São Paulo, SP, Brasil             |
| Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History                                 | OMNH         | Norman, OK, EUA                   |
| Royal Ontario Museum   | ROM          | Toronto, ON, Canadá               |
| Museum of Texas Tech University  | TTU          | Lubbock, TX, EUA                  |
| Universidade Federal de Pernambuco   | UFPE         | Recife, PE, Brasil                |
| National Museum of Natural History, Smithsonian Institution                  | USNM         | Washington, DC, EUA               |
| Zoologische Staatssammlung München   | ZSM          | München, Alemanha                 |

**TABELA 3.** Caracteres morfológicos qualitativos analisados em *M. riparius*.

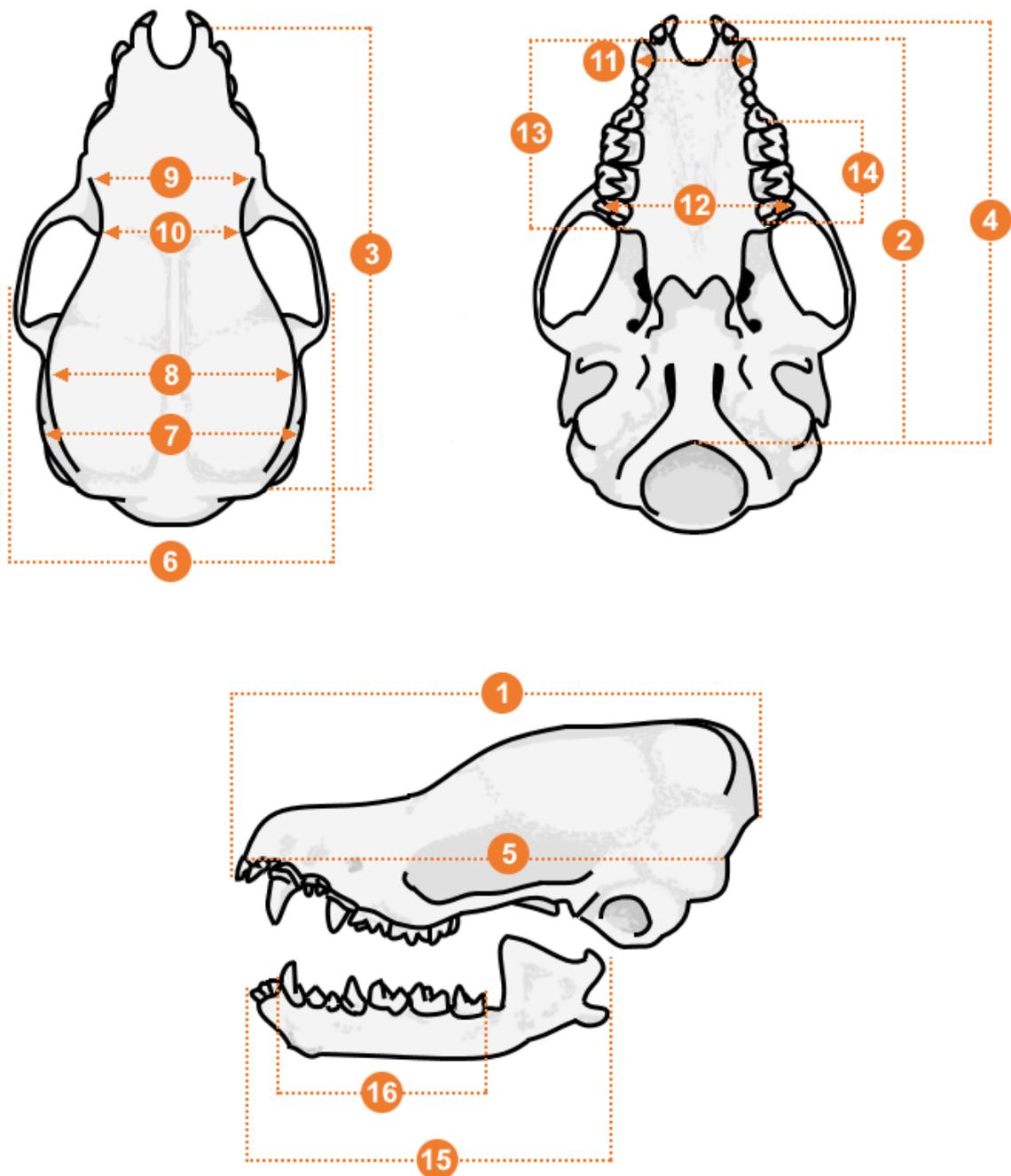
| CARACTERES  | SIGLA | ESTADOS   |
|---|-------|---|
| Presença e altura da crista sagital   | CS    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ausente</li> <li>2. Superficial (apenas a marca da crista visível)</li> <li>3. Baixa</li> <li>4. Mediana</li> <li>5. Alta</li> </ol>  |
| Presença e altura das cristas lambdoides  | CL    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ausente</li> <li>2. Superficiais (apenas a marca das cristas visível e região levemente abaulada)</li> <li>3. Baixas</li> <li>5. Medianas</li> <li>6. Altas</li> </ol>  |
| Posição do terceiro pré-molar superior  | P3    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alinhado com os pré-molares e visível labialmente</li> <li>2. Alinhado com os pré-molares, não visível labialmente</li> <li>3. Deslocado lingualmente e visível labialmente</li> <li>4. Deslocado lingualmente e não visível labialmente</li> </ol>               |
| Inclinação do rosto   | IR    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inclinado</li> <li>2. Não inclinado</li> </ol>  |
| Forma do teto da caixa craniana (porção superior formada pela <i>sutura sagittalis</i> e parietais) | TCx   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reta</li> <li>2. Inclinação</li> </ol>  |
| Forma da região posterior da caixa craniana (formada pelos ossos interparietal e supraoccipital)    | PCx   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Região mais posterior do crânio de aspecto arredondado, projetada para além do limite posterior dos côndilos occipitais</li> <li>2. Região mais posterior do crânio de aspecto achatado, não projetada além da linha posterior dos côndilos occipitais</li> </ol> |

**TABELA 4.** Medidas crânio-dentárias tomadas de *Myotis riparius*.

| MEDIDAS  | SIGLA | DESCRIÇÃO   |
|--|-------|---|
| Comprimento total do crânio                            | CTC   | Da região mais posterior do occipital até a região mais distal dos incisivos internos   |
| Comprimento cômulo-canino                              | CCc   | Da região mais posterior dos cômulos occipitais até a região mais anterior dos caninos  |
| Comprimento cômulo-basal                               | CCb   | Da região mais posterior dos cômulos occipitais até a região mais anterior da pré-maxila  |
| Comprimento cômulo-incisivos                           | CCi   | Da região mais posterior dos cômulos occipitais até a região mais distal dos incisivos internos                                     |
| Comprimento basal                                      | CBa   | Da margem mais anterior do <i>foramen magnum</i> até a região mais distal dos incisivos internos                                    |
| Largura zigomática                                     | LZg   | Maior largura entre os arcos zigomáticos  |
| Largura mastoidea                                      | LMt   | Maior largura entre os pontos extremos dos processos mastoideos   |
| Largura da caixa craniana                              | LCx   | Largura entre os pontos extremos da região basal do esquamosal  |
| Largura da constrição interorbital                     | LCI   | Largura entre os pontos mais próximos na constrição interorbital  |
| Largura da constrição pós-orbital                      | LPO   | Menor largura na constrição pós-orbital   |
| Largura externa dos caninos superiores                 | LCa   | Menor largura entre os pontos extremos externos dos caninos superiores, incluindo cingula   |
| Largura externa dos molares superiores                 | LMs   | Maior largura entre os pontos extremos externos dos molares superiores, incluindo cingula   |
| Comprimento da série de dentes superiores              | C-M   | Da região posterior da borda alveolar do terceiro molar superior até a região anterior da borda alveolar do canino                  |
| Comprimento da série de dentes molariformes superiores | M1-M3 | Da região posterior da borda alveolar do terceiro molar superior até a região anterior da borda alveolar do primeiro molar superior |
| Comprimento da mandíbula                               | Cm    | Da região mais posterior do processo articular até a região mais anterior do ramo da mandíbula, onde os dentários se conectam       |
| Comprimento da série de dentes inferiores              | c-m   | Da região posterior da borda alveolar do terceiro molar inferior até a região anterior da borda alveolar do canino inferior         |

**TABELA 5.** Medidas corporais externas tomadas de *Myotis riparius*.

| MEDIDA                            | SIGLA | DESCRIÇÃO   |
|-----------------------------------|-------|---|
| Comprimento do antebraço          | AB    | Do cúbito até a extremidade proximal dos metacarpos, com o braço, antebraço e dedos dobrados em “Z” |
| Comprimento do terceiro metacarpo | 3MC   | Da extremidade proximal até a extremidade distal do terceiro metacarpo                              |
| Comprimento da orelha             | OR    | Da base ao ápice do pavilhão auditivo, medido no indivíduo em posição ventral                       |
| Comprimento dos pelos do dorso    | CPD   | Medido no ponto médio da linha da cintura escapular   |
| Comprimento dos pelos do ventre   | CPV   | Medido no ponto médio da linha da cintura escapular   |



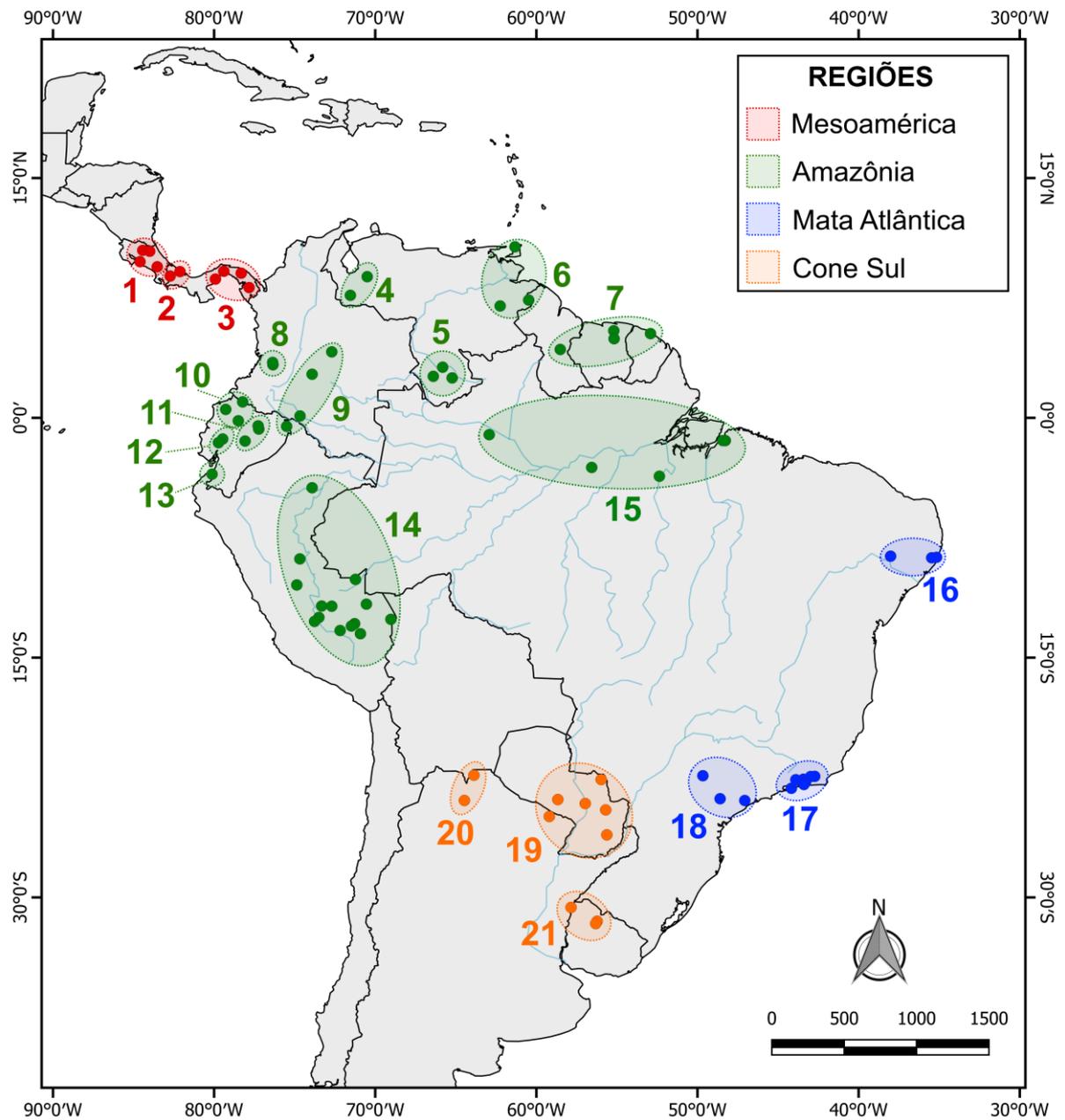
**FIGURA 2.** Medidas crânio-dentárias tomadas de *Myotis riparius*: 1. Comprimento total do crânio (CTC); 2. Comprimento cêndilo-canino (CCc); 3. Comprimento cêndilo-basal (CCb); 4. Comprimento cêndilo-incisivos (CCi); 5. Comprimento basal (CBa); 6. Largura zigomática (LZg); 7. Largura mastoidea (LMt); 8. Largura da caixa craniana (LCx); 9. Largura da constrição interorbital (LCI); 10. Largura da constrição pós-orbital (LPO); 11. Largura externa dos caninos superiores (LCa); 12. Largura externa dos molares superiores (LMs); 13. Comprimento da série de dentes superiores (C-M); 14. Comprimento da série de dentes molariformes superiores (M1-M3); 15. Comprimento da mandíbula (Cm); 16. Comprimento da série de dentes inferiores (c-m). Veja a Tabela 4 para a descrição das medidas.

### 3.3. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas os espécimes foram alocados em unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Unit* [OTU]), formadas pelos menores grupos geográficos possíveis, desde que esses apresentassem coesão morfológica. Assim, as amostras populacionais foram classificadas em 21 OTUs (Tabela 6; Figura 3). Subsequentemente essas OTUs foram arranjadas em grupos maiores a partir dos grandes domínios biogeográficos da região Neotropical, seguindo a terminologia proposta por MORRONE (2014).

**TABELA 6.** Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usadas para analisar a estruturação morfométrica das populações de *Myotis riparius*, incluindo as localidades de cada amostra populacional incluída na OTU (País e Estado/Província/Departamento), número de espécimes dentro de cada OTU (*N*) e região biogeográfica em que está incluída.

| OTU | POPULAÇÕES  | <i>N</i> | REGIÃO BIOGEOGRÁFICA |
|-----|---|----------|----------------------|
| 1   | Costa Rica: Limón; Puntarenas; San José   | 3        | Mesoamérica          |
| 2   | Panamá: Bocas del Toro; Chiriqui  | 3        | Mesoamérica          |
| 3   | Panamá: Darién; San Blas  | 9        | Mesoamérica          |
| 4   | Venezuela: Apune; Barinas   | 4        | Amazônia             |
| 5   | Venezuela: Amazonas   | 4        | Amazônia             |
| 6   | Venezuela: Bolívar. Trinidad e Tobago: Trinidad Island<br>Guiana: Barima-Waini  | 3        | Amazônia             |
| 7   | Guiana: Iwokrama Forest. Suriname: Para; Brokopondo<br>Guiana Francesa: Paracou | 10       | Amazônia             |
| 8   | Colômbia: Valle del Cauca, Tolima   | 5        | Amazônia             |
| 9   | Colômbia: Caquetá; Meta. Equador: Napo, Zancudo                                 | 3        | Amazônia             |
| 10  | Equador: Pichincha; Carchi; Esmeraldas  | 8        | Amazônia             |
| 11  | Equador: Napo, San José de Payamino; Pastaza; Orellana                          | 11       | Amazônia             |
| 12  | Equador: Los Ríos   | 2        | Amazônia             |
| 13  | Equador: El Oro   | 2        | Amazônia             |
| 14  | Peru: Loreto; Pasco; Huánuco; Ucayali; Cusco; Ayacucho;<br>Madre de Dios        | 21       | Amazônia             |
| 15  | Brasil: Amazonas; Pará  | 16       | Amazônia             |
| 16  | Brasil: Pernambuco  | 3        | Mata Atlântica       |
| 17  | Brasil: Rio de Janeiro  | 9        | Mata Atlântica       |
| 18  | Brasil: São Paulo   | 7        | Mata Atlântica       |
| 19  | Paraguai: Presidente Hayes; Canindeyu; San Pedro; Sapucay;<br>Amambay           | 16       | Cone Sul             |
| 20  | Argentina: Formosa; Jujuy; Salta  | 5        | Cone Sul             |
| 21  | Uruguai: Artigas; Tacuarembó  | 15       | Cone Sul             |



**FIGURA 3.** Divisões das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de *Myotis riparius* utilizadas como grupos independentes nas análises morfométricas multivariadas. As diferentes cores correspondem à alocação dessas OTUs às regiões biogeográficas em concordância com MORRONE (2014).

A fim de compreender a estruturação populacional de *M. riparius* a partir da variação encontrada, foram feitas análises morfométricas multivariadas exploratórias (componentes principais [*principal components analysis*, PCA]), confirmatórias (função discriminante das variáveis canônicas [*discriminant function analysis*, DFA]) e um teste de significância entre grupos (análise de variância multivariada [MANOVA]) com as amostras de *M. riparius* divididas nas OTUs. Para essas análises, foram selecionadas 12 das 16 medidas crânio-dentárias tomadas (CTC, CCI, LMt, LCx, LCI, LPO, LC, LMs, C-M, M1-M3, c-m, Cm). A redução no número de medidas utilizadas nas análises multivariadas tem como finalidade diminuir o número de variáveis correlacionadas, reduzindo o ruído na análise devido à redundância nos caracteres.

As análises morfométricas multivariadas requerem um conjunto de dados completos. Assim algumas medidas cranianas que não puderam ser tomadas (menos de 5% do conjunto de dados) foram estimadas a partir do conjunto de dados logaritmizados usando o algoritmo EM implementado no pacote Amelia II (HONAKER et al., 2011) para o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

As análises morfométricas multivariadas foram empregadas para (i) testar diferenças morfométricas entre grupos; (ii) caracterizar e discriminar amostras populacionais, explorando a variabilidade dentro da espécie; e (iii) para descrever padrões fenotípicos de variação. A morfometria linear multivariada reduz a dimensionalidade e explica a associação entre as variáveis observáveis e os fatores latentes, indicando quais são as variáveis mais importantes, além de permitir compreender de que maneira uma medida varia em relação às demais (MONTEIRO & REIS, 1999).

Para testar se as OTUs possuem a mesma média para as diferentes medidas cranianas, foi empregada uma Análise de Variância Multivariada unifatorial (MANOVA), usando a estatística lambda de Wilk ( $\lambda$ -Wilk) e o valor associado de  $F$  de Rao (TABACHNICK &

FIDELL, 2014). As comparações par-a-par foram feitas a partir do teste *Hotelling-pairwise*, onde é fornecido o valor de  $p$  com correção a partir do procedimento de Bonferroni para testes múltiplos. A correção de Bonferroni é utilizada para corrigir problemas de múltiplas comparações e consiste na realização de um teste  $t$  para cada par de médias com a finalidade de proteger a taxa de erro, evitando falso positivo e falso negativo no valor de  $p$  (DUNN et al., 1961). Devido ao baixo número de amostras, algumas OTUs que pertenciam ao mesmo domínio biogeográfico foram fusionadas para esta análise. A MANOVA foi feita usando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) com o pacote “dplyr” (WICKHAM et al., 2017).

Na PCA foi empregada matriz de covariâncias para identificar tendências gerais da variação no tamanho e forma do crânio do conjunto de dados, tratado como uma única amostra. Esse método analisa as relações entre um conjunto de variáveis que podem, ou não, estar correlacionadas, transformando-as em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas linearmente, chamadas de componentes principais (REIS, 1988). A DFA foi realizada com *bootstrap* (1.000 iterações), para avaliar quais caracteres craniométricos que melhor discriminam as amostras geográficas, onde a separação dos grupos, definidos previamente, é obtida através da maximização de uma função da razão entre a matriz de covariância entre e dentro dos grupos (REIS, 1988). Os métodos multivariados empregados basearam-se na decomposição da matriz de covariância dos caracteres craniométricos, incluindo a extração de eixos independentes de variação que resumam a variabilidade presente nas amostras reunidas em um só grupo (PCA); ou na variabilidade máxima entre grupos previamente definidos (DFA; MONTEIRO & REIS, 1999). As análises foram feitas utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008), com os pacotes ‘MASS’ (VANABLES & RIPLEY, 2002) e ‘Lattice’ (SARKAR, 2008).

A fim de reduzir possíveis ruídos por variação ontogenética, apenas indivíduos adultos—assim classificados pela ossificação das epífises, identificados pela ossificação das epífises (BRUNET-ROSSINI & WILKINSON, 2009)—foram utilizados nas análises morfométricas. Análises anteriores indicaram não haver dimorfismo sexual secundário em *M. riparius* (veja LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2001). Assim, todas as análises aqui descritas foram feitas com machos e fêmeas agrupados. Os indivíduos que apresentaram o maior e o menor tamanho (aferido pelo comprimento total do crânio), foram excluídos das análises a fim de evitar que os resultados fossem enviesados por indivíduos que possam conter medidas erradas ou que representem extremos de sua população (*outliers*).

### **3.4. Modelagem da distribuição geográfica**

Para determinar os limites geográficos atuais de *M. riparius*, foram realizadas modelagens de distribuição de espécies (*Species Distribution Modelling* [SDM]). Essas modelagens vêm sendo utilizadas na identificação de barreiras biogeográficas e inferências ecológicas úteis na identificação de espécies crípticas (e.g., RISSLER & APODACA, 2007; SOLEY-GUARDIA et al., 2016). A fim de compreender o padrão atual de distribuição recuperado para *M. riparius*, também foram realizadas modelagens de distribuição passada frente às mudanças climáticas do Quaternário a partir do período denominado de Último Máximo Glacial (*Last Glacial Maximum* [LGM]). Modelos de distribuição de LGM são especialmente úteis para compreender eventos de expansão, retração e isolamento populacional de determinados táxons a partir de mudanças da configuração espacial decorrentes das alterações climáticas (e.g., TÓTH et al., 2012; LEITE et al., 2016).

Para gerar os modelos foram compiladas 105 localidades de ocorrência de *M. riparius* a partir da revisão de espécimes depositados em coleções, sendo essa a única fonte de registro geográfico utilizada nesse trabalho. O uso de informações geográficas de literatura como

fonte de ocorrência de *M. riparius* foi descartada devido à dificuldade na identificação das espécies de *Myotis* do grupo *ruber*, o que poderia trazer incertezas ao modelo gerado. Quando disponíveis, as coordenadas geográficas foram obtidas na base de dados associada ao espécime da coleção de depósito ou de publicação original referente aos espécimes que foram utilizados para gerar os modelos. Quando não disponíveis, os nomes associados às coordenadas geográficas das localidades foram obtidos a partir de gazetteers (e.g., PAYNTER & CAPERTON, 1977; PAYNTER, 1982, 1985, 1993, 1997; STEPHENS & TRAYLOR, 1983; PAYNTER & TRAYLOR, 1991; BARQUEZ et al., 1999; GARDNER, 2008; PATTON et al., 2015). Todas as coordenadas foram plotadas no Google Earth (Keyhole Inc.) e contrastadas com a informação da localidade para verificar se havia algum erro. Em caso de inconsistências, o nome da localidade foi usado como fonte primária de recuperação das coordenadas geográficas. O Apêndice 2 reúne um gazetteer para as localidades de ocorrência de *M. riparius* utilizadas para gerar os modelos de distribuição.

Os modelos de distribuição geográfica atual e passada foram feitos usando o programa MaxEnt 3.4.1 (PHILLIPS et al., 2006) com seis variáveis climáticas (sazonalidade da temperatura, temperatura máxima do mês mais quente, temperatura mínima do mês mais frio, sazonalidade da precipitação, precipitação do mês mais úmido, precipitação do mês mais seco) derivadas do banco de dados WorldClim 1.4 (HIJMANS et al., 2005; <http://www.worldclim.org/>). Todas as variáveis foram utilizadas com resolução espacial de 2.5' (aproximadamente 5 km). As variáveis selecionadas possuem baixa colinearidade e são biologicamente relevantes, e já foram utilizadas em outros estudos com modelos de distribuição de morcegos (WEBER et al., 2010; MORATELLI et al., 2011b; WEBER & GRELE, 2012).

A fim de trazer maior confiabilidade ao modelo de distribuição do LGM, foram utilizados dois modelos climáticos distintos, CCSM4 (GENT et al., 2011) e MIROC-ESM

(WATANABE et al., 2011). Ambos são modelos globais que trabalham com a média dos dados climáticos do Holoceno pré-industrial, e que fazem inferências sobre o clima do Pleistoceno-Médio disponibilizando variáveis úteis para modelar as relações entre o clima e a distribuição de táxons. Apesar de possuírem a mesma finalidade, esses modelos utilizam bases de dados climáticos distintas.

Os modelos de distribuição geográfica atual e do LGM foram gerados utilizando 10 réplicas, particionando aleatoriamente 70% das ocorrências como treino (usadas para gerar o modelo) e 30% como teste (para validar o modelo). A utilização de réplicas é importante para diminuir a incerteza do modelo (já que a partição é aleatória) e para diminuir problemas de falta de independência espacial dos pontos de ocorrência, pois as ocorrências tendem a ser autocorrelacionadas no espaço. Os modelos finais (atual e LGM) foram gerados a partir da média aritméticas simples das réplicas, representando áreas de alta a baixa adequabilidade ambiental. Áreas de alta adequabilidade são aquelas que possuem as condições que satisfazem as necessidades ecológicas para a ocorrência da espécie (ELITH et al., 2006). A fim de tornar o mapa binário, facilitando a identificação de áreas de presença e ausência, usamos o limiar (*threshold*) *10 percentile training presence* (TPTP), onde a ausência da espécie é atribuída a áreas com valores de adequabilidade abaixo dos 10% com menor valor para as 105 localidades. As áreas de presença são atribuídas às demais regiões (acima dos 10%).

A estatística Área Sob a Curva ROC (*Area Under the Curve* [AUC]) foi aplicada para avaliar a performance e a confiabilidade dos modelos usando os dados de teste. Os valores da estatística AUC variam de 0 a 1 e quanto mais próximo de 1, maior a confiança de predição do modelo; valores próximos 0,50 indicam que não houve nenhuma capacidade preditiva e valores de AUC maiores que 0,75 são considerados como satisfatórios (DUDÍK et al., 2004; ELITH et al., 2006). Portanto, modelos com  $AUC < 0,75$  foram descartados.

## 4. RESULTADOS

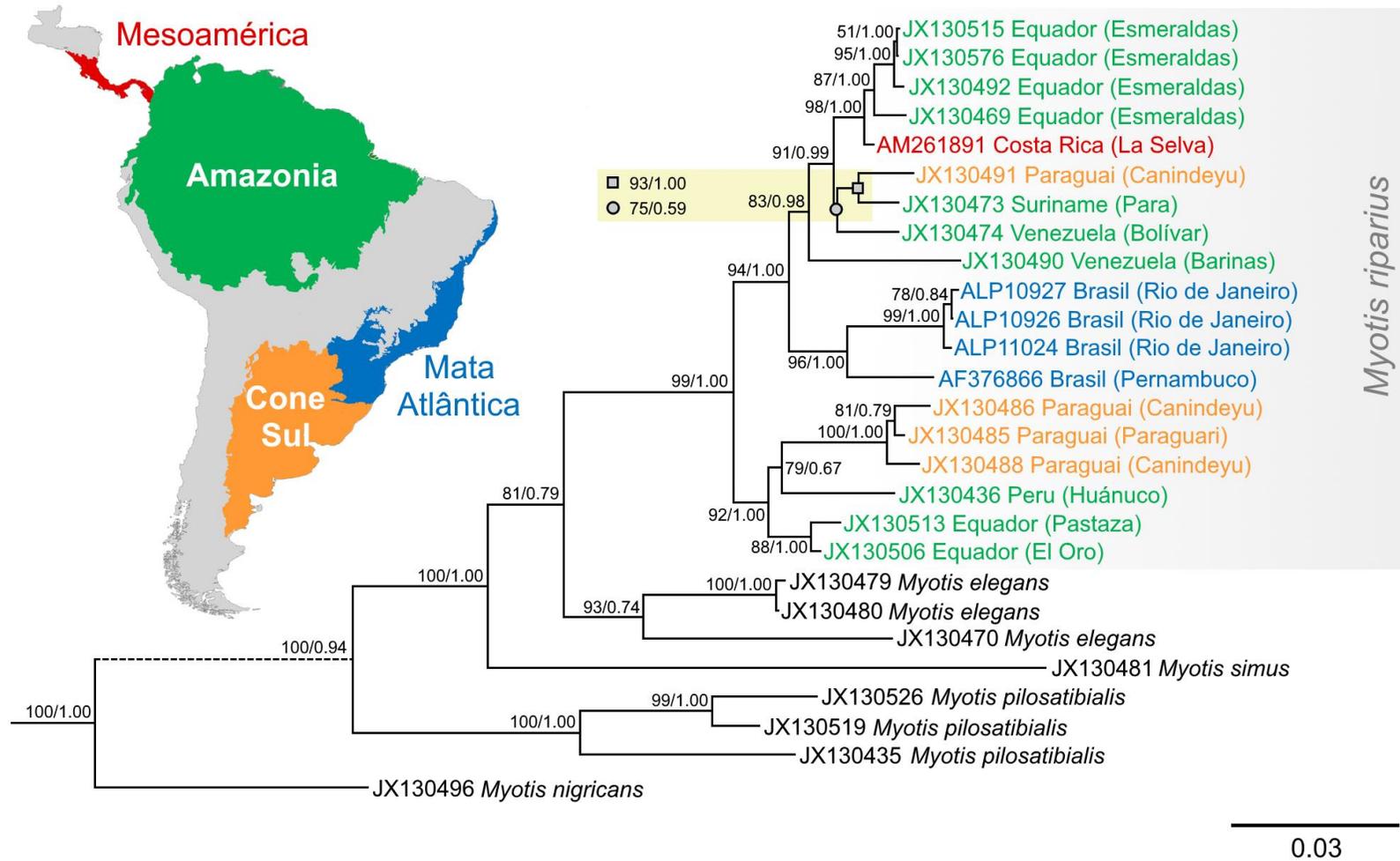
### 4.1. Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas de *Myotis riparius* (e demais espécies do grupo *ruber*) por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana apresentaram a mesma topologia (Figura 4). *M. riparius* foi recuperada como um grupo monofilético suportado por altos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior.

Três subclados foram identificados: o primeiro é formado predominantemente por espécimes amazônicos, com um indivíduo da América Central e outro do Cone Sul; o segundo clado é formado exclusivamente por amostras da Mata Atlântica brasileira; e o terceiro clado é um grupo misto formado por espécimes do Cone Sul (agrupados em um subgrupo menor) e espécimes amazônicos do extremo oeste da América do Sul. Essa topologia parece indicar uma tendência de estruturação geográfica, contudo, não foram formados grupos reciprocamente monofiléticos.

Estimativas feita a partir de Kimura 2-parâmetros indicam divergência intraespecífica média de 4,3% (variando de 0,2% a 6,9%) entre as sequências de *M. riparius* (Tabela 7). A divergência média de *M. riparius* e a espécie mais relacionada (*M. elegans*) é de 7,0% em média (variando de 5,1% a 9,2%). A divergência entre *M. riparius* e demais espécies do grupo *ruber* variou de 9,6% a 13,0% (Tabela 7).

Em relação às demais espécies do grupo *ruber*, *Myotis riparius* foi recuperada como espécie irmã de *M. elegans*, relação suportada por altos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. A linhagem formada por essas duas espécies foi a última a se dividir dentro do grupo *ruber*.



**FIGURA 4.** Reconstrução filogenética das espécies de *Myotis* do grupo *ruber* a partir do *cyt-b* (1140 pb) analisadas com os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI). O suporte dos nós foi inferido a partir de *bootstrap* para ML e probabilidade posterior para BI, sendo expressados nessa ordem na figura.

**TABELA 7.** Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de *Myotis riparius* e demais espécies do grupo *ruber* usando análise de Kimura de 2 parâmetros. As cores representam as regiões biogeográficas de origem das sequências de *M. riparius*, sendo: Mesoamérica = vermelho, Amazônia = verde, Mata Atlântica = azul, Cone Sul = laranja.

| Sequências | 1                        | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    | 25    | 26    |       |
|------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2          | JX130506                 | 0,035 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3          | JX130576                 | 0,009 | 0,039 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4          | JX130492                 | 0,011 | 0,041 | 0,002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 5          | JX130515                 | 0,009 | 0,039 | 0,000 | 0,002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 6          | JX130469                 | 0,015 | 0,045 | 0,009 | 0,011 | 0,009 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 7          | JX130513                 | 0,041 | 0,005 | 0,045 | 0,047 | 0,045 | 0,051 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 8          | JX130473                 | 0,032 | 0,035 | 0,033 | 0,035 | 0,033 | 0,035 | 0,041 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 9          | JX130474                 | 0,026 | 0,041 | 0,028 | 0,030 | 0,028 | 0,034 | 0,047 | 0,032 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 10         | JX130490                 | 0,041 | 0,047 | 0,047 | 0,045 | 0,047 | 0,053 | 0,053 | 0,049 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 11         | JX130436                 | 0,041 | 0,028 | 0,041 | 0,043 | 0,041 | 0,047 | 0,034 | 0,049 | 0,051 | 0,057 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 12         | AF376866                 | 0,035 | 0,037 | 0,039 | 0,041 | 0,039 | 0,045 | 0,043 | 0,043 | 0,037 | 0,043 | 0,051 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 13         | ALP10926                 | 0,043 | 0,045 | 0,047 | 0,049 | 0,047 | 0,053 | 0,051 | 0,053 | 0,049 | 0,055 | 0,049 | 0,026 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 14         | ALP10927                 | 0,043 | 0,045 | 0,047 | 0,049 | 0,047 | 0,053 | 0,051 | 0,053 | 0,049 | 0,055 | 0,049 | 0,026 | 0,004 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 15         | ALP11024                 | 0,045 | 0,047 | 0,049 | 0,051 | 0,049 | 0,055 | 0,053 | 0,055 | 0,051 | 0,057 | 0,051 | 0,028 | 0,002 | 0,005 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 16         | JX130485                 | 0,049 | 0,036 | 0,053 | 0,055 | 0,053 | 0,055 | 0,037 | 0,053 | 0,059 | 0,065 | 0,037 | 0,059 | 0,059 | 0,059 | 0,061 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 17         | JX130486                 | 0,059 | 0,045 | 0,063 | 0,065 | 0,063 | 0,065 | 0,047 | 0,063 | 0,065 | 0,067 | 0,043 | 0,065 | 0,065 | 0,065 | 0,067 | 0,009 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 18         | JX130491                 | 0,026 | 0,041 | 0,028 | 0,026 | 0,028 | 0,033 | 0,043 | 0,020 | 0,026 | 0,045 | 0,051 | 0,039 | 0,043 | 0,043 | 0,045 | 0,055 | 0,065 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 19         | JX130488                 | 0,053 | 0,039 | 0,057 | 0,059 | 0,057 | 0,059 | 0,041 | 0,057 | 0,063 | 0,069 | 0,041 | 0,063 | 0,063 | 0,063 | 0,065 | 0,007 | 0,016 | 0,059 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 20         | <i>M. elegans</i>        | 0,059 | 0,063 | 0,061 | 0,063 | 0,061 | 0,063 | 0,065 | 0,053 | 0,063 | 0,078 | 0,065 | 0,069 | 0,071 | 0,071 | 0,074 | 0,065 | 0,072 | 0,063 | 0,074 |       |       |       |       |       |       |       |
| 21         | <i>M. elegans</i>        | 0,057 | 0,061 | 0,059 | 0,061 | 0,059 | 0,061 | 0,063 | 0,051 | 0,061 | 0,076 | 0,063 | 0,067 | 0,074 | 0,074 | 0,076 | 0,063 | 0,070 | 0,061 | 0,072 | 0,002 |       |       |       |       |       |       |
| 22         | <i>M. cf. elegans</i>    | 0,067 | 0,076 | 0,073 | 0,075 | 0,073 | 0,071 | 0,082 | 0,071 | 0,080 | 0,092 | 0,078 | 0,078 | 0,084 | 0,084 | 0,086 | 0,080 | 0,086 | 0,078 | 0,088 | 0,063 | 0,065 |       |       |       |       |       |
| 23         | <i>M. pilosatibialis</i> | 0,114 | 0,117 | 0,123 | 0,125 | 0,123 | 0,121 | 0,119 | 0,116 | 0,130 | 0,130 | 0,130 | 0,117 | 0,130 | 0,130 | 0,133 | 0,119 | 0,121 | 0,125 | 0,128 | 0,117 | 0,114 | 0,123 |       |       |       |       |
| 24         | <i>M. pilosatibialis</i> | 0,107 | 0,101 | 0,116 | 0,119 | 0,116 | 0,114 | 0,108 | 0,103 | 0,123 | 0,114 | 0,114 | 0,106 | 0,112 | 0,112 | 0,114 | 0,108 | 0,105 | 0,116 | 0,116 | 0,105 | 0,103 | 0,107 | 0,028 |       |       |       |
| 25         | <i>M. pilosatibialis</i> | 0,118 | 0,107 | 0,128 | 0,130 | 0,128 | 0,125 | 0,110 | 0,105 | 0,130 | 0,130 | 0,121 | 0,108 | 0,114 | 0,114 | 0,116 | 0,114 | 0,116 | 0,123 | 0,123 | 0,099 | 0,096 | 0,114 | 0,053 | 0,051 |       |       |
| 26         | <i>M. simus</i>          | 0,096 | 0,096 | 0,100 | 0,098 | 0,100 | 0,094 | 0,098 | 0,098 | 0,098 | 0,107 | 0,107 | 0,094 | 0,102 | 0,102 | 0,105 | 0,103 | 0,101 | 0,096 | 0,109 | 0,098 | 0,096 | 0,102 | 0,127 | 0,125 | 0,131 |       |
| 27         | <i>M. nigricans</i>      | 0,148 | 0,155 | 0,158 | 0,160 | 0,158 | 0,146 | 0,160 | 0,155 | 0,170 | 0,162 | 0,151 | 0,151 | 0,155 | 0,155 | 0,158 | 0,158 | 0,163 | 0,167 | 0,158 | 0,143 | 0,141 | 0,167 | 0,158 | 0,141 | 0,162 | 0,160 |

## 4.2. Análises filogeográficas

Foram recuperados 18 haplótipos para 19 sequências do gene mitocondrial *cyt-b* ( $H_d = 99,4\%$ ). Apenas um haplótipo foi compartilhado por mais de um indivíduo, estando na população amazônica. Os demais haplótipos foram exclusivos para apenas um espécime (Tabela 8). A diversidade nucleotídica para toda a espécie foi alta ( $\pi = 4,1\%$ ), com variação intrapopulacional entre 1,7 e 3,2% (Tabela 8). A diversidade haplotípica e nucleotídica foi consideravelmente alta para todos os conjuntos populacionais, apresentando virtualmente o mesmo valor de  $H_d$  para todos os conjuntos populacionais, e valor de  $\pi$  mais baixo para a Mata Atlântica em relação à Amazônia e Cone Sul (Tabela 8). A estrutura intrapopulacional de *M. riparius* da Mesoamérica não foi incluída nos testes, pois apenas uma sequência está disponível para essa região.

O teste de neutralidade  $D$  de Tajima indicou valores negativos para todos os conjuntos populacionais e para toda a população analisada conjuntamente (Tabela 8). Valores negativos estão relacionados a uma grande quantidade de alelos raros presentes em altas frequências, o que indica que a população pode estar em processo de expansão após um estrangulamento genético recente que causou uma exclusão seletiva de alelos. Contudo, o teste  $FS$  de Fu indicou valores positivos para cada conjunto populacional, indicando retração populacional para todos os conjuntos populacionais, embora tenha indicado valor negativo quando todas as populações foram analisadas continuamente (Tabela 8). É importante ressaltar que não houve significância estatística para os dois testes de neutralidade aplicados.

A análise de variância molecular indicou que a variação genética é praticamente a mesma dentro das populações e entre as populações (Tabela 9). O índice de fixação geral foi significativo ( $F_{ST} = 0,538$ ;  $p = 0,003$ ), indicando que existe tendência à estruturação entre as populações.

Os índices de fixação entre os diferentes conjuntos populacionais indicam existir uma tendência de estruturação populacional para os indivíduos da Mata Atlântica em relação aqueles de populações da Amazônia e Cone Sul ( $F_{ST} > 0,60$ ;  $p < 0,05$ ). Já os demais conjuntos populacionais apresentaram menores valores do índice de fixação entre si. Além disso, essa análise indica que as populações da Mesoamérica da Amazônia são panmíticas (Tabela 10).

A rede de haplótipos não apresentou compartilhamento de haplótipos entre os conjuntos populacionais geográficos e os haplótipos foram agrupados em pequenos *clusters* bem distribuídos pelas populações, não havendo haplótipo central na rede (Figura 5). A rede indica uma sutil tendência à estruturação espacial, concordando com o que foi obtido pela reconstrução filogenética.

**TABELA 8.** Diversidade haplotípica e testes de neutralidade de *Myotis riparius*. As métricas incluem: número de amostras ( $N$  amostras), número de sítios ( $N$  sítios), número de sítios variáveis ( $S$ ), número total de mutações ( $\text{Eta}$ ), número de haplótipos ( $h$ ), diversidade haplotípica ( $Hd$ ), variância da diversidade haplotípica ( $Hd \text{ Var}$ ), desvio padrão da diversidade haplotípica ( $Hd \text{ SD}$ ), diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi$ ), variância da diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi \text{ Var}$ ), desvio padrão da diversidade de nucleotídeos por sítio ( $\pi \text{ SD}$ ), theta por sequência a partir do número de sítios variados ( $\theta \text{ Seq}$ ) e theta por sítio a partir do número de sítios variados ( $\theta \text{ Sit}$ ).

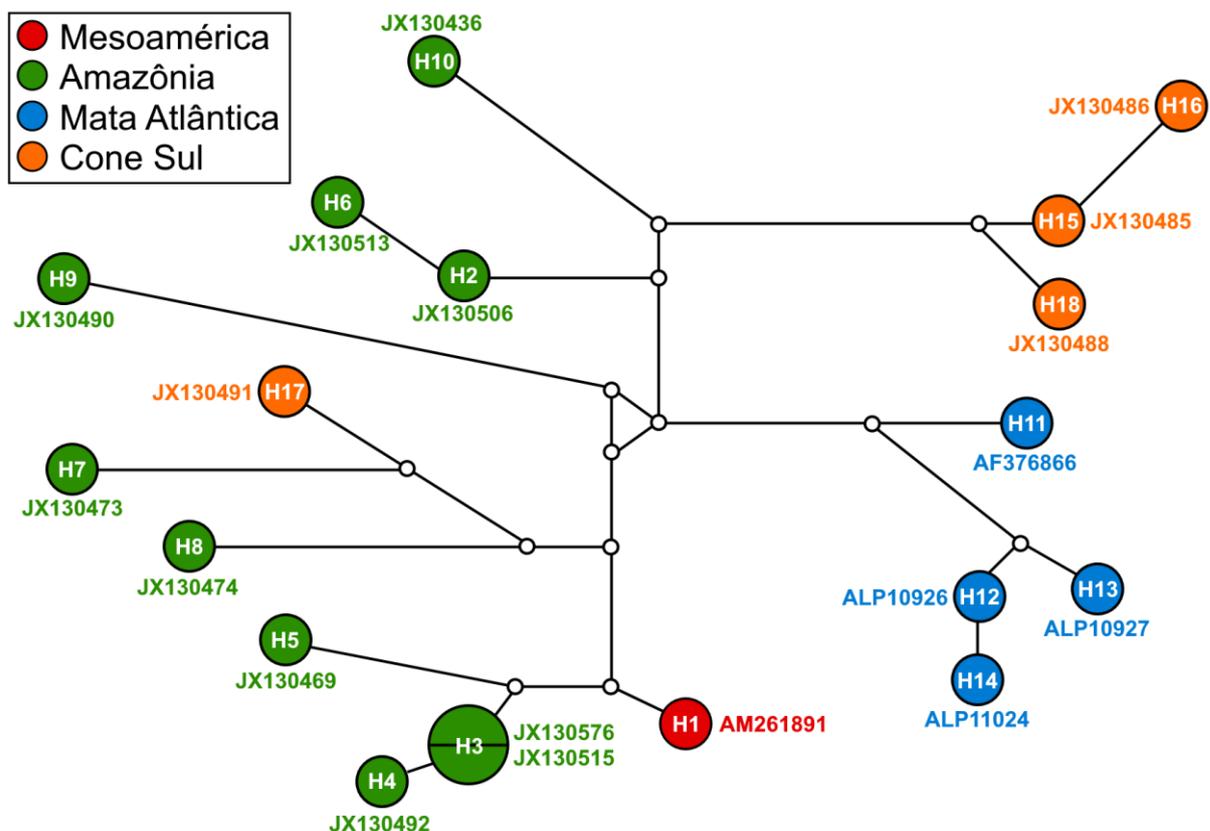
| MÉTRICAS             | MESO-AMÉRICA | AMAZÔNIA | MATA ATLÂNTICA | CONE SUL | TOTAL  |
|----------------------|--------------|----------|----------------|----------|--------|
| $N$ amostras         | 1            | 10       | 4              | 4        | 19     |
| $N$ sítios           | 1140         | 1140     | 1140           | 1140     | 1140   |
| $S$                  | -            | 99       | 25             | 72       | 90     |
| $\text{Eta}$         | -            | 101      | 25             | 72       | 94     |
| $h$                  | -            | 9        | 4              | 4        | 18     |
| $Hd$                 | -            | 0,978    | 1,000          | 1,000    | 0,994  |
| $Hd \text{ Var}$     | -            | 0,002    | 0,031          | 0,031    | 0,000  |
| $Hd \text{ SD}$      | -            | 0,054    | 0,177          | 0,177    | 0,019  |
| $\pi$                | -            | 0,032    | 0,017          | 0,032    | 0,041  |
| $\pi \text{ SD}$     | -            | 0,004    | 0,007          | 0,012    | 0,002  |
| $\theta \text{ Seq}$ | -            | 34,995   | 13,636         | 39,273   | 25,750 |
| $\theta \text{ Sit}$ | -            | 0,036    | 0,018          | 0,034    | 0,046  |
| Tajima D             | -            | -0,680   | -0,732         | -0,692   | -0,587 |
| $p$                  | -            | 0,246    | 0,255          | 0,267    | 0,442  |
| Fu-Fs                | -            | 0,360    | 3,556          | 1,760    | -3,820 |
| $p$                  | -            | 0,351    | 0,582          | 0,503    | 0,478  |

**TABELA 9.** Análise de variância molecular de *Myotis riparius*.

| VARIAÇÃO              | D.F. | SOMA DOS QUADRADOS | COMPONENTES DA VARIÂNCIA | PORCENTAGEM DA VARIAÇÃO |
|-----------------------|------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre populações      | 3,0  | 838,889            | 57,592                   | 53,9                    |
| Dentro das populações | 15,0 | 738,900            | 49,600                   | 46,1                    |
| <b>Total</b>          | 18   | 1577.789           | 106.852                  | 100                     |

**TABELA 10.** Valores do Índice de fixação ( $F_{ST}$ ; diagonal inferior) e de significância estatística ( $p$ -value; diagonal superior), para as amostras de *Myotis riparius*. Valores em negrito indicam alta significância estatística.

| GRUPOS         | MESOAMÉRICA | AMAZÔNIA     | MATA ATLÂNTICA | CONE SUL    |
|----------------|-------------|--------------|----------------|-------------|
| Mesoamérica    |             | $p = 0,999$  | $p = 0,195$    | $p = 0,416$ |
| Amazônia       | -0,658      |              | $p = 0,001$    | $p = 0,089$ |
| Mata Atlântica | 0,362       | <b>0,663</b> |                | $p = 0,027$ |
| Cone Sul       | 0,207       | 0,123        | <b>0,637</b>   |             |

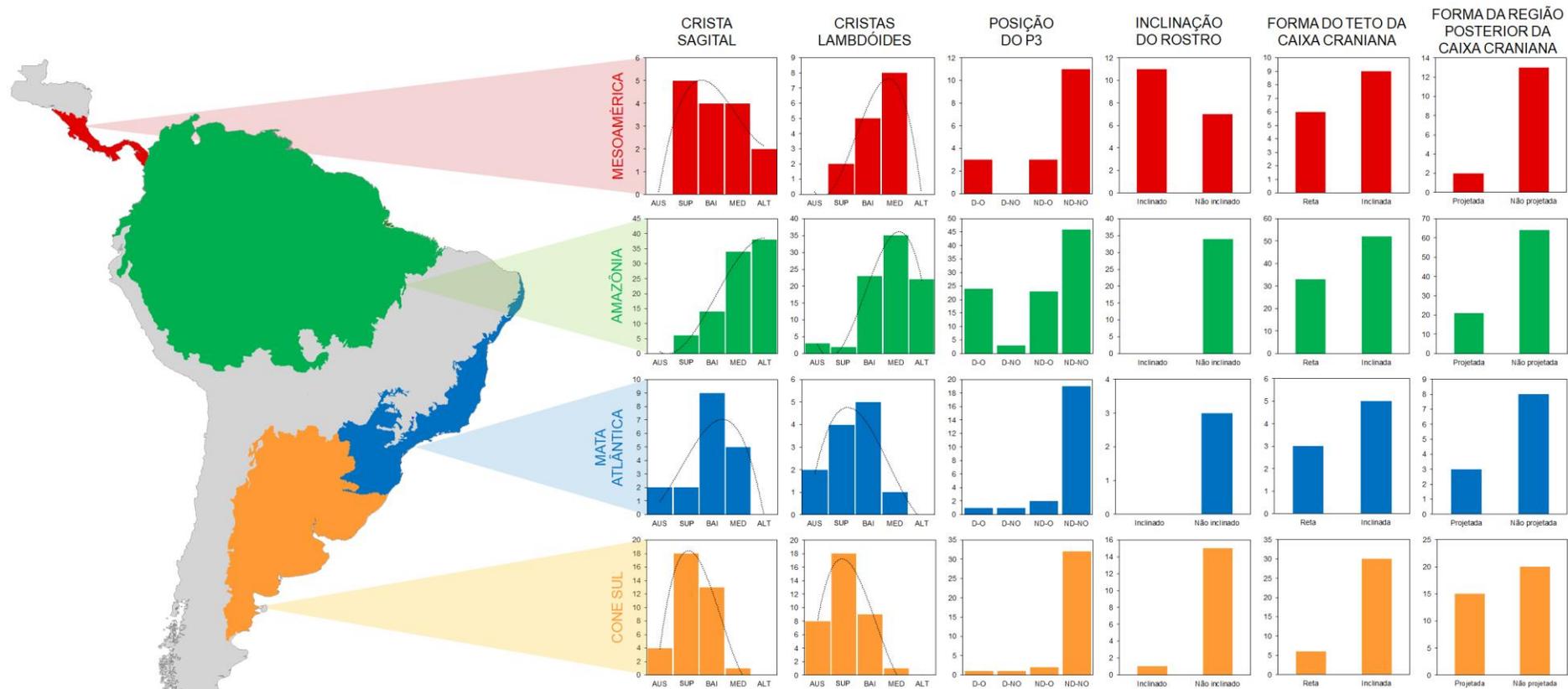
**FIGURA 5.** Rede de haplótipos de *Myotis riparius* construída a partir de sequências de cyt-b. As cores indicam as localidades de origem do haplótipo/indivíduo.

### 4.3. Análises morfométricas

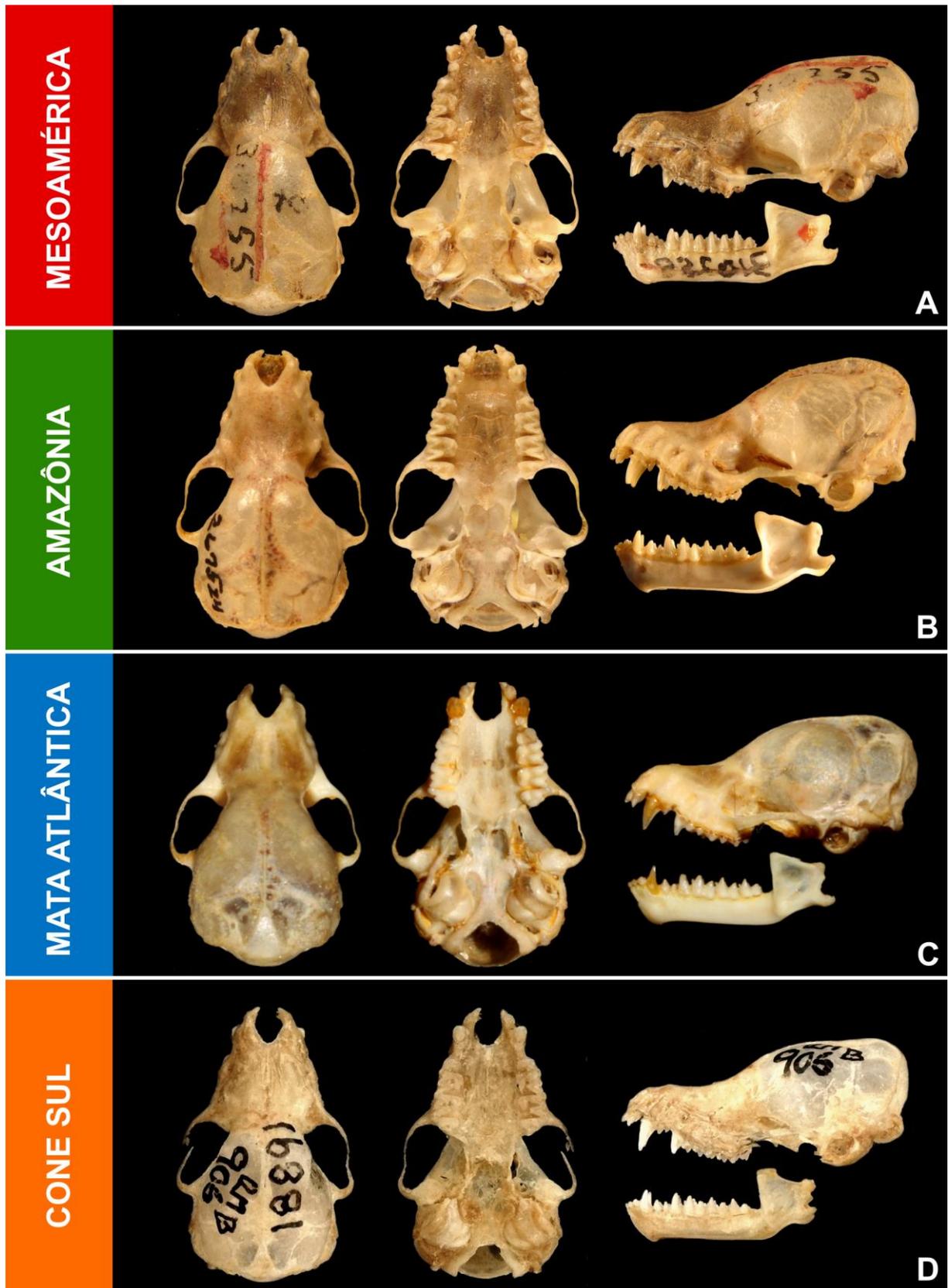
No geral, as amostras da Mata Atlântica (média do comprimento do antebraço [ $\bar{x}_{AB}$ ] = 34,9 e média do comprimento total do crânio [ $\bar{x}_{CTC}$ ] = 13,7) e Cone Sul ( $\bar{x}_{AB}$  = 34,7 e  $\bar{x}_{CTC}$  = 13,8) apresentaram tamanho menor quando comparadas com as amostras da Amazônia ( $\bar{x}_{AB}$  = 36,2 e  $\bar{x}_{CTC}$  = 14,1) e Mesoamérica ( $\bar{x}_{AB}$  = 36,9 e  $\bar{x}_{CTC}$  = 14,2). Outras medidas contrastando os grupos entre as diferentes regiões biogeográficas estão disponíveis na Tabela 11.

A análise de variância multivariada indicou pouca diferença significativa geral entre os conjuntos populacionais ( $\lambda$ -Wilk = 0,074;  $F$  = 3,023). Os resultados da análise par-a-par corrigido pelo procedimento de Bonferroni indicou que não há diferença significativa entre os grupos, com exceção das amostras do Peru (OTU 14) que apresentou diferença significativa entre o conjunto de amostras da Mata Atlântica e do Paraguai (Tabela 12).

As análises morfométricas multivariadas baseadas nas dimensões cranianas não recuperaram estruturação geográfica de *M. riparius* a partir das amostras delimitadas pelas OTUs. Também não foi verificado qualquer indício de descontinuidade entre as amostras. Contudo, houve uma sutil tendência de agrupamento das populações dentro de uma mesma região biogeográfica. Os grupos da Mata Atlântica e Cone Sul foram os que apresentaram a maior sobreposição. Por outro lado, os grupos da Mata Atlântica e da América Central (Mesoamérica) apresentaram pouca sobreposição (Figura 9). Apesar dessa sutil estruturação, existe ampla sobreposição entre os grupos da Amazônia com as demais amostras populacionais (Figura 9).



**FIGURA 6.** Variação dos caracteres cranianos qualitativos em *Myotis riparius*. Abreviações para as cristas sagital de lambdoides são: AUS = ausente, SUP = superficial, BAI = baixa, MED = média, ALT = alta. Abreviações para a posição do P3 são: D-O = deslocado e oculto em vista lateral, D-NO = deslocado e não oculto em vista lateral, ND-O = não deslocado e oculto em vista lateral, ND-NO = não deslocado e não oculto em vista lateral. Os números de indivíduos utilizados na análise estão distribuídos no eixo y.



**FIGURA 7.** Vista dorsal (esquerda), ventral (centro) e lateral (direita superior) do crânio e vista lateral da mandíbula de *Myotis riparius* para cada região biogeográfica. A. Darién, Panamá (USNM 310255 [holótipo]); B. Paracou, Guiana Francesa (AMNH 266366); C. Rio de Janeiro, Brasil (ALP 10927); D. Jujuy, Argentina (OMNH 18891).

Os dois primeiros componentes (PC1 e PC2) foram responsáveis por 84,2% da variação morfométrica (Figura 5A). Os demais componentes foram responsáveis, individualmente, por menos de 2% da variação e por isso foram desconsiderados. Devido aos valores positivos apresentados pelas correlações vetoriais (Tabela 13), assume-se que o primeiro componente principal (PC1) corresponde ao tamanho, enquanto o segundo componente principal (PC2) corresponde ao tamanho e à forma do crânio. As medidas relacionadas ao comprimento total do crânio e do rosto estão fortemente relacionadas ao PC1, enquanto medidas relacionadas à largura da caixa craniana, largura mastoidea e largura do processo pós-orbitário apresentam menor correlação com o primeiro componente (Figura 9B).

Apesar da sobreposição, os resultados revelam que as amostras populacionais da Mata Atlântica e Cone Sul (Figura 9A; azul e laranja, respectivamente) compreendem indivíduos com crânios menores, em média, que aqueles da Mesoamérica (Figura 9A; vermelho) e da maioria dos grupos da Amazônia (Figura 9A; verde). Além disso, amostras populacionais da Mesoamérica e Amazônia estão amplamente sobrepostas quanto ao tamanho do crânio.

O primeiro e segundo eixos da análise de função discriminante (DF1 e DF2) apresentaram, respectivamente, 43,7% e 19,4% da variação total (Figuras 9C). Ao longo do primeiro eixo da Mata Atlântica e Cone Sul (Figura 9C; azul e laranja, respectivamente) se diferenciam parcialmente das amostras da Amazônia e Mesoamérica (Figura 9C; verde e vermelho, respectivamente), não havendo qualquer distinção ao longo do segundo eixo. As amostras da Mesoamérica revelaram-se mais similares às da Amazônia, com ampla sobreposição ao longo dos dois primeiros eixos. As medidas cranianas relacionadas ao comprimento do crânio apresentaram coeficientes de correlação positivos e com altos valores (Tabela 13), indicando que essas medidas tiveram a maior contribuição no modelo, sendo mais úteis para a distinção parcial destes grupos.

**TABELA 11.** Medidas de amostras selecionadas de *Myotis riparius* com a variação morfométrica e número de amostras (*N*). As medidas estão em milímetros (mm).

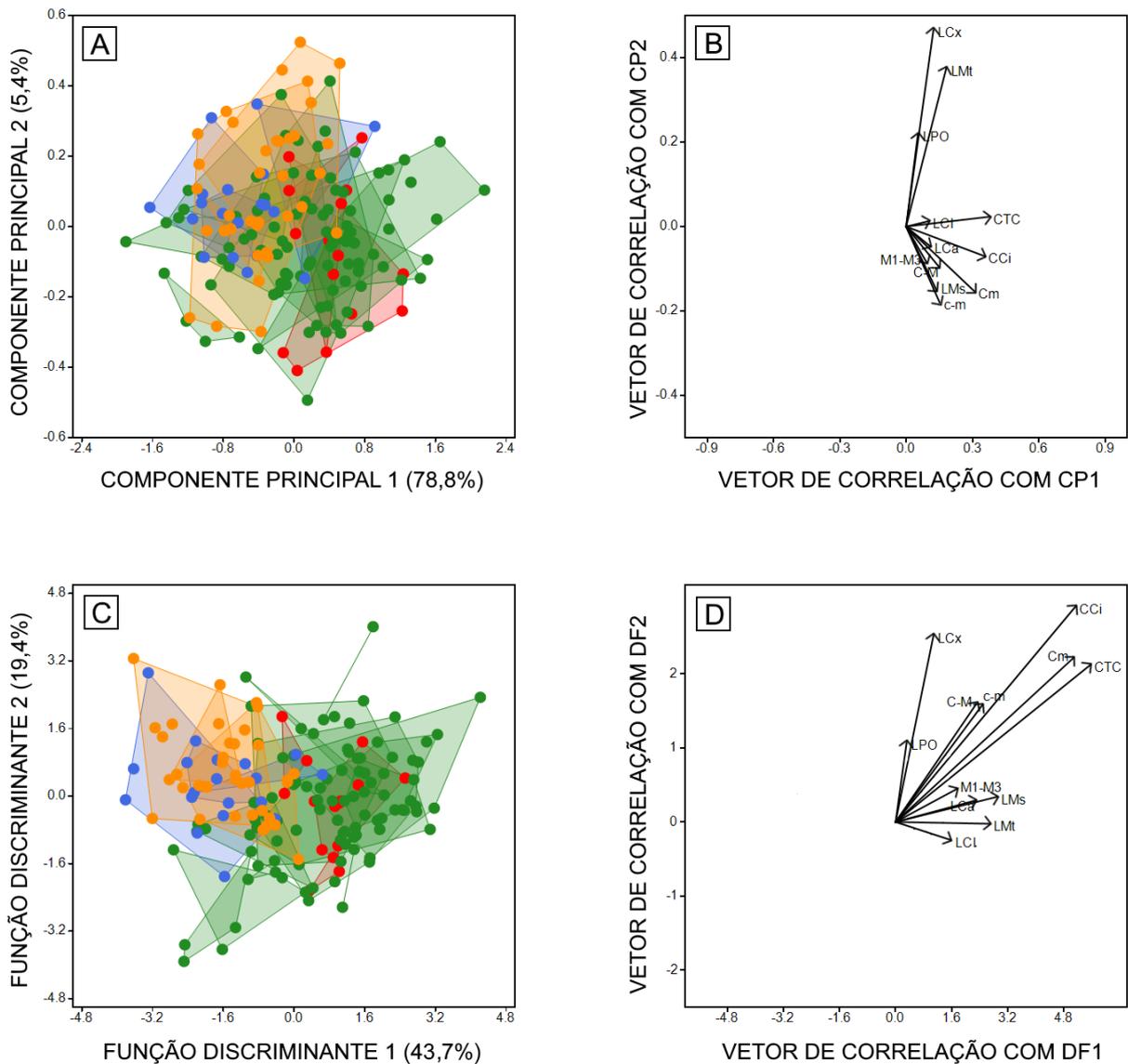
| MEDIDAS | MESOAMÉRICA                | AMAZÔNIA                   | MATA ATLÂNTICA             | CONE SUL                   |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|         | MÉDIA (MÍN - MÁX) <i>N</i> |
| CT      | 87 (81–93) 9               | 83 (75–93) 61              | 75 (70–84) 5               | 84 (87–90) 28              |
| Orelha  | 13 (12–14) 9               | 12,0 (10–13) 55            | 10 (9–11) 5                | 13 (9–14) 24               |
| Peso    | 5 (5–6) 3                  | 5 (3–7) 41                 | 5 (4–7) 5                  | 6 (4–7) 26                 |
| AB      | 36,9 (35,2–39,1) 14        | 36,2 (33,0–37,8) 85        | 34,9 (32,5–38,6) 15        | 34,7 (31,8–36,3) 30        |
| 3MC     | 33,8 (21,9–36,1) 14        | 33,6 (30,7–36,5) 78        | 32,9 (31,8–33,7) 10        | 32,5 (29,2–34,5) 29        |
| CPD     | 7 (6–7) 3                  | 6 (5–8) 59                 | 6 (5–7) 6                  | 7 (5–8) 21                 |
| CPV     | 5 (5–6) 3                  | 5 (4–7) 59                 | 5 (4–6) 3                  | 6 (4–8) 21                 |
| Cm      | 10,30 (10,02–10,68) 15     | 10,18 (9,31–11,31) 84      | 9,83 (9,41–10,51) 19       | 9,92 (9,62–10,33) 25       |
| c-m     | 5,71 (5,56–5,94) 15        | 5,62 (5,05–6,08) 93        | 5,44 (5,32–5,71) 19        | 5,51 (5,25–5,78) 30        |
| CTC     | 14,25 (13,91–14,77) 15     | 14,13 (13,18–15,15) 94     | 13,77 (13,27–14,48) 18     | 13,87 (13,39–14,49) 36     |
| CCi     | 13,45 (13,06–13,94) 15     | 13,29 (12,13–14,28) 94     | 12,94 (12,36–13,64) 18     | 13,07 (12,62–13,52) 36     |
| LMt     | 7,28 (6,98–7,62) 15        | 7,24 (6,76–7,82) 95        | 7,01 (6,65–7,61) 18        | 7,12 (6,65–7,68) 31        |
| LCx     | 6,47 (6,19–6,78) 15        | 6,48 (5,96–7,01) 95        | 6,45 (6,30–6,75) 19        | 6,53 (6,18–6,84) 35        |
| LCI     | 4,77 (4,56–5,06) 15        | 4,66 (4,33–5,15) 95        | 4,57 (4,38–4,75) 19        | 4,58 (4,30–5,04) 35        |
| LPO     | 3,56 (3,38–3,77) 15        | 3,49 (3,13–3,79) 95        | 3,48 (3,29–3,62) 19        | 3,53 (3,27–3,78) 34        |
| LCa     | 3,80 (3,66–4,01) 15        | 3,83 (3,47–4,32) 95        | 3,65 (3,48–3,95) 19        | 3,66 (3,45–3,91) 33        |
| LMs     | 5,72 (5,58–5,86) 15        | 5,68 (5,26–6,05) 95        | 5,43 (5,19–5,72) 19        | 5,47 (5,16–5,76) 35        |
| C-M     | 5,33 (5,11–5,61) 15        | 5,26 (4,73–5,69) 95        | 5,10 (4,87–5,52) 19        | 5,15 (4,96–5,37) 36        |
| M1-M3   | 2,04 (2,91–3,19) 14        | 3,02 (2,69–3,20) 95        | 2,88 (2,74–3,05) 19        | 2,92 (2,79–3,03) 36        |
| CCc     | 12,56 (12,24–13,04) 15     | 12,40 (11,31–13,35) 94     | 12,07 (11,49–12,68) 19     | 12,22 (11,75–12,77) 36     |
| CCb     | 13,20 (12,84–13,67) 15     | 13,00 (11,84–14,04) 94     | 12,68 (12,13–13,56) 18     | 12,83 (12,17–13,33) 36     |
| CBa     | 12,02 (11,65–12,42) 15     | 11,89 (10,80–12,77) 92     | 11,53 (10,90–12,42) 19     | 11,65 (11,22–12,10) 36     |
| LZg     | 8,99 (8,80–9,36) 9         | 9,07 (8,54–9,97) 52        | 8,68 (8,15–9,40) 8         | 8,72 (8,54–9,01) 13        |

**TABELA 12.** Valores de  $p$  para o teste de Hotelling par-a-par corrigidos pelo procedimento de Bonferroni obtidos por Análise de Variância Multivariada aplicada a 12 medidas cranianas de *Myotis riparius* classificados em 21 unidades taxonômicas operacionais. Valores estatisticamente significantes estão destacados em negrito. Asterisco indica falha na análise devido a diferenças no tamanho amostral.

| OTUs              | 1, 2, 3 | 4, 5, 6 | 7      | 8, 9   | 10     | 11     | 12, 13 | 14           | 15     | 16, 17, 18 | 19     | 20     |
|-------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------|------------|--------|--------|
| <b>4, 5, 6</b>    | 3,936   |         |        |        |        |        |        |              |        |            |        |        |
| <b>7</b>          | 17,184  | 2,816   |        |        |        |        |        |              |        |            |        |        |
| <b>8, 9</b>       | 35,776  | 51,098  | 56,538 |        |        |        |        |              |        |            |        |        |
| <b>10</b>         | 48,191  | 14,316  | 36,067 | 65,488 |        |        |        |              |        |            |        |        |
| <b>11</b>         | 13,538  | 1,864   | 25,770 | 30,910 | 62,703 |        |        |              |        |            |        |        |
| <b>12, 13</b>     | 62,195  | 58,915  | 54,219 | *      | *      | 76,386 |        |              |        |            |        |        |
| <b>14</b>         | 15,587  | 0,757   | 10,315 | 40,447 | 61,228 | 11,242 | 42,222 |              |        |            |        |        |
| <b>15</b>         | 28,599  | 0,932   | 13,973 | 35,553 | 46,640 | 7,042  | 44,628 | 10,095       |        |            |        |        |
| <b>16, 17, 18</b> | 0,192   | 3,474   | 0,151  | 56,141 | 1,266  | 0,045  | 18,852 | <b>0,030</b> | 0,272  |            |        |        |
| <b>19</b>         | 0,297   | 1,446   | 0,079  | 36,175 | 1,652  | 0,090  | 30,122 | <b>0,006</b> | 0,238  | 53,685     |        |        |
| <b>20</b>         | 27,766  | 50,302  | 11,661 | *      | *      | 32,263 | *      | 8,743        | 31,767 | 43,823     | 53,583 |        |
| <b>21</b>         | 2,594   | 4,342   | 3,044  | 69,518 | 10,555 | 2,154  | 44,168 | 2,681        | 2,670  | 31,904     | 7,508  | 46,358 |

**TABELA 13.** Coeficientes de correlação (*loadings*) dos componentes principais e funções discriminantes das análises morfométricas multivariadas aplicadas 12 medidas cranianas de *Myotis riparius*.

| MEDIDAS | COMPONENTES PRINCIPAIS |        | FUNÇÕES DISCRIMINANTES |        |
|---------|------------------------|--------|------------------------|--------|
|         | CP1                    | CP2    | FD1                    | FD2    |
| Cm      | 0.433                  | -0.214 | -3.712                 | -0.043 |
| c-m     | 0.213                  | -0.252 | 1.862                  | -4.646 |
| CTC     | 0.525                  | 0.032  | -1.511                 | 3.140  |
| CCi     | 0.498                  | -0.098 | 2.287                  | -2.596 |
| LMt     | 0.254                  | 0.525  | -0.634                 | 5.273  |
| LCx     | 0.173                  | 0.653  | 1.542                  | -7.518 |
| LCI     | 0.140                  | 0.017  | 0.067                  | 1.231  |
| LPO     | 0.075                  | 0.307  | 1.462                  | -1.280 |
| LCa     | 0.152                  | -0.064 | -3.190                 | -1.232 |
| LMs     | 0.193                  | -0.212 | -2.369                 | 2.181  |
| C-M     | 0.208                  | -0.134 | -0.796                 | 1.472  |
| M1-M3   | 0.128                  | -0.117 | -5.952                 | -0.628 |



**FIGURA 8.** Análise de componentes principais (A e B) e das Funções Discriminantes (C e D) de *Myotis riparius*. Os conjuntos populacionais foram divididos conformes as OTUs determinadas e a coloração indica a região biogeográfica, sendo: vermelho = Mesoamérica, verde = Amazônia, azul = Mata Atlântica e laranja = Cone Sul. Os nomes para as legendas das medidas utilizadas no gráfico estão disponíveis na Tabela 5.

#### 4.4. Análises morfológicas

##### 4.4.1. Coloração da pelagem

As amostras identificadas como *Myotis riparius* apresentaram marcante variação morfológica, sobretudo entre os grandes conjuntos divididos a partir das regiões biogeográficas. No geral, a maior parte dos espécimes de *M. riparius* de toda a área de distribuição apresentou pelagem dorsal unicolorida, variando de castanho-escuro a castanho-claro com tonalidades avermelhadas ou alaranjadas. Já a pelagem ventral é bicolorida, com pouco ou acentuado contraste entre as bandas, sendo a base mais escura e o ápice mais claro, variando de castanho-amarelado a dourado. Uma descrição das variações por cada região biogeográfica está disponível abaixo.

Espécimes da Mesoamérica apresentam pelagem dorsal lanosa, longa (CPD 6,6–7,8 mm) e unicolorida, variando de castanho-escuro (e.g., ROM 99936) a castanho-avermelhado semelhante à cor da canela em pó (e.g., FMNH 180728). Já a pelagem ventral é bicolorida com bastante contraste entre as bandas, com a base castanho-claro e o ápice amarelo pálido (Figura 6A).

Os espécimes da Amazônia apresentaram a maior variação da coloração. Indivíduos de El Oro, no Equador, apresentaram pelagem dorsal lanosa, longa (CPD 6,6) e unicolorida, amarelo-escuro (e.g., TTU 102438). A pelagem ventral é bicolorida com pouco contraste entre as bandas, sendo a base amarelo-escuro e o ápice dourado (Figura 6B). Por outro lado, espécimes de Paracou, Guiana Francesa, apresentaram pelagem dorsal longa (CPD 6,6–7,2) e unicolorida de coloração castanha (e.g., AMNH 266366), enquanto a pelagem ventral é bicolorida, com forte contraste entre as bandas, sendo a base castanho-escuro e ápice amarelo-creme (Figura 6C). Outra variação da coloração também está presente em indivíduos do Pará, Brasil, que apresentam pelagem dorsal longa (CPD 6,3–7,4) e unicolorida de coloração castanho-alaranjado brilhante (e.g., USMN 549517). A pelagem

ventral é bicolorida com pouco contraste entre as bandas, sendo a base levemente mais escura que o ápice, que possui coloração laranja (Figura 6D).

A maior parte dos espécimes da Mata Atlântica apresentou pelagem dorsal um pouco mais curta (CPD 5,8–7,1) quando comparada às amostras da Amazônia e Mesoamérica. A pelagem dorsal é unicolorida, castanho-escura ou castanho-avermelhada (e.g., ALP 4573). A pelagem do ventre é bicolorida, com notável contraste entre as bandas, sendo a base de coloração castanho-escura e o ápice variando de castanho-claro a amarelo-creme (Figura 6E). É importante ressaltar que alguns indivíduos da Mata Atlântica possuem pelagem dorsal castanho-avermelhada (e.g., ALP 6623), assim como o comumente encontrado em indivíduos da Amazônia, contudo, aparentemente essa é uma condição bastante rara nessa população.

Espécimes do Cone Sul possuem pelagem dorsal unicolorida variando de castanho-enebecida a castanho-avermelhada. A pelagem ventral é bicolorida com acentuado contraste, onde a base varia de castanho-médio a castanho-escuro e o ápice geralmente é amarelo-claro (Figura 6F).

#### *4.4.2. Ocorrência e desenvolvimento das cristas sagital e lambdoides*

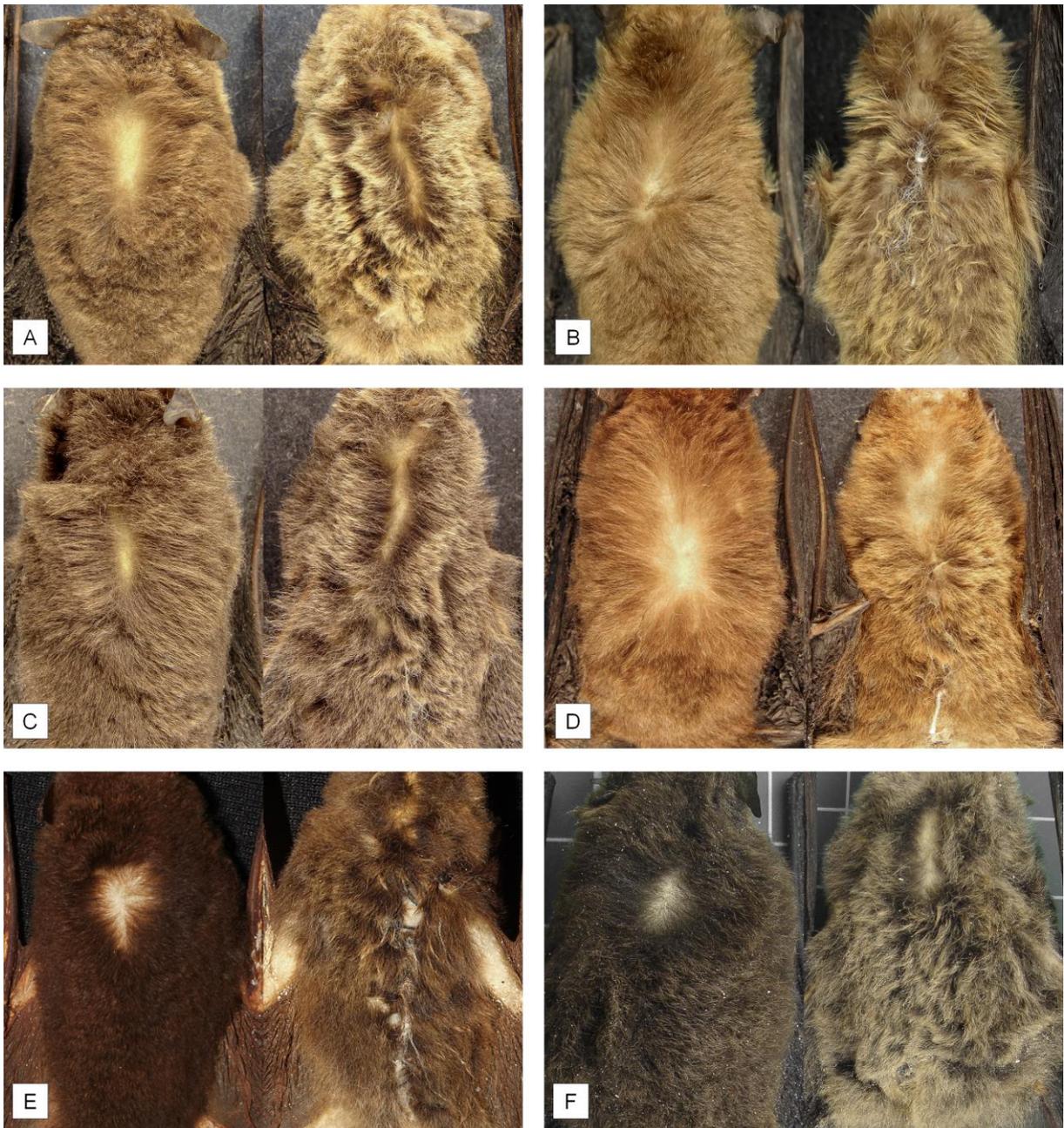
Caracteres cranianos apresentaram variação interpopulacional, especialmente para as cristas sagital e lambdoides, que variaram de altas na maioria dos indivíduos da Amazônia até ausentes em uma parcela considerável das amostras da Mata Atlântica e Cone Sul (Figura 7). Mais da metade dos espécimes provenientes da Mesoamérica (60%) apresentaram a crista sagital superficial ou baixa, enquanto 26% apresentaram crista mediana e 13% apresentaram a crista sagital alta. Padrão inverso é encontrado em indivíduos da Amazônia, onde 78% dos possuem crista média ou alta, 15% possuem a crista baixa e apenas 6% possuem crista superficial. Na Mata Atlântica predominam indivíduos com crista

sagital baixa ou mediana (77%). No Cone Sul predominam indivíduos com crista sagital superficial ou baixa (86%). Nessas populações não há indivíduos com crista sagital alta, e cerca de 10% dos indivíduos de ambas as regiões biogeográficas não possuem crista sagital.

A maior parte dos espécimes da América Central possui cristas lambdoides baixas ou médias (86%), enquanto uma minoria possui as cristas superficiais (14%). Nenhum dos indivíduos mesoamericanos possui cristas lambdoides altas. Já na Amazônia existe uma maior variação desse caráter: 41% possui cristas médias, em torno de 25% para cristas baixas e 25% para cristas altas os demais (8%) possuem cristas lambdoides superficiais ou ausentes. Na Mata Atlântica e Cone Sul a maior parte dos indivíduos tem cristas lambdoides variando de superficiais a baixas (75% para ambas regiões biogeográficas) e uma minoria com cristas médias (8% para Mata Atlântica e 3% para Cone Sul), com uma parte considerável das amostras dessas populações não possui cristas lambdoides (16% e 22% para Mata Atlântica e Cone Sul, respectivamente).

#### *4.4.3. Posição do terceiro pré-molar superior*

A posição do terceiro pré-molar superior (P3) mostrou variação para as amostras da Mesoamérica e Amazônica, predominando indivíduos com P3 alinhado à série de dentes (não deslocado) e visível em posição labial (não oculto). Contudo, a outra metade das amostras dessas regiões biogeográficas correspondem a indivíduos com P3 alinhado ou deslocado, estando ou não visível em vista lateral. Já em amostras da Mata Atlântica e Cone Sul esse caráter apresentou-se menos variável e quase todos os espécimes possuem o P3 alinhado e visível em vista lateral (Figura 7).



**FIGURA 9.** Variação da coloração da pelagem dorsal e ventral, respectivamente, em *Myotis riparius*. A. Darién, Panamá (USMN 310255; holótipo); B. El Oro, Equador (TTU 102438); C. Paracou, Guiana Francesa (AMNH 266366); D. Pará, Brasil (USMN 549517); E. Rio de Janeiro, Brasil (ALP 4573); F. Entre Ríos, Argentina (MLP 2048). Fotos: A–D, Ricardo Moratelli; E, Roberto L.M. Novaes; F, Maria Ayelen Lutz.

#### 4.4.4. Inclinação do rostro

Espécimes com rostro inclinado representaram a maior parte da amostra (61%) da América Central, enquanto na Amazônia, Mata Atlântica e Cone Sul predominaram quase totalmente os espécimes com rostro não inclinado (Figura 7).

#### 4.4.5. Forma do teto e da região posterior da caixa craniana

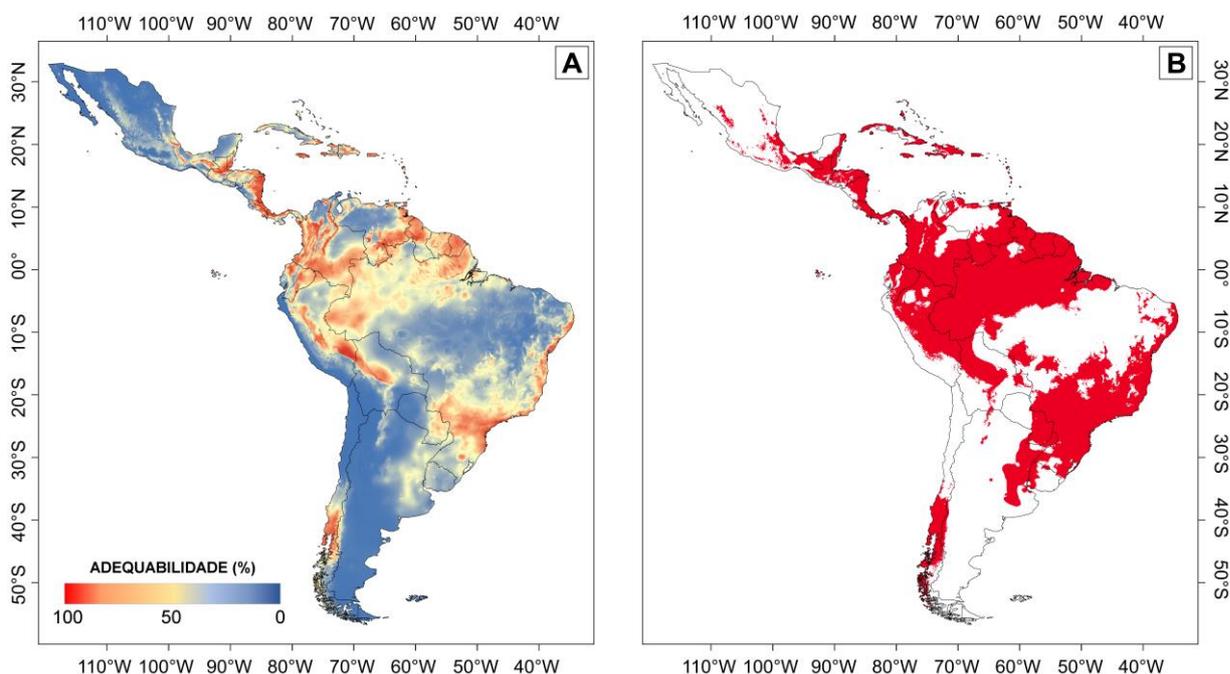
A forma do teto da caixa craniana e a forma da região posterior da caixa craniana foram dois caracteres que apresentaram proporções semelhantes de variação em todos os grupos populacionais, predominando indivíduos com teto da caixa craniana inclinada e região posterior da caixa craniana não projetada (Figura 6). Uma prancha com vistas dorsal, ventral e lateral do crânio e vista lateral da mandíbula, sintetizando as formas cranianas mais frequentes nas diferentes regiões biogeográficas está disponível na Figura 8.

### 4.4. Modelagem de distribuição

Dos 105 registros compilados para *M. riparius*, 10 são da América Central, 62 da porção norte da América do Sul (Floresta Andina, Escudo das Guianas e Bacia Amazônica), 13 da Mata Atlântica do leste do Brasil e 20 do Cone Sul. O modelo de distribuição atual apresentou AUC média de 0.803. Os modelos LGM apresentaram AUC média de 0,795 para CCSM4 e de 0,792 para MIROC (Tabela 14). A precipitação do mês mais seco e precipitação do mês mais chuvoso foram os parâmetros que mais contribuíram para os modelos (Tabela 15), indicando que regiões com uma combinação de altas temperaturas e elevada precipitação anual com baixa sazonalidade climática são mais adequadas para as populações de *Myotis riparius* (Figura 10A). O modelo binário de distribuição atual (Figura 10B) indicou que *M. riparius* possui distribuição fortemente associada com ambientes florestais, não ocorrendo em ambientes abertos, como os habitats xerofíticos da Caatinga, as fitofisionomias savânicas do Cerrado e os Llanos venezuelanos.

**TABELA 14.** Valores da estatística AUC aplicados aos modelos de distribuição geográfica atual (SDM) e no Último Máximo Glacial obtido pelo modelo climático CCSM4 e MIROC. Réplicas que apresentarem AUC menor que 0,75 foram excluídas dos modelos finais.

| RÉPLICA | AUC SDM | AUC CCSM4 | AUC MIROC |
|---------|---------|-----------|-----------|
| 1       | 0.789   | 0.839     | 0.738     |
| 2       | 0.737   | 0.798     | 0.76      |
| 3       | 0.827   | 0.801     | 0.819     |
| 4       | 0.784   | 0.745     | 0.819     |
| 5       | 0.843   | 0.757     | 0.773     |
| 6       | 0.699   | 0.838     | 0.715     |
| 7       | 0.749   | 0.768     | 0.828     |
| 8       | 0.687   | 0.706     | 0.747     |
| 9       | 0.806   | 0.74      | 0.753     |
| 10      | 0.771   | 0.764     | 0.741     |

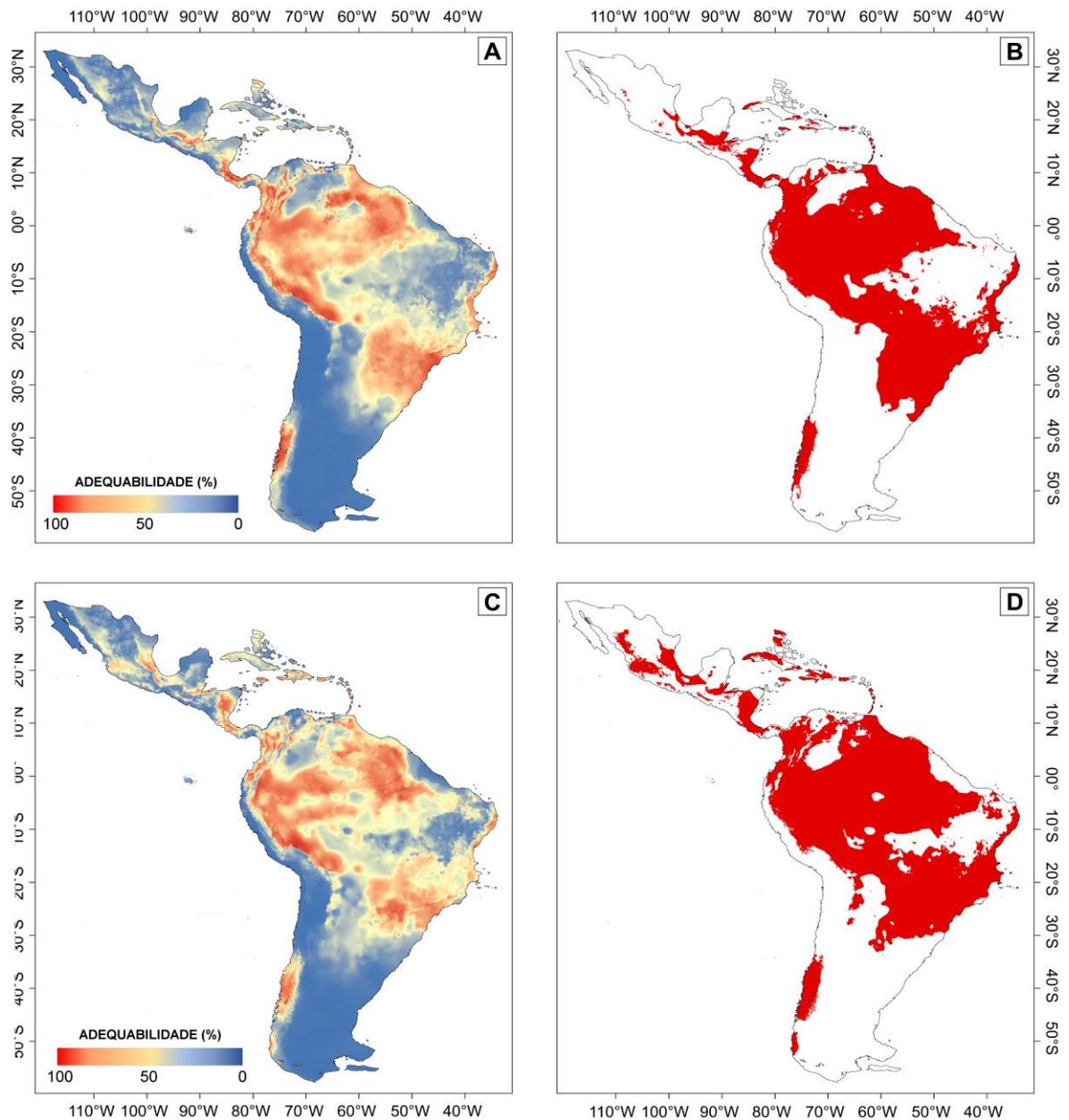


**FIGURA 10.** Modelos de distribuição atual de *Myotis riparius*, com mapa de adequabilidade ambiental (A) e mapa de distribuição binário obtido com o limiar 10 percentile training presence (B, área em vermelho).

Os dois modelos climáticos utilizados para modelar a distribuição de *M. riparius* no Último Máximo Glacial, CCSM4 (Figura 10A e B) e MIROC (Figura 10C e D) apresentaram predições distribucionais semelhantes. Esses modelos indicam que há aproximadamente 22 mil anos existiam mais áreas adequadas para a ocorrência de *M. riparius* do que atualmente, especialmente na porção central da América do Sul. Além disso, os modelos de LGM indicam uma possível conexão entre as populações do norte e do sul da América do Sul devido a um contínuo de áreas com altos valores de adequabilidade. Assim como no modelo de distribuição atual, indicações de ocorrência no sul do Chile nas ilhas do Caribe provavelmente são erros de comissão.

**TABELA 15.** Porcentagem de contribuição de cada variável utilizadas para gerar os modelos de distribuição atual e passada de *Myotis riparius*.

| VARIÁVEIS  | CÓDIGO DO<br>WORLDCLIM | PORCENTAGEM DE<br>CONTRIBUIÇÃO |
|--|------------------------|--------------------------------|
| Precipitação do mês mais seco                    | BIO14                  | 33,8                           |
| Precipitação do mês mais chuvoso                 | BIO13                  | 31,0                           |
| Temperatura máxima do mês mais quente            | BIO5                   | 19,3                           |
| Sazonalidade da precipitação (coef. de variação) | BIO15                  | 7,1                            |
| Sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100) | BIO4                   | 5,8                            |
| Temperatura mínima do mês mais frio              | BIO6                   | 3,0                            |



**FIGURA 11.** Modelos de distribuição de *Myotis riparius* para o último máximo glacial (LGM) com mapa de adequabilidade ambiental e mapa binário obtido com o limiar 10 percentile training presence (área em vermelho). Mapas A e B foram obtidos com o modelo climático CCSM4 e mapas C e D com o modelo climático MIROC-ESM.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Estruturação populacional

Os resultados das análises filogenéticas e filogeográficas indicam que há uma tendência à estruturação geográfica para as populações de *M. riparius*, contudo, essas não formam grupos reciprocamente monofiléticos. Os resultados das análises de variância molecular suportam essa tendência à estruturação, mostrando que existe um estrangulamento parcial do fluxo gênico entre as populações do norte e do sul da América do Sul, enquanto as populações da Amazônia e Mesoamérica estão em panmixia. Além disso, a variação genética intrapopulacional é tão grande quanto a variação interpopulacional para os diferentes conjuntos de *M. riparius* definidos a partir da região biogeográfica. As evidências genéticas são congruentes com os resultados morfológicos e morfométricos, que recuperam uma sutil estruturação geográfica das populações. As populações do norte e sul da América do Sul apresentam diferenças na coloração, em alguns caracteres crânio-dentários e no tamanho. Assim, as populações da Amazônia e Mesoamérica são, em geral, formadas por indivíduos com maiores dimensões corporais, com cristas mais altas e com coloração mais clara do que os representantes das populações da Mata Atlântica e Cone Sul. Índícios dessa variação já haviam sido reportados por outros autores, mas sempre a partir de uma linha única de evidência—geralmente a morfológica—e para cenários geográficos mais restritos (veja LAVAL, 1973; MORATELLI et al., 2013; NOVAES et al., 2017).

As variações genética e morfológica das populações, com tendências à estruturação geográfica, ainda que tênue, podem ser explicadas por recentes eventos de separação, capazes de acumular pequenas distinções genéticas e morfológicas, embora ainda não tenham tido tempo suficiente para promover total isolamento. Hipóteses baseadas em evidências genéticas e paleontológicas indicam que a diversidade do gênero *Myotis* decorreu de rápidos processos

de especiação, onde alguns milhares de anos podem ser suficientes para gerar linhagens distintas a partir de um ancestral em comum (STADELMANN et al., 2007; LU et al., 2013; GUNNELL et al., 2017).

Os dois índices de neutralidade utilizados apresentam informações divergentes sobre a demografia histórica de *M. riparius*. O teste D de Tajima apresentou valores negativos, o que indica que as populações podem estar em processo de expansão após um estrangulamento genético recente que causou uma exclusão seletiva de alelos (RAMÍREZ-SORIANO et al., 2008). Já o teste FS de Fu, opostamente, indicou que está havendo uma retração das populações. O FS de Fu é um teste mais robusto quando comparado com o D de Tajima, especialmente para amostras pequenas, como o caso desse estudo (veja RAMÍREZ-SORIANO et al., 2008). Portanto, acreditamos que esse teste apresente uma maior confiabilidade na interpretação da história evolutiva de *M. riparius*. Além disso, o teste de neutralidade de FS de Fu possui forte congruência com os modelos de distribuição geográfica feitos a partir da adequabilidade ambiental atual e no último máximo glacial (LGM).

## 5.2. Distribuição

*Myotis riparius* é uma espécie amplamente distribuída pela região Neotropical. A localidade de ocorrência mais ao norte, confirmada pela revisão de espécimes em coleções, é em Cariari, Província de Limón, Costa Rica (e.g., LSUMZ 12974). A distribuição de *M. riparius* se estende para a América do Sul, ocupando todos os biomas florestais a leste dos Andes. *Myotis riparius* possui ocorrência em todos os países sul-americanos, com exceção do Chile. A ocorrência mais austral dessa espécie, confirmada a partir de espécime depositado em coleção, é Tacuarembó, no Uruguai (e.g., AMNH 205541). A partir de revisão de literatura, NOVAES et al. (2017) indicam a ocorrência de *M. riparius* para Honduras.

Contudo, nossa revisão não encontrou espécimes depositados em coleções que pudessem confirmar essa ocorrência.

WILSON (2008, p. 479) indica que *M. riparius* ocorre em praticamente toda América do Sul a leste dos Andes, até o limite austral de 35°S. Em revisão sobre a espécie, NOVAES et al. (2017) já suscitam a dúvida da ocorrência dessas espécies na diagonal de áreas abertas e secas da América do Sul. Mesmo após uma extensa revisão em coleções biológicas, não foram encontrados espécimes provenientes das áreas de savana mélica e xerofítica da diagonal de áreas abertas da América do Sul.

Os modelos de distribuição geográfica indicaram que *M. riparius* possui distribuição fortemente associadas a ambientes florestais, com elevada pluviosidade e sazonalidade climática pouco acentuada em comparação às áreas xerofíticas ou de maiores latitudes. Além disso, as áreas de baixa adequabilidade indicam que *M. riparius* está ausente dos ecossistemas abertos e semiáridos da América do Sul (Caatinga, Chaco Seco, Cerrado e Llanos). As pequenas incursões de *M. riparius* na Caatinga e Cerrado estão em áreas úmidas que mantêm relictos florestais semidecíduais, que naturalmente possuem maiores índices de pluviosidade do que as zonas vizinhas mais áridas (OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002; TABARELLI & SANTOS, 2004). Indicações de ocorrência no sul do Chile e nas ilhas do Caribe podem ser interpretadas como erro de comissão, já que (i) representam províncias biogeográficas isoladas; e (ii) revisões taxonômicas envolvendo representantes de *Myotis* dessas localidades não reportam a ocorrência de *M. riparius* (LAVAL 1973; NOVAES et al., 2017).

O modelo de distribuição atual recupera uma quebra da distribuição de *M. riparius*, indicando um possível isolamento das populações do leste do Brasil e Cone Sul daquelas da porção norte da América do Sul e América Central, corroborando os resultados das estruturas genética e morfológica recuperados para *M. riparius*. Já os modelos de distribuição para o último máximo glacial (LGM) mostram que durante o último máximo

glacial, no Pleistoceno ( $\cong$  20 mil anos; CLARK et al., 2009), existiu uma maior área de adequabilidade ambiental para *M. riparius*, indicando que possivelmente as populações de *M. riparius* de toda a América do Sul estavam conectadas, o que pode ter suportado uma grande população panmítica distribuída em grande parte da Mesoamérica e América do Sul. Contudo, mudanças climáticas no Pleistoceno tardio causaram modificações na cobertura vegetal, com expansão das áreas savânicas, formando a diagonal seca da América do Sul—uma região atualmente composta por ecossistemas xerofíticos e semiáridos (WERNECK, 2011). Tais mudanças isolaram a Amazônia e Mata Atlântica, separando-as por um corredor de áreas secas e ambientes abertos, o que pode ter sido responsável pelo processo de fragmentação e redução populacional de *M. riparius*, resultando em um isolamento entre as populações do norte e do sul da América do Sul, como é recuperado atualmente pelo modelo atual.

### 5.3. História evolutiva

A análise conjunta das evidências genéticas, morfológicas e de modelagem da distribuição atual e passada sustentam a hipótese de que *Myotis riparius* era formada por uma grande população panmítica no intervalo Mioceno–Pleistoceno que sofreu uma fragmentação e um isolamento parcial recente de suas populações. Essa hipótese está de acordo com os eventos de especiação por vicariância sustentados pela Teoria dos Refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1981).

Diversas evidências apontam eventos de expansão e retração das florestas tropicais durante o Quaternário, criando pontes florestais que conectavam a Amazônia e a Mata Atlântica (FLENLEY, 1979; DE OLIVEIRA et al., 1999; COLINVAUX et al., 2000; VIVO & CARMIGNOTTO, 2004; WERNECK, 2011). Esses eventos são considerados responsáveis pela grande diversidade alcançada por muitos grupos biológicos, incluindo anfíbios, répteis, aves e mamíferos terrestres (VANZOLINI & WILLIAMS, 1981; BRUMFIELD &

CAPPARELLA, 1996; D’HORTA et al., 2011; AMARAL et al., 2013; DAMASCENO et al., 2014; GUTIÉRREZ et al., 2014).

Por voarem longas distâncias e serem capazes de ultrapassar formações geográficas que são consideradas barreiras para diversos vertebrados (RUSSELL et al., 2005; MENEZES JR. et al., 2008), a diversificação dos morcegos explicada a partir de eventos vicariantes é geralmente negligenciada. Recentemente, evidências genéticas indicam que a diversificação dos morcegos filostomídeos na América do Sul foi, mais frequentemente, em decorrência de eventos de dispersão (ROJAS et al., 2016). Contudo, nem todas as espécies de morcegos possuem a mesma vagilidade. No geral, espécies de *Myotis* neotropicais possuem tamanho reduzido e utilizam áreas de vida pequenas (WILSON & LAVAL 1974; NOVAES et al., 2017). Além disso, comumente, a evolução de *Myotis* é explicada a partir de especiação alopátrica, muitas delas relacionadas a mudanças climáticas do Quaternário (FURMAN et al., 2012; LU et al., 2013).

Um estudo filogeográfico realizado com *Myotis myotis* Borkhausen 1797, uma das espécies de maior distribuição da Europa, encontrou forte estruturação populacional e a hipótese sustentada pelos autores indica a atuação de eventos de isolamento a partir de mudanças climáticas da última glaciação (CASTELLA et al., 2001). Resultado semelhante foi encontrado para *Myotis pilosus* Peters 1869 da China, que apresentou marcada estruturação populacional explicada pela teoria dos refúgios pleistocênicos (LU et al., 2013). Na América do Sul, MORATELLI et al. (2017) indicam que a origem de *Myotis attenboroughi* Moratelli et al. 2017, única espécie de morcego endêmica da ilha de Tobago, pode ter sido a partir das mudanças climáticas no final do último máximo glacial, aumentando o nível do mar e isolando as populações insulares desse morcego das demais do continente. Essa hipótese pode ser sustentada por evidências genéticas que indicam que grandes massas de água (ca. 15 km)

podem significar barreiras geográficas efetivas para o fluxo gênico de *Myotis* de pequeno tamanho (CASTELLA et al., 2000).

As mudanças climáticas do Quaternário também estão relacionadas com padrões de variação em outros grupos de morcegos na América do Sul. Um estudo filogeográfico indicou que a estruturação populacional de *Desmodus rotundus* (É. Geoffroy 1810), espécie de ampla distribuição e com grande vagilidade, pode ser explicada a partir da Teoria dos Refúgios (MARTINS et al., 2009).

*Myotis* é o gênero de morcego mais rico em espécies da América do Sul, com 21 espécies válidas (WILSON, 2008; MORATELLI et al., 2013; MORATELLI et al., 2017). Ainda assim, estudos que abordaram a variabilidade genética do gênero indicam que a diversidade conhecida é subestimada, existindo complexos de espécies crípticas ainda não descritas (LARSEN et al., 2012). Considerando nossos resultados sobre a estruturação de *M. riparius* e os demais estudos filogeográficos de *Myotis* no mundo, é provável que as mudanças climáticas do Quaternário tenham atuado fortemente na diversificação desse gênero na América do Sul. Contudo, essa hipótese ainda é especulativa e precisa ser testada.

#### **5.4. Variação populacional e implicações taxonômicas**

A marcante variação geográfica de *M. riparius* ao longo de sua área de distribuição suscitou a hipótese de que as populações do norte e do sul da América do Sul poderiam estar estruturadas em duas ou mais subespécies (NOVAES et al., 2017), o que nos levou a realizar esse estudo. As evidências genéticas e os modelos de distribuição indicam que *M. riparius* passou por um processo recente de separação das populações decorrentes das flutuações climáticas e vegetacionais do Quaternário. Esses cenário explica as variações morfológicas para os diferentes conjuntos populacionais.

A altura das cristas sagital e lambdoides foram os caracteres que apresentaram a maior variação estruturada entre as populações. Espécimes da região norte da América do Sul possuem cristas mais altas quando comparadas com a de espécimes da Mata Atlântica e Cone Sul. A altura das cristas está relacionada ao ancoramento do músculo temporal, que possui forte ligação com a mastigação (MAYNARD-SMITH & SAVAGE, 1959). Portanto, as cristas mais altas nas populações amazônicas podem ser uma resposta adaptativa local relacionada à dureza dos alimentos consumidos (FREEMAN, 1984) e não necessariamente refletir uma apomorfia do grupo.

As cristas sagital e lambdoides altas têm sido apontadas como um bom caráter para separação das espécies do grupo *ruber* daquelas do grupo *albescens*; e frequentemente *M. riparius* tem sido reportada na literatura como uma espécie que apresenta crista sagital alta (LAVAL, 1973; SIMMONS & VOSS, 1998; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2001; MORATELLI et al., 2013). Entretanto, observamos que altura varia geograficamente, com predominância de estados diferentes desse caráter em diferentes regiões (e.g., alta no norte e baixa no sul). Além disso, há ainda considerável variação local, com indivíduos da mesma localidade apresentando diferentes alturas de cristas, o que impede que esse caráter seja usado como diagnóstico para a espécie.

A posição do P3 deslocado para o lado lingual e oculto em vista lateral também já foi usada como um caráter diagnóstico para separar *M. riparius* das demais congêneres, exceto *M. simus* (veja LAVAL, 1973; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2001). Contudo, nas amostras aqui examinadas predomina o P3 alinhado com os demais dentes superiores e não oculto em vista lateral. O que observamos é que há uma maior frequência do P3 deslocado e oculto em amostras do norte da América do Sul em comparação às amostras do sul da América do Sul, mas a grande variação encontrada, tanto inter- quanto intrapopulacional, impede que esse caráter seja utilizado na diagnose da espécie, como já discutido por DIAS & PERACCHI

(2007, 2008) para amostras do Sudeste do Brasil. Além disso, já foi demonstrado que o P3 deslocado e oculto também ocorre em baixas frequências em outras espécies de *Myotis*, tanto do grupo *ruber* quanto do grupo *albescens* (veja DIAS & PERACCHI, 2008; MORATELLI et al., 2011c, 2013). Assim como as cristas sagitais, esse caráter não deve ser usado isoladamente como diagnóstico para a espécie.

As recentes revisões para *Myotis* neotropicais tem indicado que a coloração da pelagem é um importante caráter para a separação das espécies (MORATELLI et al., 2011a, 2013, 2017). Observamos que *Myotis riparius* apresenta grande variação na coloração, com aparente estruturação geográfica. No geral, espécimes da América Central apresentam pelagem castanho-escura a castanho-avermelhada; espécimes da Amazônia possuem pelagem consideravelmente mais clara que as formas das demais regiões, variando de castanho-clara a castanho-alaranjada até uma pelagem amarela brilhante; já as formas da Mata Atlântica e Cone Sul apresentam pelagem geralmente mais escura, variando de castanho-escura a castanho-avermelhada. Espécimes de todas as regiões possuem pelagem dorsal unicolorida e pelagem ventral bicolorida, sendo a base mais escura, semelhante às outras espécies do grupo *ruber* (LAVAL, 1973; MORATELLI et al., 2013; MORATELLI & WILSON, 2014). Esse padrão de bandeamento (dorsal unicolorida e ventral bicolorida) mostrou-se um caráter bem conservado em *M. riparius*, e pode ser utilizado para a identificação dos espécimes, desde que usado em combinação com outros caracteres.

A inclinação do rosto não se mostrou um caráter útil para a identificação de *Myotis riparius*, com a maior parte das amostras apresentando o rosto não inclinado, sem qualquer indício de variação geográfica para o caráter; sendo esse o estado predominante para a maioria das outras espécies. A forma do teto da caixa craniana e forma da região posterior da caixa craniana mostraram-se altamente variáveis inter- e intrapopulacionalmente, sendo também pouco informativas para a identificação de *M. riparius*.

No geral, espécimes do sul da América do Sul (Cone Sul e Mata Atlântica) possuem tamanho menor do que as amostras do norte da América do Sul e América Central. Esse padrão é inverso ao encontrado para *Myotis albescens*, espécie que também possui ampla distribuição na região Neotropical, onde indivíduos menores são encontrados no norte da América do Sul (MORATELLI & OLIVEIRA, 2011). Além disso, nossos resultados divergem do esperado pela Regra de Bergmann, que sustenta que em espécies de ampla distribuição existe uma variação clinal relacionada à latitude, onde indivíduos mais próximos da linha do Equador (áreas mais quentes) tendem a ser menores que aqueles em latitudes mais elevadas (MEIRI et al., 2007). A falta de relação entre a variação do tamanho de *Myotis riparius* e a latitude, contrariando a regra de Bergmann, pode ser um indicativo de que exista um gargalo entre populações do norte e do sul da América do Sul.

Análises morfométricas multivariadas não recuperaram qualquer descontinuidade entre os grupos definidos a partir da morfologia e geografia. A AMOVA não indicou haver diferenças significativas entre os diferentes conjuntos populacionais que pudessem evidenciar a separação entre os grupos. Entretanto, há uma sutil tendência à estruturação geográfica.

Com base nos nossos resultados, consideramos que *M. riparius* é uma única linhagem, satisfazendo o conceito filogenético de espécie (veja ZACHOS, 2016). Além disso, a congruência dos resultados moleculares, morfológicos e morfométricos—indicando uma sutil tendência à estruturação geográfica sem formação de grupos reciprocamente monofiléticos e ausência de descontinuidades morfológicas e de apomorfias para os conjuntos populacionais analisados—indica que *M. riparius* é uma espécie monotípica.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A congruência de todas as evidências analisadas sugere existir uma tendência à estruturação geográfica, embora não tenham sido recuperados grupos reciprocamente monofiléticos. Acreditamos que essa tendência à estruturação seja decorrente de uma história evolutiva complexa. Nossos resultados sugerem que há aproximadamente 20.000 anos, durante o Pleistoceno, *Myotis riparius* possuía uma grande população panmítica distribuída por toda região Neotropical. Contudo, mudanças climáticas do Pleistoceno ao final do Último Máximo Glacial resultaram em uma redução das áreas mais adequadas à sua ocupação, fragmentando a população e gerando um isolamento recente, ainda que parcial.

A ausência de monofiletismo recíproco e de discontinuidades morfológicas para delimitar os conjuntos populacionais indicam que *M. riparius* é uma única espécie monotípica. No entanto, os resultados apresentaram baixo poder estatístico devido a escassez de amostras que pudessem basear análises filogeográficas e filogeográficas mais robustas.

Embora tenhamos avançado na compreensão do status taxonômico de *M. riparius*, ainda permanecem dúvidas sobre o status de algumas populações. Dentre essas, destacamos as populações do sul da América do Sul. Assim, acreditamos que análises morfológicas de espécimes adicionais e análises filogenéticas e filogeográficas nos permitirão avançar na compreensão da estruturação dessas populações—e conseqüentemente de seu status taxonômico—em relação ao resto do conjunto compreendido como *Myotis riparius*.

De uma maneira geral, percebo que *Myotis riparius*, assim como o resto do gênero na região Neotropical, ainda é um quebra-cabeças longe de ser resolvido. Mais amostras genéticas e morfológicas são necessárias para uma compreensão mais refinada do real status taxonômico das populações e dos processos evolutivos que estão envolvidos na estruturação de *M. riparius*.

## REFERÊNCIAS

- AIZPURUA, O., I. GARIN, A. ALBERDI, E. SALSAMENDI, H. BAAGOE, J. AIHARTZA. 2013. Fishing long-fingered bats (*Myotis capaccinii*) prey regularly upon exotic fish. **PLoS ONE** 8(11): e80163.
- AMARAL, F.R., P.K. ALBERS, S.V. EDWARDS, C.Y. MIYAKI. 2013. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). **Molecular Ecology** 22: 3996–4013.
- BANDELT, H., P. FORSTER, A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16(1): 37–48.
- BARQUEZ, R.M., M.A. MARES, J.K. BRAUN. 1999. The bats of Argentina. **Special Publications of the Museum of Texas Tech University** 42: 1–275.
- BOND, J.E., A.K. STOCKMAN. 2008. An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian trapdoor spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. **Systematic Biology** 57(4): 628–646.
- BOYLES, J.G., P.M. CRYAN, G.F. MCCRACKEN, T.H. KUNZ. 2011. Economic importance of bats in agriculture. **Science** 332: 41–42.
- BRUMFIELD, R.T., A.P. CAPPARELLA. 1996. Historical diversification of birds in northwestern South America: a molecular perspective on the role of vicariant events. **Evolution** 50(4): 1607–1624.
- BRUNET-ROSSINI, A.K., G.S. WILKINSON. 2009. Methods for age estimation and study of senescence in bats, pp. 315–325. In: **Ecological and behavioral methods for the study of bats** (T.H. Kunz, S. Parsons, ed.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- CASTELLA, V., M. RUEDI, L. EXCOFFIER, C. IBAÑEZ, R. ARLETTAZ, J. HAUSSER. 2000. Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? **Molecular Ecology** 9: 1761–1772.
- CASTELLA, V., M. RUEDI, L. EXCOFFIER. 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. **Journal of Evolutionary Biology** 14: 708–720.
- CEBALLOS, G., P.R. EHRLICH. 2009. Discoveries of new mammal species and their implications for conservation and ecosystem services. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 3841–3846.
- CEBALLOS, G., P.R. EHRLICH, A.D. BARNOSKY, A. GARCÍA, R.M. PRINGLE, T.M. PALMER. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: entering the sixth mass extinction. **Science Advances** 1(5): e1400253.

- CLARE, E.L., B.K. LIM, M.D. ENGSTROM, J.L. EGER, P.D.N. HEBERT. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes** 7: 184–190.
- CLARE, E.L., B.K. LIM, M.B. FENTON, P.D.N. HEBERT. 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. **PLoS ONE** 6(7): e22648.
- CLARK, P.U., A.S. DYKE, J.D. SHAKUN, A.E. CARLSON, J. CLARK, B. WOHLFARTH, J.X. MITROVICA, S.W. HOSTETLER, A.M. McCABE. 2009. The last glacial maximum. **Science** 325: 710–714.
- CLEVELAND, C.J., M. BETKE, P. FEDERICO, J.D. FRANK, T.G. HALLAM, J. HORN, J.D. LÓPEZ JR., G.F. MCCrackEN, R.A. MEDELLÍN, A. MORENO-VALDEZ, C.G. SANSONE, J.K. WESTBROOK, T.H. KUNZ. 2006. Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. **Frontiers in Ecology and Environment** 4(5): 238–243.
- COLINVAUX, P.A., P.A. DE OLIVEIRA, M.B. BUSH. 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial timescales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Reviews** 19: 141–169.
- COSTELLO, M.J., R.M. MAY, N.E. STORK. 2013. Can we name Earth's species before they go extinct? **Science** 339(6118): 413–416.
- D'HORTA, F.M., G.S. CABANNE, D. MEYER, C.Y. MIYAKI. 2011. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. **Molecular Ecology** 20(9): 1923–1935.
- DAMASCENO, R., M.L. STRANGAS, A.C. CARNAVAL, M.T. RODRIGUES, C. MORITZ. 2014. Revisiting the vanishing refuge model of diversification. **Frontiers in Genetics** 5: e535.
- DARRIBA, D., G.L. TABOADA, R. DOALLO, D. POSADA. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(3): 772.
- DÁVALOS, L.M., A.L. PORZECANSKI. 2009. Accounting for molecular stochasticity in systematic revisions: species limits and phylogeny of *Paroaria*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 53(1): 234–248.
- DE OLIVEIRA, P.E., A.M.F. BARRETO, K. SUGUIO. 1999. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology** 152(4): 319–337.
- DE QUEIROZ, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation, pp 57–75. In: **Endless forms: species and speciation** (D. Howard, S.H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, Oxford.
- DE QUEIROZ, K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. **Proceedings of the California Academy of Science** 56(1): 196–215.

- DESJARDINS, P., D. CONKLIN. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments** 22(45): e2565.
- DIAS, D., A.L. PERACCHI. 2007. Primeiro registro de *Myotis riparius* Handley (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae) no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 24 (2): 508–511.
- DIAS, D., A.L. PERACCHI. 2008. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá, estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia** 25(2): 333–369.
- DUDÍK, M., S.J. PHILLIPS, R.E. SCHAPIRE. 2004. Performance guarantees for regularized maximum entropy density estimation. **Proceedings of the 17th Annual Conference on Computational Learning Theory**, pp. 472–486.
- DUNN, O.J. 1961. Multiple comparisons among means. **Journal of the American Statistical Association** 56(293): 52–64.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32(6): 1792–1797.
- ELITH, J., C.H. GRAHAM, R.P. ANDERSON, M. DUDÍK, S. FERRIER, A. GUISAN, R.J. HIJMANS, F. HUETTMANN, J.R. LEATHWICK, A. LEHMANN, J. LI, L.G. LOHMANN, B.A. LOISELLE, G. MANION, C. MORITZ, M. NAKAMURA, Y. NAKAZAWA, J.M.M. OVERTON, A.T. PETERSON, S.J. PHILLIPS, K. RICHARDSON, R. SCACHETTI-PEREIRA, R.E. SCHAPIRE, J. SOBERÓN, S. WILLIAMS, M.S. WISZ, N.E. ZIMMERMANN. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. **Ecography** 29(2): 129–151.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics** 1: 47–50.
- FLENLEY, J.R. 1979. **The equatorial rain forest: a geological history**. Butterworth & Co Ltd., Sydney, 161 p.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution** 17(6): 368–376.
- FINDLEY, J.S. 1972. Phenetic relationships among bats of the genus *Myotis*. **Systematic Biology** 21(1): 31–52.
- FREEMAN, P.W. 1984. Functional cranial analysis of large animalivorous bats (Microchiroptera). **Biological Journal of the Linnean Society** 21: 387–408.
- FU, Y.X., W.H. LI. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. **Genetics** 133: 693–709.
- FURMAN, A., E. ÇORAMAN, Z.L. NAGY, T. POSTAWA, R. BILGIN, M. GAJEWSKA, W. BOGDANOWICZ. 2013. Phylogeography of the large *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in Europe, Asia Minor, and Transcaucasia. **Biological Journal of the Linnean Society** 108(1): 189–209.

- GARDNER, A.L. 2008 (2007). Gazetteer of marginal localities, pp. 581–628. In: **Mammals of South America, vol. 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats** (A.L. Gardner, ed.). University of Chicago Press, Chicago.
- GENT, P.R., G. DANABASOGLU, L.J. DONNER, M.M. HOLLAND, E.C. HUNKE, S.R. JAYNE, D.M. LAWRENCE, R.B. NEALE, P.J. RASCH, M. VERTENSTEIN, P.H. WORLEY, Z.L. YANG, M. ZHANG. 2011. The Community Climate System Model Version 4. **Journal of Climate** 24: 4973–4991.
- GOODMAN, S.M., C.P. MAMINIRINA, H.M. BRADMAN, L. CHRISTIDIS, B. APPLETON. 2009. The use of molecular phylogenetic and morphological tools to identify cryptic and paraphyletic species: examples from diminutive long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae: *Miniopterus*) on Madagascar. **American Museum Novitates** 3669: 1–34.
- GUINDON, S., O. GASCUEL. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology** 53(4): 696–704.
- GUNNELL, G.F., R. SMITH, T. SMITH. 2017. 33 million year old *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) and the rapid global radiation of modern bats. **PLoS ONE** 12(3): e0172621.
- GUTIÉRREZ, E.E., K.M. HELGEN. 2013. Outdated taxonomy blocks conservation. **Nature** 495: 310.
- GUTIÉRREZ, E.E., R.P. ANDERSON, R.S. VOSS, J. OCHOA-G, M. AGUILERA, S.A. JANSA. 2014. Phylogeography of the mouse opossum *Marmosa robinsoni*: insights into the biogeography of dry in northern South America. **Journal of Mammalogy** 95: 1175–1188.
- HAFFER, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. **Science** 165: 131–137.
- HANDLEY, C.O., Jr. 1960. Descriptions of new bats from Panama. **Proceedings of the United States National Museum** 112: 459–479.
- HASEGAWA, M., H. KISHINO, T. YANO. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution** 22(2): 160–174.
- HAWLITSCHKE, O., N. PORCH, L. HENDRICH, M. BALKE. 2011. Ecological Niche Modelling and nDNA sequencing support a new, morphologically cryptic beetle species unveiled by DNA Barcoding. **PLoS ONE** 6(2): e16662.
- HIJMANS, R.J., S.E. CAMERON, J.L. PARRA, P.G. JONES, A. JARVIS. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology** 25: 1965–1978.
- HOLSINGER, K.E., B.S. WEIR. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F<sub>ST</sub>*. **Nature Reviews Genetics** 10: 639–650.

- HONAKER, J., G. KING, M; BLACKWELL. 2011. Amelia II: A program for missing data. **Journal of Statistical Software** 45(7): 1–47.
- HUELSENBECK, J.P., F. RONQUIST, R. NIELSEN, J.P. BOLLBACK. Bayesian Inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science** 294: 2310–2314.
- KALKA, M.B., A.R. SMITH, E.K.V. KALKO. 2008. Bats limit arthropods and herbivory in a tropical forest. **Science** 320: 71.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16(2): 111–120.
- KUMAR, S., G. STECHER, K. TAMURA. 2016. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33(8): 1870–1974.
- KUNZ, T.H., E.B. TORREZ, D. BAUER, T. LOBOVA, T.H. FLEMING. 2011. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1223: 1–38.
- LARSEN, R.J., M.C. KNAPP, H.H. GENOWAYS, F.A.A. KHAN, P.A. LARSEN, D.E. WILSON, R.J. BAKER. 2012. Genetic diversity of Neotropical *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) with an emphasis on South American species. **PLoS ONE** 7(10): e46578.
- LAVAL, R.K. 1973. A revision of the Neotropical bats of the genus *Myotis*. **Natural History Museum of Los Angeles County, Science Bulletin** 15: 1–54.
- LEITE, Y.L.R., L.P. COSTA, A.C. LOSS, R.G. ROCHA, H. BATALHA-FILHO, A.C. BASTOS, V.S. QUARESMA, V. FAGUNDES, R. PARESQUE, M. PASSAMANI, R. PARDINI. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 113(4): 1008–1013.
- LIBRADO, P., J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25: 1451–1452.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, C., S.J. PRESLEY, R.D. OWEN, M.R. WILLIG. 2001. Taxonomic status of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Paraguay. **Journal of Mammalogy** 82: 138–160.
- LU, G., A. LIN, J. LUO, D.V. BLONDEL, K.A. MEIKLEJOHN, K. SUN, J. FENG. 2013. Phylogeography of the Rickett's big-footed bat, *Myotis pilosus* (Chiroptera: Vespertilionidae): a novel pattern of genetic structure of bats in China. **BMC Evolutionary Biology** 13: e241.
- MANTILLA-MELUK, H., J. MUNOZ-GARAY. 2014. Biogeography and taxonomic status of *Myotis keaysi pilosatibialis* LaVal, 1973 (Chiroptera: Vespertilionidae). **Zootaxa** 3793(1): 60–70.

- MARTINS, F.M., A.R. TEMPLETON, A.C.O. PAVAN, B. KOHLBACH, J.S. MORGANTE. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology** 9: e294.
- MAY, R.M. 1988. How many species are there on Earth? **Science** 241(4872): 1441–1449.
- MAYER, F., C. DIETZ, A. KIEFER. 2007. Molecular species identification boosts bat diversity. **Frontiers in Zoology** 4(1): e4.
- MAYNARD-SMITH, J., R.J.G. SAVAGE. 1959. The mechanics of mammalian jaws. **School Science Review** 40: 289-301.
- MEIRI, S., Y. YOM-TOV, E. GEFFEN. 2007. What determines conformity to Bergmann's rule? **Global Ecology and Biogeography** 16(6): 788–794.
- MENEZES JR., L.F., A.C. DUARTE, R.L.M. NOVAES, A.C. FAÇANHA, A.L. PERACCHI, L.M. COSTA, A.F. DIAS-E-FERNANDES, C.E.L. ESBÉRARD. 2008. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biota Neotropica** 8(2): 243–245.
- MILLER, G.S., G.M. ALLEN. 1928. The American bats of the genera *Myotis* and *Pizonyx*. **Bulletin of the United States of National Museum**. 144: 1–128.
- MISHLER, B.D., E.C. THERIOT. 2000. The phylogenetic species concept (sensu Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts, pp 44–55. In: **Species concepts and phylogenetic theory – a debate** (Q.D. Wheeler, R. Meier, eds.). Columbia University Press, New York.
- MONTEIRO, L., REIS, S.F. 1999. **Princípios de morfometria geométrica**. Editora Holos, Ribeirão Preto, 189 p.
- MORATELLI, R., D.E. WILSON. 2011a. A new species of *Myotis* Kaup, 1829 (Chiroptera, Vespertilionidae) from Ecuador. **Mammalian Biology** 76: 608–614.
- MORATELLI, R., D.E. WILSON. 2011b. The identity of *Myotis punensis* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Zoologia** 28(1): 115–121.
- MORATELLI, R., D.E. WILSON. 2014. A new species of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from Bolivia. **Journal of Mammalogy** 95: 17–25.
- MORATELLI, R., J.A. OLIVEIRA. 2011. Morphometric and morphological variation in South American populations of *Myotis albescens* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Zoologia** 28(6): 789–802.
- MORATELLI, R., C.H. CALISHER. 2015. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110(1): 1–22.

- MORATELLI, R., A.L. PERACCHI, D. DIAS, J.A. OLIVEIRA. 2011a. Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species. **Mammalian Biology** 76: 592–607.
- MORATELLI, R., C.S. ANDREAZZI, J.A. OLIVEIRA, J.L.P. CORDEIRO. 2011b. Current and potential distribution of *Myotis simus* (Chiroptera, Vespertilionidae). **Mammalia** 75: 227–234.
- MORATELLI, R., A.L. PERACCHI, J.A. OLIVEIRA. 2011c. Morphometric and morphological variation in *Myotis simus* Thomas (Chiroptera, Vespertilionidae), with an appraisal of the identify of *Myotis guaycuru* Proença based on analysis of the type material. **Zootaxa** 2985: 41–54.
- MORATELLI, R., A.L. GARDNER, J.A. OLIVEIRA, D.E. WILSON. 2013. Review of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from northern South America, including description of a new species. **American Museum Novitates** 3780: 1–36.
- MORATELLI, R., D.E. WILSON, A.L. GARDNER, R.D. FISHER, E.E. GUTIÉRREZ. 2016. A new species of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from Suriname. **Special Publications of the Texas Tech University** 65: 49–66.
- MORATELLI, R., D.E. WILSON, R.L.M. NOVAES, K.M. HELGEN, E.E. GUTIÉRREZ. 2017. Caribbean *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae), with description of a new species. **Journal of Mammalogy** 98(4): 1–15.
- MORRISON, W.R., III, J.L. LOHR, P. DUCHEN, R. WILCHES, D. TRUJILLO, M. MAIR, S.S. RENNER. 2009. The impact of taxonomic change on conservation: Does it kill, can it save, or is it just irrelevant? **Biological Conservation** 142: 3201–3206.
- MORRONE, J.J. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa** 3782(1): 1–110.
- NOVAES, R.L.M., R.F. SOUZA, E.A. RIBEIRO, A.C. SIQUEIRA, A.V. GRECO, R. MORATELLI. 2015. First evidence of frugivory in *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae, Myotinae). **Biodiversity Data Journal** 3: e6841.
- NOVAES, R.L.M., R.F. SOUZA, R. MORATELLI. 2017. *Myotis riparius*. **Mammalian Species** 49(946): 1–6.
- NOWAK, R.N. 1994. **Walker's bats of the world**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 287 p.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T., J.A. RATTER. 2002. Vegetation physiognomies and wood flora of the bioma Cerrado, pp. 91-120. In: **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna** (P.S. Oliveira, R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York.
- PADIAL, J.M., A. MIRALLES, I. DE LA RIVA, M. VENCES. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology** 7: e16.

- PATTON, J.L., U.F.J. PARDIÑAS, G. D'ELÍA. 2015. Gazetteer of localities, pp. 1209–1275. In: **Mammals of South America, volume 2: rodents** (J.L. Patton, U.F.J. Pardiñas & G. D'Elía, eds.). The University of Chicago Press, Chicago
- PAYNTER, R.A., Jr. 1982. **Ornithological gazetteer of Venezuela**. Harvard College Press, Cambridge, iv+245 p.
- PAYNTER, R.A., Jr. 1985. **Ornithological gazetteer of Argentina**. Harvard College Press, Cambridge, vi+507 p.
- PAYNTER, R.A., Jr. 1993. **Ornithological gazetteer of Ecuador**. 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, xii+247 p.
- PAYNTER, R.A., Jr. 1997. **Ornithological gazetteer of Colombia**. 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, x+537 p.
- PAYNTER, R.A., Jr., A.M.G. CAPERTON. 1977. **Ornithological gazetteer of Paraguay**. Harvard College Press, Cambridge, iv+43 p.
- PAYNTER, R.A., Jr., M.A. TRAYLOR, Jr. 1991. **Ornithological gazetteer of Brazil**. Harvard College Press, Cambridge, viii+1–352 p.
- PHILLIPS, S.J., R.P. ANDERSON, R.E. SCHAPIRE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling** 190: 231–259.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em <http://www.R-project.org/>, acessado em 23/05/2017.
- RAMBAUT, A., A.J. DRUMMOND. 2009. **Tracer v.1.5: MCMC Trace Analysis Packpage**. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>, acessado em 8 de maio de 2017.
- RAMÍREZ-SORIANO, A., S. RAMOS-ORSINS, J. ROZAS, F. CALAFELL, A. NAVARRO. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics** 179(1): 555–567.
- REIS, S.F. 1988. Estatística multivariada e morfometria em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia** 5(3): 571–580.
- RISSLER, L.J., J.J. APODACA. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the Black-Salamander (*Aneides flavipunctatus*). **Systematic Biology** 56(6): 924–942.
- ROCHA, R.M.M. 2008. **Revisão taxonômica das espécies de *Myotis* Kaup, 1829 (Chiroptera, Vespertilionidae) do Brasil: uma abordagem morfológica e morfométrica**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 265 p.

- ROJAS, D., O.M. WARSI, L.M. DÁVALOS. 2016. Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant Neotropical diversity. **Systematic Biology** 65(3): 432–448.
- RONQUIST F., J.P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572–1574.
- RUEDI, M., F. MAYER. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 21(3): 436–448.
- RUEDI, M., B. STADELMANN, Y. GAGER, E.J.P. DOUZERY, C.M. FRANCIS, L.K. LIN, A. GUILLÉN-SERVENT, A. CIBOIS. 2013. Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 69: 437–449.
- RUSSELL, A.L., R.A. MEDELLÍN, G.F. MCCRACKEN. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). **Molecular Ecology** 14: 2207–2222.
- SANGER, F. & A.R. COULSON. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology** 94(3): 441–448.
- SARKAR, D. 2008. **Lattice: multivariate data visualization with R**. Springer-Verlag, New York, 273 p.
- SIMMONS, N.B. 2005. Order Chiroptera, pp. 312–529. In: **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference** (D.E. Wilson & D.M. Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- SIMMONS, N.B., R.S. VOSS. 1998. The mammals of Paracou, French Guiana: a neotropical lowland rainforest fauna. Part I. Bats. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 273: 1–219.
- SMITH, M.F., J.L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of Linnean Society** 50: 149–177.
- SOLEY-GUARDIA, M., E.E. GUTIÉRREZ, D.M. THOMAS, J. OCHOA-G., M. AGUILLERA, R.P. ANDERSON. 2016. Are we overestimating the niche? Removing marginal localities helps ecological niche models detect environmental barriers. **Ecology and Evolution** 6(5): 1267–1279.
- STADELMANN, B., L.K. LIN, T.H. KUNZ, M. RUEDI. 2007. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 43: 32–48.
- STAMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics** 30(9): 1312–1313.

- STEPHENS, L., M.A. TRAYLOR, Jr. 1983. **Ornithological gazetteer of Peru**. Harvard College Press, Cambridge, vi +270 p.
- SWOFFORD, D.L. 2001. **PAUP\* 4.0: Phylogenetic analyses using parsimony (\*and other methods)**. Beta version 4.0b10a for PC. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- TABACHNICK, B.G., L.S. FIDELL. 2014. Multivariate Analysis of Variance (MANOVA), pp. 902-904. In: **International Encyclopedia of Statistical Science** (M. Lovric, ed.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin.
- TABARELLI, M., A.M.M. SANTOS. 2004. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos, pp. 17–24. In: **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação** (K.C. Porto, J.J.P. Cabral, M. Tabareli, eds.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123: 585–595.
- TAN, D.S.H., Y. ANG, G.S. LIM, M.R. BIN ISMAIL, R. MEIER. 2010. From 'cryptic species' to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pythosoma* (Sepsidae: Diptera). **Zoologica Scripta** 39(1): 51–61.
- TÓTH, J.P., K. VARGA, Z. VÉGVÁRI, Z. VARGA. 2012. Distribution of the Eastern knapweed fritillary (*Melitaea ornata* Christoph, 1893) (Lepidoptera: Nymphalidae): past, present and future. **Journal of Insect Conservation** 17(2): 245–255.
- VANZOLINI, P.E., E.E. WILLIAMS. 1981. The vanish refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. **Papéis Avulsos de Zoologia** 34(23): 251–255.
- VENABLES, W.N., B.D. RIPLEY. 2002. **Modern applied statistics with S**. Springer-Verlag, New York, 446 p.
- VON HELVERSEN, O., K.G. HELLER, F. MAYER, A. NEMETH, M. VOLLETH, P. GOMBKÖTÖ. 2001. Cryptic mammalian diversity: a new species of whiskered bat (*Myotis alcathoe* n. sp.) in Europe. **Naturwissenschaften** 88: 217–223.
- WATANABE, S., T. HAJIMA, K. SUDO, T. NAGASHIMA, T. TAKEMURA, H. OKAJIMA, T. NOZAWA, H. KAWASE, M. ABE, T. YOKOHATA, T. ISE, H. SATO, E. KATO, K. TAKATA, S. EMORI, M. KAWAMIYA. 2011. MIROC-ESM 2010: model description and basic results of CMIP5-20c3m experiments. **Geosciences Model Development** 4: 845–872.
- WEBER, M.M., C.E.V. GRELLE. 2012. Does environmental suitability explain the relative abundance of the tailed-tailed bat, *Anoura caudifer*? **Natureza & Conservação** 10(2): 221–227.
- WEBER, M.M., L.C. TERRIBILE, N.C. CÁCERES. 2010. Potential geographic distribution of *Myotis ruber* (Chiroptera, Vespertilionidae), a threatened Neotropical bat species. **Mammalia** 74: 333–338.

- WERNECK, F.P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetations biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews** 30: 1630–1648.
- WHEELER, Q.D. 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 359(144): 571–583.
- WHITAKER, J.O., J.S. FINDLEY. 1980. Foods eaten by some bats from Costa Rica and Panama. **Journal of Mammalogy** 61(3): 540–544.
- WICKHAM, H., R. FRANÇOIS, L. HENRY, K. MÜLLER. 2017. Package 'dplyr'. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html>, acessado em 30/06/2017.
- WILEY, E.O., R.L. MAYDEN. 2000. The evolutionary species concept, pp 70–89. In: **Species concepts and phylogenetic theory – a debate** (Q.D. Wheeler, R. Meier, eds.). Columbia University Press, New York.
- WILSON, D.E. 2008 (2007). Genus *Myotis* Kaup 1829, pp. 468–481. In: **Mammals of South America, vol. 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats** (A.L. Gardner, ed.). University of Chicago Press, Chicago.
- WILSON, D.E., R.K. LAVAL. 1974. *Myotis nigricans*. **Mammalian Species** 39: 1–3.
- ZACHOS, F.E. 2016. **Species concepts in biology: historical development, theoretical foundations and practical relevance**. Springer International Publishing, Switzerland.

## APÊNDICE 1

Espécimes de *Myotis* examinados na Coleção Adriano Lucio Peracchi, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (ALP), coleções do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MN), Universidade Estadual Paulista de São José do Rio Preto (DZSJRP), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Pará (IEPA), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Royal Ontario Museum (ROM), Texas Tech University (TTU), Field Museum of Natural History (FMNH), Museum of Natural History, Kansas University (KU), American Museum of Natural History (AMNH), Museum of Vertebrate Zoology, University of California (MVZ), National Museum of Natural History (USNM), Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History (OMNH), Louisiana State University, Museum of Zoology (LSUMZ), Centre for the Study of Biological Diversity, University of Guyana, Guiana (CSBD), Muséum d'Histoire Naturelle de la Ville de Genève (MHNG), Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN-Paris), Zoologische Staatssammlung München (ZSM), Carnegie Museum (CM). Espécimes ainda não tombados em coleções: número de coletor de Cibele Rodrigues Bonvicino (CRB) e de João Alves de Oliveira (JAO).

***Myotis elegans* (N = 28):** MÉXICO: San Luis Potosi (TTU 8164); Chiapas (TTU 36157, 41147, 41148, AMNH 254674); Veracruz (KU 88398 [holótipo], KU 93534, MVZ 167666, 167667). HONDURAS: Olancho (TTU 13299, 13345, 47926); Santa Barbara (TTU 13348); Atlantida (TTU 84138, 84380). NICARAGUA (KU 111232). COSTA RICA (KU 158651). BELIZE: Belize City (AMNH 256848); Mussel Creek (FMNH 58503, 121112). GUATEMALA: El Peten, Tikal National Park (FMNH 58585–58588), El Peten (ROM 99515, 99433). EL SALVADOR (ROM 101293, 101319).

***Myotis keaysi* (N = 44):** EL SALVADOR: Santa Ana (ROM 101273, 101352, 101353, 101356, 101357, 101430, 101433, 101465–101467, 101524). VENEZUELA: Mérida, Montes de Milla (MNHN-Paris 1984-685, 1984-686, 1984-689). COLOMBIA: Huila, San Agustin (FMNH 72175). PERU: Puno, Inca Mines (AMNH 15814 [holótipo]), Ocañaque (MVZ 116050); Cuzco, Cordillera Vilcabamba (AMNH 214371, 233850, 233851, 233853, 233854, 233857, 236134), Hacienda Cadena (FMNH 78686); Huánuco, 7 km por estrada NW Carpish Pass (AMNH 216117); Huánuco, Cordillera

Carpish on Carretera Central (LSUMZ 12578, 12580, 14280, 14281, 14284, 14285, 14287, 14288); Pasco, Santa Cruz (LSUMZ 25907); Piura, 15 road km E Canchaque (LSUMZ 19213); Ayacucho, Puncu (LSUMZ 15688); Amazonas, ca. 20 km of La Peca by trail (LSUMZ 21488); Lambayeque, 16 km N and 25 km E Olmos (MVZ 135620, 135621); Junin, Chanchamayo (FMNH 65751). BOLÍVIA: Cochabamba, Incachaca (CM 5256); La Paz (TTU 23951).

***Myotis midastactus* (N = 30):** BOLÍVIA: Beni, Cercado (AMNH 211156 [holótipo], 211167–211169, 211171–211176, 211178–211184, 211190, 211192–211198); Santa Cruz, Parque Nacional Kempff Mercado, El Refugio (USNM 584502). PARAGUAI: Presidente Rayes (MVZ 144481–144484).

***Myotis pilosatibialis* (N = 62):** MÉXICO: Veracruz (CM 79435, AMNH 254676, 254677–254679); Tamaulipas (AMNH 144987–144989, 164938, 164939, 164941–164943, 164945, 164949, 164951, 164968–164972,); Oaxaca (AMNH 190162); El Salto, San Luis Potosi (LSUMZ 4928); Tabasco (LSUMZ 7535); localidade não disponível (KU 91911, 91912, 91915, 91916, 93535, 102618). GUATEMALA: Chimaltenango, Chocoyos (FMNH 41653, 41839–41841, 41843–41846, 73366); localidade não disponível (CM 118918, 118920, 118921, KU 82104, 82105, 82108, 82109). HONDURAS: Francisco Morazan, 1 km W Talanga (LACM 36879 [holótipo]); Cortes (AMNH 265126, CM 112905, 118614, 118615). BELIZE: Toledo (AMNH 256849). VENEZUELA: Aragua, Rancho Grande (USNM 562920, 562921); Carabobo, Montalban (USNM 441741, 441742); Distrito Federal, Los Venados (USNM 370889); Miranda, San Andrés (USNM 373920), Curupao (USNM 387714–387716, 387718).

***Myotis riparius* (N = 165):** ARGENTINA: Formosa, Rio Porteño (OMNH 18889); Jujuy, Santa Bárbara (OMNH 18890, OMNH 18891); Santa, Orán (OMNH 36219, 6221). BRASIL: Amazonas, Barcelos (CRB 2871); Pará, Mocambo (ALP 1915, 2002, 2003, 2554, 2557, 2562, 2587, 2610); Pará, Belém (USNM 361782, 361788–361791); Pará, Altamira (USNM 549517, 549518); Pernambuco, Irajá (UFPE 570); Pernambuco, Rio Formoso (UFPE 1255); Pernambuco, Água-Preta (UFPE 1440); Rio de Janeiro, Duque de Caxias (ALP 4356, 4357); Rio de Janeiro, Piraí (ALP 4573), Rio de Janeiro, Reserva Biológica do Tinguá (ALP 5421, 6623, 6680, 6681); Rio de Janeiro, Teresópolis (ALP

6479); Rio de Janeiro, Macaé de Cima (JAO 1757); São Paulo, Caeterus (ROM 111112, 111131, 111150); São Paulo, Jequitiba (MZUSP 32963, MZUSP 32964); São Paulo, Buri (MZUSP 32969, MZUSP 32970). COLOMBIA: Valle del Cauca, Hormiguero (USNM 483949, 483951); Valle del Cauca, Río Arroyohonda (USNM 483950); Tolima, Carmen de Apicalá (MVZ 104945, 104946); Caqueta, Río Caqueta (FMNH 72178); Meta, Parque Natural Sierra de La Macarena (FMNH 58754). COSTA RICA: Puntarenas, Parque Nacional Carara (FMNH 180728); Limón, Cariari (LSUMZ 12974); San José, Fila la Maquina (LSUMZ 12928). EQUADOR: Napo (FMNH 125008, 125013); Pichincha, Santo Domingo (USNM 528567, 528568, 528570); Carchi, El Pailon near (CM 112856); Esmeraldas, Lago Sade (CM 112857, 85344, 85345, 102883); Pastaza, Tiguino (USNM 548338, 548342, 548344–548347, 574563, 574564, TTU 84870); Orellana (FMNH 31072); Los Ríos, Vinces (USNM 513482); Los Ríos, Hacienda Santa Teresita (USNM 522575); El Oro, Reserva Ecológica Arenillas (TTU 85090, 102438). GUIANA: Barima-Waini (USNM 568021); Iwokrama Forest (ROM 106773, 107278, 112049, 114620, 114688, 114689). GUIANA FRANCESA: Sinnamary, Paracou (AMNH 266366, 266376, 267523, 267524, 268589, 268591). PANAMÁ: Bocas del Toro, Isla Popa (USNM 464368, 575586); Chiriqui, Cotito Near (USNM 331916); Panama, Serro Azul (ROM 99936); Panama, Cerro Campana (USNM 306795); Panama, San Blas (USNM 335410); Darién, Tacarcuna Village Camp (USNM 306798, 310254, 310255 [holótipo], 310256, 310257, 338097). PARAGUAI: Presidente Hayes (MHNG 1633-60, 1699-35, 1699-64, 1699-85, MVZ 144671, 144676); Canindeyu (TTU 94912, 95312, 99378); San Pedro (TTU 96372); Sapucay (USNM 115071–115073, 115095); Amambay (USNM 554538, 554539). PERU: Loreto, Río Curaray (KU 158162, AMNH 71645); Pasco, Oxapampa (AMNH 230775–230777); Huánuco (FMNH 55400); Ucayali, Balta (LSUMZ 12268, 12269, 12271); Cusco (USNM 582876–582878, 588040, FMNH 68481, AMNH 233859, 233860); Ayacucho, San José (LSUMZ 16631); Madre de Dios, Rio Tambopata (USNM 530919); Madre de Dios, Lago Sandoval (MVZ 157782); Madre de Dios, Manu (FMNH 174933). SURINAME: Para (CM 68443); Brokopondo (ROM 113879, 114007, 114142). TRINIDAD E TOBAGO: Ilha de Trinidad, St. George (TTU 5467). URUGUAI: Artigas (AMNH 205461, 205464, 205467, 205471, 205472, 205476); Tacuarembó (AMNH 205541, 205545, 205546, 205552, 205553, 205562–205565). VENEZUELA: Apure, Nulita (USNM 416584, 441746, 441748); Barinas, Altamira

(USNM 441743); Amazonas, Boca Mavaca (USNM 405803, 405804); Amazonas, Tamatama (USNM 405806); Amazonas, Capivara (USNM 409457); Bolívar, Río Supamo (USNM 387721).

***Myotis ruber* (N = 49):** BRASIL: Pernambuco, Brejo da Madre de Deus (UFPE 1022, 1026, 1089), Caruaru (UFPE 1105, 1285, 1361); Bahia, Alagoas (MHNG 1884-50); Minas Gerais, Viçosa (USNM 391140, ROM 70911, 78803–78805, 91211); Rio de Janeiro, Teresópolis (ALP 6452, 6457, 6458, 6497, 6499, 6506, 6512, MN 3400), Reserva Biológica do Tinguá (ALP 6621, 6683), Macaé de Cima (JAO 1751, 1756, 1773); São Paulo, Cananéia (MZUSP 27595), Boracéia (MZUSP 28359, 28367, 28368), São Paulo (MZUSP 31470–31473), Buri (MZUSP 32971–32973, 32975), Salesópolis (MVZ 185692); Santa Catarina, Nova Teotonia (MHNG 1916-71); Rio Grande do Sul, São Lourenço da Mata (MZUSP 1988). PARAGUAI: Sapucay, Sapucay (USNM 115097 [holótipo], 121478); Itapua, Arroyo Pirayu (MHNG 1747-56), Santo Temembey, 4 km amont (MHNG 1695-27); Misiones, Iguazu (OMNH 18882). URUGUAI: Arroyo Grande (MHNG 1748-47).

***Myotis simus* (N = 55):** COLOMBIA: Amazonas (TTU 9073, 9076–9078). EQUADOR, Amazonas (FMNH 140793); Pastaza (FMNH 43143, AMNH 71483, 71486). PERU: Pasco, Oxapampa (USNM 364481, 364482); Loreto, Maynas (AMNH 74110); Loreto, Río Curanja (LSUMZ 12251, 14264); Loreto (AMNH 76244, 76252, 76253, MHNG 1694-41, 1694-42); Huánuco (LSUMZ 14262); Ucayali, Balta (LSUMZ 12249, 12250); Ucayali, Yarinacocha (FMNH 62615, 97988). BRASIL: Amazonas, Manaus (AMNH 91475–91478, 91500); Amazonas, Borba (AMNH 91886, 91888–91891, AMNH 94224, 94225, 94227, 94230–94234); Amazonas, Parintins (AMNH 92983, 93490, 93492–93496, 93922, 93923); Amazonas, Rio Juruá (MZUSP 638, 1062, 1074); Amazonas, Itacoatiara (MZUSP 4372); Mato Grosso do Sul, Salobra (ALP 9277).

## APÊNDICE 2

Gazetteer das localidades de ocorrência de *Myotis riparius* confirmadas pelo exame de vouchers depositados em coleções científicas. As localidades abaixo estão organizadas em ordem alfabética por país e pela maior unidade política secundária dentro do país (e.g., estado, província, região ou departamento). A apresentação das localidades específicas seguiu da maior para a menor unidade geográfica (e.g., Estado, Município, Vila). Quando disponíveis, as coordenadas geográficas foram recuperadas diretamente das informações associadas aos espécimes nos museus ou das publicações originais que citam o depósito do espécime analisado.

---

### ARGENTINA

#### Formosa (Província de)

Río Porteno, km 64, a 5 km al sur de Estancia Sta. Catalina (24°56'S, 59°12'W).

#### Jujuy (Província de)

Laguna La Brea, 25 km antes de Palma Sola, sobre Ruta 1, Santa Bárbara (23°56'S, 64°28'W).

#### Misiones (Província de)

Acceso a Cataratas, Parque Nacional de Iguazú (25°40'S, 54°26'W).

#### Salta (Província de)

Piquirenda Viejo, 6 km W de San Martín (22°21'S, 63°53'W).

Isla de Cañas, 25 km al S por ruta 18 (23°00'S, 64°33'W).

40 km de Ruta 50, por Ruta 18, camino de inspección del gasoducto paralelo al camino de San Andrés (23°05'S, 64°38'W).

#### Santiago del Estero (Província de)

Pellegrini (26°01'S, 64°08'W).

#### Tucumán (Província de)

Burrucacú (26°30'S, 64°45'W).

Tafí Viejo, 5 km SW Siambón (26°44'S, 65°16'W).

---

## **BRASIL**

### **Amazonas (Estado do)**

Barcelos, Estrada Barcelos-Caurés, Km 10, Sítio do Sr. Francisco (01°03'S, 62°56'W).  
 Manaus (03°01'S, 60°09'W)

### **Pará (Estado do)**

Altamira, 52 Km SSW, E Banco Rio Xingu (03°39'S, 52°22'W).  
 Belém, Área de Pesquisas Ecológicas do Guamá (01°25'S, 48°17'W).  
 Belém, Utinga (01°25'S, 48°26'W).  
 Mocambo (03°06'S, 56°34'W).

### **Pernambuco (Estado do)**

Água-Preta, Fazenda Camarão (08°45'S, 35°28'W).  
 Irajá, Reserva Biológica Serra Negra (08°39'S, 38°01'W).  
 Rio Formoso, Reserva Biológica Saltinho (08°43'S, 35°10'W).

### **Rio de Janeiro (Estado do)**

Angra dos Reis, Ilha Grande (23°10'S, 44°11'W).  
 Cachoeiras de Macacu, Reserva Ecológica de Guapiaçu (22°25'S, 42°44'W).  
 Duque de Caxias, Raiz da Serra, Fazenda Cel. Robim (22°47'S, 43°18'W).  
 Macaé de Cima, Parque Estadual dos Três Picos (22°25'S, 42°31'W).  
 Nova Iguaçu, Reserva Biológica do Tinguá (22°36'S, 43°26'W).  
 Piraí (22°38'S, 43°54'W).  
 Rio de Janeiro, Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica (22°56'S, 43°24'W).  
 Teresópolis, Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22°26'S, 42°59'W).

### **São Paulo (Estado de)**

Alvinlândia, Estação Ecológica dos Caetetus (22°23'S, 49°40'W).  
 Salesópolis, Estação Biológica de Boracéia (23°38'S, 45°52'W).

---

## **COLÔMBIA**

### **Caquetá (Departamento de)**

Rio Caquetá (00°07'N, 74°40'W).

### **Meta (Departamento de)**

Parque Nacional Natural Sierra de La Macarena (02°44'N, 73°55'W).

### **Putumayo (Departamento de)**

Mocoa (01°09'N, 76°37'W).

**Tolima (Departamento de)**

Carmen de Apicalá (04°08'N, 74°42'W).

**Valle del Cauca (Departamento de)**

Hormiguero, 20 Km SE Cali (03°19'N, 76°21'W).

Rio Arroyohonda, 16 Km N Cali (03°28'N, 76°22'W).

**COSTA RICA****Heredia (Provincia de)**

Sarapiquí, Estación Biológica La Selva (10°25'N, 84°00'W).

**Limón (Provincia de)**

Cantón Pococí, Cariari (10°29'N, 83°36'W).

**Puntarenas (Provincia de)**

Cantones de Turrubares, Parque Nacional Carara (09°46'N, 84°36'W).

**San José (Provincia de)**

San José, Fila la Maquina (09°27'N, 83°32'W).

**EQUADOR****Carchi (Provincia de)**

El Pailon near (01°00'N, 78°14'W)

**El Oro (Provincia de)**

Reserva Ecologica Arenillas (03°32'S, 80°08'W).

**Esmeraldas (Provincia de)**

Lago Sade (00°32'N, 79°17'W)

**Los Ríos (Provincia de)**

Hacienda Santa Teresita, Abras de Mantequilla (01°19'S, 79°28'W).

Vinces, 3 km NE, Puerto Nuevo (01°33'S, 79°44'W).

**Orellana (Provincia de)**

Rio Suno (00°42'S, 77°14'W).

San José de Payamino (00°30'S, 77°16'W).

**Pastaza (Provincia de)**

Tiguino, 130 Km S Of Coca, Mera (01°27'S, 78°05'W).

**Pichincha (Provincia de)**

Santo Domingo, 47 Km S (by road), Rio Palenque Science Center (00°11'S, 78°30'W).

**Sucumbíos (Provincia de)**

Zancudo (00°32'S, 75°30'W).

**Tungurahua (Província de)**

Não especificado (01°15'S, 78°31'W).

---

**GUIANA**

**Barima-Waini (Região de)**

Baramita, North West of Airstrip (07°22'N, 60°29'W).

**Rotaro-Sipanini (Região de)**

Iwokrama Forest (04°17'N, 58°31'W).

---

**GUIANA FRANCESA**

**Sinnamary (Commune du)**

Paracou (05°16'N, 52°55'W).

---

**PANAMÁ**

**Bocas del Toro (Província de)**

Isla Popa, 1 km SE Deer Island Channel (09°09'N, 82°07'W).

**Chiriquí (Província de)**

Cotito near (08°52'N, 82°44'W).

**Darién (Província de)**

Tacarcuna Village Camp, Río Paya (08°09'N, 77°50'W).

Cerro Mali, head of Río Pucro (08°09'N, 77°50'W).

**Panamá (Província de)**

Cerro Azul (09°10'N, 79°24'W).

Cerro Campana (08°41'N, 79°55'W).

San Blas, Armila, Quebrada Venado, (09°03'N, 78°19'W).

---

**PARAGUAI**

**Alto Paraguay (Departamento de)**

Fortin Madrejon (20°37'S, 59°52'W).

**Amambay (Departamento de)**

Parque Nacional Cerro Corá (22°37'S, 55°59'W).

**Caazapá (Departamento de)**

Sapucay (26°05'S, 55°38'W).

**Canindeyú (Departamento de)**

Curuguaty (24°31'S, 55°42'W).

**Paraguarí (Departamento de)**

Paraguari (25°37'S, 57°09'W).

**Presidente Hayes (Departamento de)**

Retiro Mandeyú, 20 km SW in KM205 of Trans Chaco HWY (23°52'S, 58°40'W).

San Pedro (24°07'S, 56°58'W).

---

**PERU**
**Ayacucho (Região de)**

Río Sta. Rosa, San José (12°44'S, 73°46'W).

**Cusco (Região de)**

Ridge Camp (11°46'S, 73°20'W).

Camisea, San Martín 3 (11°47'S, 72°42'W).

Cordillera Vilcabamba, W side (12°29'S, 73°30'W).

Consuelo, Pautarcambo (13°01'S, 71°29'W).

Camisea, Armihuari (13°18'S, 72°11'W).

Hacienda Cadena, Quispicanchi (13°24'S, 70°43'W).

Marcapata (13°30'S, 70°55'W).

**Huánuco (Região de)**

Agua Caliente, Río Pachitea (08°49'S, 74°41'W).

Leoncio Prado (09°18'S, 76°00'W).

**Loreto (Região de)**

Río Curaray (04°22'S, 73°55'W).

**Madre de Dios (Região de)**

Rio Tambopata, 30 Km Up From Mouth (11°39'S, 70°33'W).

Lago Sandoval, Rio Madre de Dios (12°36'S, 69°02'W).

Mouth of Rio La Torre, S bank of Rio Tambopata, (12°51'S, 69°17'W).

Maskoitania, Manu (12°52'S, 71°17'W).

**Pasco (Região de)**

San Pablo, Oxapampa (10°27'S, 74°52'W).

**Ucayali (Região de)**

Rio Curanja, Balta (10°06'S, 71°14'W).

---

## **SURINAME**

### **Brokopondo (Distrito de)**

Brokopondo (04°57'N, 55°11'W).

### **Para (Distrito de)**

Zanderij (05°27'N, 55°12'W).

---

## **TRINIDAD E TOBAGO**

### **Trinidad (Ilha de)**

St. George (10°42'N, 61°20'W)

---

## **URUGUAI**

### **Artigas (Departamento de)**

6 km NNW Belén (30°37'S, 57°51'W).

### **Tacuarembó (Departamento de)**

Tacuarembó, 40 km NW de Tacuarembó, #1 (31°29'S, 56°14'W).

Tacuarembó, 40 km NW de Tacuarembó, #2 (31°38'S, 56°19'W).

---

## **VENEZUELA**

### **Amazonas (Estado del)**

Tamatama, Rio Orinoco (03°10'N, 65°49'W).

Capibara, 106 Km SW Esmeralda, Brazo Casiquiare (02°36'N, 66°24'W).

Boca Mavaca, 84 Km SSE Esmeralda, 7 Km Up Rio Mavaca (02°30'N, 65°14'W).

Cerro Neblina Base Camp, left (west) bank Río Baria (00°49'N, 66°09'W).

### **Apure (Estado de)**

Nulita, 29 Km SSW Santo Domingo, Selvas De San Camilo (07°19'N, 71°57'W).

### **Barinas (Estado de)**

Altamira, 7 Km NNE Altamira (08°50'N, 70°30'W).

### **Bolívar (Estado de)**

Rio Supamo, 50 Km SE El Manteco (07°00'N, 62°15'W).

San Ignacio de Yhuruani (05°00'N, 61°00'W).

### **Carabobo (Estado de)**

Rancho Grande (10°21'N, 67°40'W).